

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 777 211**

51 Int. Cl.:

A01H 3/00 (2006.01)
A01H 3/04 (2006.01)
A01N 63/04 (2006.01)
A01H 17/00 (2006.01)
C12N 1/38 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.08.2014 E 14179966 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.12.2019 EP 2982241**

54 Título: **Un procedimiento de micorrización de plantas y uso de sacáridos en micorrización**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.08.2020

73 Titular/es:
**INOQ GMBH (100.0%)
Solkau 2
29465 Schnega, DE**

72 Inventor/es:
**LUCIC, EVA y
MERCY, LOUIS**

74 Agente/Representante:
LOZANO GANDIA, José

ES 2 777 211 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

Un procedimiento de micorrización de plantas y uso de sacáridos en micorrización

5 La presente invención se refiere en un primer aspecto al uso de monosacáridos y/o disacáridos para la estimulación de la micorrización en plantas, así como para la producción de inóculo micorrízico en plantas como se define en las reivindicaciones. Además, la presente invención se refiere al uso de monosacáridos y/o disacáridos, opcionalmente, en combinación con inóculo micorrízico para mejorar el rendimiento de las plantas (crecimiento, rendimiento y supervivencia). Además, se proporcionan procedimientos para la producción de inóculo micorrízico en plantas, así como para el tratamiento de plantas, en particular cultivos, como se define en las reivindicaciones. Finalmente, la presente invención se refiere a una composición para la estimulación de la micorrización de plantas para la producción de inóculo micorrízico en plantas, para el rendimiento de las plantas que contienen monosacáridos y/o disacáridos, y también inóculo micorrízico.

15 **Técnica anterior**

Las prácticas agrícolas convencionales han asegurado el rendimiento y la protección del cultivo mediante el uso abundante de fertilizantes y pesticidas inorgánicos y orgánicos, pero alcanzan sus límites en la concienciación de su impacto en el medio ambiente y la salud humana. Hoy en día, existe una legislación asociada con la creciente preocupación por hacer frente a los problemas fitosanitarios (Directiva Europea 2009/128/CE). Por lo tanto, cada vez se explora en mayor medida una gestión más sostenible de los ecosistemas agrícolas que implican estrategias agroecológicas. El suelo es el primer hábitat de la planta, ya que interactúa en todas las etapas de su ciclo de vida, Jeffries P y col., 2003, *Biology and Fertility of Soils* 37: 1-16, y es una de las principales reservas de los servicios ecosistémicos. Las plantas viven en una miríada de interacciones bióticas y abióticas con el suelo y el medio ambiente que determinan su crecimiento, productividad y ciclo de vida, mientras que la rizosfera juega un papel de interfaz. También hay oportunidades para explorar mejor los microorganismos beneficiosos del suelo que contribuyen a estos servicios ecosistémicos para una producción agrícola sostenible, con el fin de mantener o mejorar el rendimiento, la resistencia de las plantas y al mismo tiempo preservar las cualidades nutricionales y organolépticas.

30 Alrededor del 90 % de todas las plantas forman una simbiosis con hongos micorrízicos en condiciones naturales Smith SE y Read DJ. 2008, *Mycorrhizal symbiosis*. Cambridge, Reino Unido: Academic Press. En una asociación micorrízica, el hongo coloniza las raíces de sus plantas huésped, ya sea de forma intracelular como hongos micorrízicos arbusculares (MA) o extracelular como hongos ectomicorrízicos. Los hongos micorrízicos arbusculares (MA) han establecido asociaciones simbióticas con las raíces de las plantas durante más de 450 millones de años, desde la aparición de las primeras plantas terrestres, lo que sugiere que los hongos MA ayudaron a las plantas en su colonización de la tierra (Redecker D y col., 2000, *Molecular Phylogenetics and Evolution* 14, 276-284). Los hongos MA son biota esencial del suelo que establecieron la relación simbiótica mutualista predominante dentro de las raíces de más de 200 000 especies de plantas (Smith SE y Read DJ. 2008, ver arriba). Las hifas del hongo aumentan la función del sistema radicular, alteran el estado hormonal de la planta huésped y le suministran agua y nutrientes minerales (Smith SE y Read DJ. 2008, ver arriba). Es decir, bajo esta asociación mutualista, la planta proporciona al hongo un acceso relativamente constante y directo a los carbohidratos, como las hexosas (glucosa y fructosa) (Bago B y col., 2003, *Plant Physiology* 131: 1-11). A cambio, la planta se beneficia de los hongos MA por una mayor capacidad de absorción de agua y nutrición mineral, por una combinación de mecanismos físicos y químicos. Los micelios micorrízicos pueden explorar un mayor volumen de suelo que el sistema de raíces, mejorando el área de superficie para la absorción de nutrientes (Hattingh MJ. y col., 1973, *Soil Sciences* 116: 383-387). Las micorrizas son especialmente beneficiosas para su planta compañera en suelos con valores minerales pobres, pero también cuando las plantas están sujetas a otro estrés abiótico (frío, calor, suelos salados, sequía, heridas) (Singh LP., y col., 2011, *Plant Signaling & Behavior* 6: 175-191).

50 Además, las plantas micorrízicas son más resistentes a enfermedades como las causadas por patógenos microbianos transmitidos por el suelo (Jung SC. y col., 2012, *Journal of Chemical Ecology* 38: 651-664). Además, debido a la capacidad mejorada de la absorción de minerales, los hongos micorrízicos pueden aumentar el crecimiento y el rendimiento de las plantas huésped.

55 Es decir, los efectos beneficiosos de los hongos MA para la planta huésped son múltiples, ya que i) mejoran el crecimiento de la planta mediante una mejor transferencia de nutrientes inorgánicos y agua (Smith SE y Read DJ. 2008, ver arriba); ii) aumentan la resistencia a los patógenos y la salud de las plantas (Whipps JM. 2004. *Canadian Journal of Botany* 82: 1198-1227); iii) mejoran la fotosíntesis de la planta; iv) estabilizan el suelo mediante la excreción de una glucoproteína fúngica, la glomalina (Rillig MC, Steinberg PD. 2002, *Soil Biology and Biochemistry* 34: 1371-1374; v) alivian el impacto del estrés abiótico, incluida la salinidad y la sequía (Aroca R y col., 2007, *New Phytologist* 173: 808-816 ;; Porrás-Soriano A y col., 2009. *Journal of Plant Physiology* 166: 1350-1359). Es decir, los hongos MA se benefician de las plantas por un hábitat en el que pueden completar su ciclo de vida, asociado con una mayor captación de fotosintetatos (Bago y col., 2003, ver arriba).

65 Se han realizado muchos esfuerzos para explotar el potencial de las micorrizas, comenzando por dominar la producción de inóculo micorrízico a varias escalas. Aunque hay varios procedimientos disponibles para la producción

de inóculo micorrícico, los costes promedio de dicho inóculo en el mercado siguen siendo prohibitivos y limitan su uso a gran escala (Vosatka M y col, 2008 en: Varma A, ed. Mycorrhiza, Berlín, Springer Berlin Heidelberg, 419-438 ; Ijdo M y col., 2011, Mycorrhiza 21: 1-16 ; Malusá y col., 2012, The Scientific World Journal 2012: 491206 (<http://dx.doi.org/10.1100/2012/491206> ; Smith FA, Smith SE. 2010. Plant Soil 348: 63-79; Smith SE, Smith FA. 2011. Annu Rev Plant Biol. 62: 227-250). El procedimiento incluye la producción de macetas *in vivo* en varios sustratos, sistemas hidro/aeropónicos *in vivo* y producción *in vitro* en medio sólido o líquido. Por lo tanto, una aplicación de inóculo micorrícico a menudo se limita a sistemas hortícolas u otros sistemas de cultivo controlados bajo un invernadero, mientras que las aplicaciones en el campo son limitadas. Además, las restricciones ambientales limitan el desarrollo de micorrizas dentro del sistema radicular, ya que los hongos micorrícicos no pueden desarrollarse de manera óptima en suelos que contienen altos residuos de fósforo y nitrógeno (Smith y Read, 2008, ver arriba). Finalmente, la cantidad y calidad del inóculo micorrícico, también afectado por el peso y el volumen, la metodología de aplicación y la formulación son factores determinantes para el desarrollo exitoso de estos hongos en los sistemas radiculares.

El documento US 4.749.402 describe un procedimiento y una composición para mejorar el desarrollo de micorrizas mediante la fertilización foliar de las plantas. En el documento JP 09-241112 se describe un procedimiento para mejorar las tasas de infección de hongos micorrícicos, en el que los oligosacáridos de ácido algénico se aplican solos o junto con hongos micorrícicos. El documento JP 09-224647 describe hongos micorrícicos arbusculares vesiculares cultivados usando un medio preparado mediante la adición de oligosacáridos de ácido algénico obtenidos por precipitación con etanol, mejorando el crecimiento de hifas.

Es decir, un uso extenso de las micorrizas en la agricultura es limitado, debido a la imprevisibilidad del efecto de las micorrizas en los cultivos. Tal como se identificó, la eficiencia de la simbiosis entre la planta y los hongos MA ocurre principalmente bajo la disponibilidad limitada de nutrientes en el suelo o en sustratos, lo que generalmente no es el caso en cultivos en la agricultura moderna. Es decir, debido al uso de altas cantidades de fertilizantes minerales, los hongos MA son menos capaces de desarrollarse en la raíz y, a menudo, se asocian con bajos beneficios en el rendimiento de la planta (Smith y Smith, 2011, ver arriba).

Por lo tanto, existe una necesidad continua de procedimientos mejorados para producir hongos micorrícicos y su uso en la agricultura.

La presente invención tiene como objetivo proporcionar procedimientos para mejorar la producción de inóculo micorrícico en plantas, así como procedimientos para mejorar el desarrollo de micorrizas en plantas, asociados con la mejora de la velocidad de germinación de semillas de plantas y el rendimiento de las plantas.

Descripción de la presente invención

En un primer aspecto, la presente invención se refiere al uso de monosacáridos y/o disacáridos para la estimulación de la micorrización en plantas de acuerdo con la reivindicación 1. Los monosacáridos y/o disacáridos se usan en una concentración de 100 ppm o menos, preferentemente entre 0,1 y 10 ppm o menos. Los inventores de la presente descubrieron que el uso de dosis bajas de monosacáridos y/o disacáridos promueve el desarrollo de micorrizas en las plantas. Además, los inventores de la presente descubrieron que los monosacáridos y/o disacáridos aumentan el número de propágulos micorrícicos durante la producción de inóculo micorrícico cuando se usan a dosis bajas. Por lo tanto, la presente invención se refiere en otro aspecto al uso de monosacáridos y/o disacáridos para la producción de inóculo micorrícico en plantas, en el que los monosacáridos y/o disacáridos se usan en una concentración de 100 ppm o menos. En particular, el uso de los monosacáridos y/o disacáridos de acuerdo con la presente invención para la producción de inóculo micorrícico en plantas representa la posibilidad de producir inóculo micorrícico en grandes cantidades a bajo coste. A diferencia de la técnica anterior, que requiere el uso de compuestos caros en grandes cantidades y, por lo tanto, no permite la producción de inóculo micorrícico a precios competitivos para su uso en la agricultura comercial de cultivos.

En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso de monosacáridos y/o disacáridos en combinación con o en presencia de inóculo micorrícico para mejorar el rendimiento de las plantas, por lo que los monosacáridos y/o disacáridos se usan a dosis bajas, a saber, en concentraciones de 100 ppm o menos.

Como se identificó, las dosis bajas de monosacáridos y/o disacáridos son suficientes para estimular la micorrización en las plantas, promover la producción de inóculo micorrícico, así como aumentar la tasa de germinación de las plantas o el rendimiento de las plantas cuando se usan junto con el inóculo micorrícico. La concentración es de 100 ppm o menos, por ejemplo, 1 ppm o menos, por ejemplo, menos de 0,01 ppm.

Como se usa en el presente documento, el término «monosacáridos y/o disacáridos» incluye monosacáridos de tipo único que incluyen pentosas y hexosas, así como heptosas. Por ejemplo, los monosacáridos C6 incluyen glucosa, manosa, altrosa, galactosa y fructosa, así como psicosa, sorbosa, tagatosa, talosa, gulosa e idosa, así como monosacáridos C5 que incluyen xilosa, xilulosa, arabinosa, lisosa, ribulosa y ribosa.

Los disacáridos útiles de acuerdo con la presente invención incluyen disacáridos como sacarosa, lactolosa, lactosa,

maltosa, trehalosa y celobiosa.

Se prefiere el uso de monosacáridos. Por tanto, los monosacáridos y/o disacáridos pueden usarse como monosacáridos y/o disacáridos individuales o al menos dos tipos diferentes de monosacáridos y/o disacáridos.

En una realización preferida, los monosacáridos y/o disacáridos se seleccionan de glucosa y/o fructosa.

Como se usa en el presente documento, el término «comprender» o «que comprende», así como «contener» o «que contiene», incluye la realización de «consistir» y «consistir en».

Como se usa en el presente documento, el término «planta» incluye las realizaciones de toda la planta, así como partes de plantas, incluyendo raíces, hojas y brotes.

Como se usa en el presente documento, el término «rendimiento» expresa tanto la cantidad como la calidad de un órgano vegetal dado (hoja, fruto, raíz o tubérculo), por ejemplo, que tiene un interés económico, y corresponde también a la cantidad de producto cosechado por cada terreno de cultivo dado. Además, el término «rendimiento de la planta» incluye mejorar el crecimiento, el rendimiento y la supervivencia.

Los inventores de la presente identifican que las bajas concentraciones tal como se definen en las reivindicaciones (también identificadas como dosis bajas que representan de 0,1 a 100 ppm) de los monosacáridos y/o disacáridos tienen efectos beneficiosos sobre la micorrización, así como sobre la producción de inóculo micorrízico.

Además, se ha reconocido que el uso de monosacáridos y/o disacáridos en combinación con inóculo micorrízico en plantas tiene efectos beneficiosos sobre el crecimiento de las plantas, es decir, el rendimiento global de las plantas.

Las plantas de acuerdo con la invención se cultivan en condiciones de cultivo controladas. La micorrización de las plantas se estimula en cultivos e hidropónicas.

En particular, las plantas se seleccionan de arroz (*Oryza sp*), trigo (*Triticum sp*), tomate (*Solanum lycopersicum*), caña de azúcar (*Saccharum sp*), maíz (*Zea mays*), patata (*Solanum tuberosum*), vid (*Vitis sp*), algodón (*Gossypium sp*), manzano (*Malus sp*), plátano (*Musa sp*), yuca (*Manihot sp*), mango (*Mangifera indica*), cebolla (*Allium cepa*), café (*Coffea sp*), alubia (*Phaseolus sp*), soja (*Glycine max*), oliva (*Olea europaea*), té (*Camellia sinensis*), naranja (*Citrus sinensis*), ñame (*Dioscorea sp*), lechuga (*Lactuca sativa*), cacao (*Theobroma cacao*), jengibre (*Zingiber officinale*).

En una realización, los monosacáridos y/o disacáridos se aplican sobre/o cerca de las raíces de la planta. En otra realización de la presente invención, los monosacáridos y/o disacáridos se aplican simultáneamente, por separado o secuencialmente junto con el inóculo micorrízico. Por ejemplo, el inóculo micorrízico se aplica sobre o cerca de las raíces de la planta a tratar, mientras que al mismo tiempo o en un momento posterior, los monosacáridos y/o disacáridos se aplican sobre o cerca de las raíces de las plantas o sobre un órgano diferente (es decir, hojas).

Por ejemplo, los monosacáridos y/o disacáridos se pueden usar de manera que se apliquen a las plantas micorrízicas directamente a través de las raíces, cerca de las raíces o foliarmente.

Por ejemplo, el inóculo micorrízico se aplica en el momento de la siembra o durante las 4 semanas posteriores a la siembra de semillas, plantas o brotes.

El inóculo micorrízico puede seleccionarse de esporas y/o raíces micorrízicas y/o micelio. Además, el inóculo micorrízico se puede usar en forma líquida o sólida. Además, en una realización preferida, los monosacáridos y/o disacáridos se aplican como líquidos o sólidos. En una realización alternativa, los monosacáridos y/o disacáridos se aplican sobre las hojas y/o directamente a la raíz o cerca de la raíz mientras se aplica el inóculo micorrízico a las raíces, es decir, se aplica al suelo.

La metodología es compatible con la aplicación adecuada de fertilizantes junto con los monosacáridos y/o disacáridos. Una persona experta conoce bien los fertilizantes adecuados que se pueden aplicar con los monosacáridos y/o disacáridos.

Al aplicar monosacáridos y/o disacáridos en combinación con inóculo micorrízico, se puede aumentar la tolerancia al estrés de la planta, en particular de los cultivos.

Como se expuso anteriormente, la técnica anterior describió que la micorrización ocurre más rápidamente por una mejor colonización por hongos en las raíces de las plantas que crecen en un ambiente con nutrición deficiente. Es decir, a niveles altos de fosfatos, se inhibe el desarrollo de micorrizas y los beneficios de las micorrizas disminuyen, convirtiéndose en parásitos en determinadas situaciones. Además, se describe que el desarrollo de micorrizas es más fuerte en plantas que sufren estrés. El estrés biótico y abiótico de las plantas suele ser una situación que se intenta evitar en la agricultura. Sin embargo, se describe en la literatura que los hongos micorrízicos, cuando están presentes, pueden colonizar más rápidamente plantas que sufren estrés.

Los inventores de la presente descubrieron que el uso de los monosacáridos y/o disacáridos de acuerdo con la presente invención puede superar el problema de la alta concentración de fosfato en la micorrización. Es decir, en contraste con la situación descrita en la técnica, el uso de los monosacáridos y/o disacáridos en bajas concentraciones, en una concentración de 100 ppm o menos, es beneficioso para la micorrización de plantas incluso en condiciones de altas concentraciones de fosfato. Por lo tanto, es posible superar el problema actual de la micorrización efectiva en condiciones de alto contenido de fosfatos. Además, al aumentar la colonización y la micorrización de las plantas, es posible reducir los pesticidas. Además, el uso de los monosacáridos y/o disacáridos de acuerdo con la presente invención permite fomentar o dar apoyo a la micorrización, incluso en condiciones con una baja concentración de fosfato, es decir, en condiciones de escasez de fosfatos, por ejemplo, escasez de fertilizantes. En particular, en la agricultura de campo, el uso de los monosacáridos y/o disacáridos de acuerdo con la presente invención, opcionalmente, en combinación con el inóculo micorrízico permite estimular la micorrización de plantas, en particular, cultivos incluso a altas concentraciones de fosfatos. Por lo tanto, la actividad metabólica del hongo simbiótico se incrementa apoyando el crecimiento de las plantas y, en consecuencia, aumentando el rendimiento de las plantas.

El establecimiento de hongos micorrízicos en la raíz, en relación con el estado fisiológico de la planta, parece depender de la implementación de la respuesta sistémica inducida (RSI) (Hause, B. y col., 2007, *Phytochemistry* 68: 101-110), mientras que el establecimiento de la resistencia sistémica adquirida (RSA) limita el desarrollo de micorrizas (De Roman M. y col., 2010, *Journal of Ecology* 99: 36-45). Estas dos respuestas de defensa de la planta implican una interacción de reguladores de crecimiento opuestos, que modulan el desarrollo de micorrizas. Por ejemplo, el ácido abscísico (ABA) se ha descrito como un factor crucial para la formación arbuscular con consecuencias positivas en el desarrollo de micorrizas, Herrera-Medina MJ y col., JM. 2007, *New Phytologist* 175: 554-564, y se sabe que está involucrado en la RSI; Van der Ent S. y col., 2009 *New Phytologist* 183: 419-431. ABA es antagonista de la RSA, Yasuda M. y col., 2008, *Plant Cell* 20: 1678-1692 , cuya implementación está mediada principalmente por el ácido salicílico (AS), un regulador del crecimiento conocido por inhibir el desarrollo de micorrizas Ozgönen, H. y col., 2001, *Turkish Journal of Agriculture & Forestry*, 25: 25-29 ; Blilou I. y col., 1999, *Journal of Experimental Botany* 50: 1663-1668 ; Herrera-Medina MJ y col., 2003, *Plant science* 164: 993-998 . Por lo tanto, la idea del uso de monosacáridos/oligosacáridos es ayudar a los hongos micorrízicos a crear un contexto fisiológico favorable de la planta para aumentar la susceptibilidad micorrízica, al inducir una RSI de cebado mejorado en la planta sin el uso de un regulador de crecimiento. Se demostró que la glucosa aumenta el contenido de ABA. La aplicación de monosacáridos/oligosacáridos a dosis bajas hace que actúen, por lo tanto, como inductores, es decir, señales que inducen una respuesta específica de defensa de la planta (cebado), promoviendo el desarrollo de micorrizas, optimizando los intercambios entre la planta y el MAF y beneficiando el rendimiento de la planta.

En una realización de la presente invención, es posible aplicar el inóculo micorrízico solo una vez a las plantas mientras que los monosacáridos y/o disacáridos se aplican a las plantas una vez, dos veces o más. En una realización de la invención, se prefiere una única aplicación.

La presente invención se refiere además a un procedimiento para la producción de inóculo micorrízico en plantas, en el que los monosacáridos y/o disacáridos están presentes en una concentración de 100 ppm o menos cuando se produce el inóculo micorrízico. Es decir, los inventores de la presente descubrieron que, en presencia de los monosacáridos y/o disacáridos como se identifica aquí, la colonización y la producción de inóculo micorrízico en plantas aumenta y el tiempo puede acortarse y, por lo tanto, es posible producir inóculo micorrízico rentable en grandes cantidades.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a una composición para estimular la micorrización de plantas para el rendimiento de las plantas. Dicha composición contiene monosacáridos y/o disacáridos para aplicación en plantas, incluyendo componentes de plantas (como extractos de plantas). Además, la composición contiene inóculo micorrízico para micorrización de plantas. Por ejemplo, el kit o composición contiene los monosacáridos y/o disacáridos como un líquido o como un sólido para usarse en una concentración de 100 ppm o menos, es decir, aplicando 100 mg o menos/litro de los monosacáridos y/o disacáridos. Dicho inóculo micorrízico puede proporcionarse en formulación sólida o líquida para aplicarse preferentemente sobre las raíces o cerca de las raíces de las plantas.

Dicho kit se utilizará en el procedimiento de acuerdo con la presente invención que permite aumentar el rendimiento de las plantas a tratar.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Mejora del desarrollo de micorrizas en plántulas de patata *in vitro* inoculadas con *Rhizophagus irregularis* mediante la aplicación en el suelo (A) o en las hojas (B) de D-glucosa y D-fructosa. Las medias con la misma letra no son significativamente diferentes, los valores F% y M% se analizaron de forma independiente.

Figura 2: Mejora del desarrollo de micorrizas en plántulas de patata *in vitro* inoculadas con *Rhizophagus irregularis* mediante la aplicación en hojas (una vez) de D-glucosa a través de 5 concentraciones de fósforo. Las medias con la misma letra no son significativamente diferentes; los valores de F% y M%, así como los datos por concentración de fósforo, se analizaron de forma independiente.

Figura 3: Mejora del desarrollo de micorrizas en plántulas de patata *in vitro* inoculadas con varias especies de MAF y tratadas o no con una aplicación de D-glucosa en el suelo. Las medias con la misma letra no son significativamente diferentes. Los datos por cepa micorrízica se analizaron de forma independiente.

Figura 4: Efecto sobre el rendimiento de plantas de patata inoculadas (M) o no (NM) con *Rhizophagus irregularis*, tratadas o no con D-glucosa (5 ml de una solución que contiene 100 ppm de D-glucosa) en hojas que contienen 50 ppm de fósforo. Las medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Figura 5: Efecto sobre el rendimiento de plantas de patata inoculadas (M) o no (NM) con *Rhizophagus irregularis*, tratadas o no con aplicación de D-glucosa en el suelo (100 ppm) en 3 concentraciones diferentes de fósforo. Las medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

La presente invención se describirá mediante diferentes ejemplos adicionales sin limitar el alcance de la invención a la misma.

Ejemplos que muestran la mejora del desarrollo de micorrizas con la aplicación de monosacáridos en el suelo o en las hojas de las plantas:

Ejemplo 1: Impacto de D-glucosa y D-fructosa en el desarrollo de micorrizas, cuando se aplican en el suelo o en las hojas de las plantas.

Materiales y procedimientos

Se transplantaron plántulas de patata *in vitro* de 2 semanas de antigüedad (cv K19-99-0012 creciendo en medio MS modificado) en invernadero en macetas de 500 ml de sustrato de arena estéril (esterilizado dos veces a 120 °C durante 6 h), que contienen o no el aislante *Rhizophagus irregularis* B22-5 (300 esporas por planta, inoculadas cerca de la raíz de la planta, con una micropipeta). Los tratamientos con monosacáridos consisten en rociar sobre las hojas (diluidos con agua osmotizada estéril, una vez, en ambas caras de las hojas, con 5 ml de solución justo después de la plantación de la patata), o mediante la mezcla (en forma de polvo) directamente en el sustrato estéril. Las concentraciones utilizadas son las siguientes:

- D-glucosa: 0,1 g/L (100 ppm en el suelo; 0,5 ppm final cuando se aplica en las hojas)
- D-fructosa: 0,01 g/L (10 ppm en el suelo; 0,1 ppm final cuando se aplica en las hojas)

El grupo de plantas de control para el tratamiento foliar consiste en rociar agua osmotizada estéril (5 ml, pH 4,91) una vez sobre las hojas (ambas caras) sin monosacáridos en el momento de la plantación.

Para cada tratamiento, se realizan 4 repeticiones; las plantas se fertilizaron una vez por semana con solución de Hoagland (50 ml por maceta), que contenía una baja concentración de fosfato (0,5 mg/L) para expresar el desarrollo de micorrizas. Se regaron las plantas fueron regadas cuando fue necesario.

Las raíces de las plantas se cosecharon después de 8 semanas de cultivo y se tiñeron con tinta china, de acuerdo con el protocolo de Vierheilig, H. y Piché, Y. (1998), Z. Pflanzenernaehr. Bodenk., 161: 601-602, doi: 10.1002/jpln.1998.3581610515. A continuación, la tasa micorrízica se calculó de acuerdo con el protocolo de Trouvelot, A.; y col., (1986): En: Physiological and Genetical Aspects of Mycorrhizae, V. Gianinazzi-Pearson and S. Gianinazzi (eds.). INRA Ress, París, P. 217 - 221, utilizando el software Myccalc (www2.dijon.inra.fr/mychintec/Mycocalc-prg/download.html).

Los datos se analizaron unilateralmente con el sistema de análisis estadístico (v 9.1.3, SAS Institute Inc., Cary, NC, EE. UU.) de ANOVA. Las medias se separaron usando la prueba de la relación K de Waller-Duncan Bayesian a $p < 0,05$. Los valores porcentuales se sometieron a la transformación de arcocosa antes del procesamiento.

Resultados

La Figura 1 muestra los datos de la tasa micorrízica. Los valores de F% (frecuencia de micorrizas) y M% (intensidad del desarrollo de micorrizas en las raíces) para las plantas micorrízicas sin tratamiento son respectivamente 77,5 % y 39,07 %. No se observó desarrollo micorrízico en plantas inoculadas tratadas con agua osmotizada estéril. La aplicación de agua ácida en las hojas de las plantas afecta fuertemente a las capacidades fotosintéticas, mientras que los MAF son biotrofos obligatorios que necesitan fotosintetatos (Smith y Read, 2008, ver arriba): por lo tanto, el hongo no puede crecer adecuadamente dentro de las raíces de las plantas.

Cuando los monosacáridos se aplican en el suelo, el desarrollo de micorrizas mejora significativamente:

- F% alcanza el valor máximo del 100 % (1,29 veces en comparación con las plantas inoculadas sin

tratamiento) y M% alcanza el valor 87,56 % (2,24 veces en comparación con las plantas inoculadas sin tratamiento) después de la aplicación de D-glucosa,

5 - F% alcanza el valor 99,17 % (1,28 veces en comparación con las plantas inoculadas sin tratamiento) y M% alcanza el valor 74,26 % (1,9 veces en comparación con las plantas inoculadas sin tratamiento) después de la aplicación de D-fructosa.

10 - El desarrollo de micorrizas se restablece cuando se aplica D-glucosa o D-fructosa en las hojas, en comparación con las plantas inoculadas tratadas con agua estéril osmotizada en las hojas. En el caso de D-glucosa, los valores de M% obtenidos cuando las plantas se tratan foliarmente son significativamente más altos que los obtenidos con plantas inoculadas sin aplicación foliar de agua estéril.

Ejemplo 2: impacto del tratamiento foliar de D-glucosa en el desarrollo de micorrizas bajo diversas concentraciones de P

Materiales y procedimientos

20 Se transplantaron plántulas de patata *in vitro* de 2 semanas de antigüedad (cv K19-99-0012 creciendo en medio MS modificado) en invernadero en macetas de 500 ml de sustrato de arena estéril (esterilizado dos veces a 120 °C durante 6 h), que contienen respectivamente 10, 50, 100 y 300 ppm de concentración de fósforo (el cálculo de las diferentes concentraciones en ppm se basa en el fósforo presente en KH₂₂PO₄). Las plantas se inocularon o no con 300 esporas de *Rhizophagus irregularis* (cepa INOQ QS 69) cerca de las raíces con micropipeta. Los tratamientos con monosacáridos consisten en pulverizar D-glucosa en las hojas (100 mg/L diluido con agua del grifo estéril a pH 7, una vez, en ambas caras de las hojas, con 5 ml de solución justo después de la plantación de patata, lo que supone un 25 0,5 ppm de pulverización final en las hojas).

Para cada tratamiento, se realizan 5 repeticiones; las plantas se fertilizaron una vez por semana con solución de Hoagland (50 ml por maceta) que no contenía fosfato. Se regaron las plantas fueron regadas cuando fue necesario.

30 Las raíces de las plantas se cosecharon después de 8 semanas de cultivo y se tiñeron con tinta china, de acuerdo con el protocolo de Vierheilig *et al.* (1998), ver más arriba. A continuación, la tasa micorrícica se calculó de acuerdo con el protocolo de Trouvelot *et al.*, 1986, ver arriba, utilizando el software MycoCalc (www2.dijon.inra.fr/mychintec/MycoCalc-prj/download.html).

35 Los datos se analizaron unilateralmente con el sistema de análisis estadístico (v 9.1.3, SAS Institute Inc., Cary, NC, EE. UU.) de ANOVA. Las medias se separaron usando la prueba de la relación K de Waller-Duncan Bayesian a $p < 0,05$. Los valores porcentuales se sometieron a la transformación de arcocosa antes del procesamiento.

Resultados

40 La Figura 2 muestra los datos de la tasa micorrícica. El desarrollo de micorrizas aumenta significativamente con la aplicación en las hojas de una solución de D-glucosa, en todas las concentraciones de fósforo probadas:

45 - con 10 ppm de fósforo, la D-glucosa permite un aumento de 1,09 y 3,85 veces, respectivamente, de los valores de F% y M%.

- con 50 ppm de fósforo, la D-glucosa permite un aumento de 1,72 y 5,96 veces, respectivamente, de los valores de F% y M%.

50 - con 100 ppm de fósforo, la D-glucosa permite un aumento de 2,72 y 16,15 veces, respectivamente, de los valores de F% y M%.

55 - con 300 ppm de fósforo, la D-glucosa permite un aumento de 3,59 y 7,36 veces, respectivamente, de los valores de F% y M%.

Ejemplo 3: impacto de la aplicación al suelo de D-glucosa en el desarrollo de diferentes especies de MAF micorrícicas en plantas de patata

Materiales y procedimientos

60 Se transplantaron plántulas de patata *in vitro* de 2 semanas de antigüedad (cv K19-99-0012 creciendo en medio MS modificado) en invernadero en macetas de 500 ml de sustrato de arena estéril (esterilizado dos veces a 120 °C durante 6 h). Las plantas se inocularon con 10 esporas de 6 especies diferentes de MAF (por separado), cerca de las raíces con micropipeta. Se probaron 4 cepas de INOQ *Rhizophagus irregularis* y se compararon con 2 cepas de BEG como referencia. Las especies de MAF probadas fueron las siguientes:

- 4 cepas de *Rhizopogon irregularis*, referenciadas como a, b, c y d (esporas *in vitro*)
 - *Rhizopogon intraradices* BEG 144 (esporas *ex vitro*)
- 5 - *Funneliformis mosseae* BEG 12 (esporas *ex vitro*)

Los tratamientos con monosacáridos consisten en mezclar D-glucosa (en polvo) directamente en el sustrato estéril a una concentración de 100 ppm.

10 Para cada tratamiento, se realizan 3 repeticiones; las plantas se fertilizaron una vez por semana con solución de Hoagland (50 ml por maceta), que contenía una baja concentración de fosfato (0,5 mg/L). Las plantas fueron regadas cuando fue necesario.

15 Las raíces de las plantas se cosecharon después de 8 semanas de cultivo y se tiñeron con tinta china, de acuerdo con el protocolo de Vierheilig y col. (1998), ver más arriba. A continuación, la tasa micorrízica se calculó de acuerdo con el protocolo de Trouvelot y col., 1986, ver arriba, utilizando el software MycoCalc (www2.dion.inra.fr/mychintec/MycoCalc-prg/download.html).

20 Los datos se analizaron unilateralmente con el sistema de análisis estadístico (v 9.1.3, SAS Institute Inc., Cary, NC, EE. UU.) de ANOVA. Las medias se separaron usando la prueba de la relación K de Waller-Duncan Bayesian a $p < 0,05$. Los valores porcentuales se sometieron a la transformación de arcocosa antes del procesamiento.

Resultados

25 La Figura 3 muestra los datos de la tasa micorrízica. La aplicación de D-glucosa en el suelo ha permitido aumentar el desarrollo de micorrizas, con el M% (en comparación con las plantas no tratadas):

- 3,41 veces para *Rhizopogon irregularis* cepa a
- 30 - 2,51 veces para *Rhizopogon irregularis* cepa b
- 2,02 veces para *Rhizopogon irregularis* cepa cU1
- 2,45 veces para *Rhizopogon irregularis* cepa dU33
- 35 - 2,61 veces para *Rhizopogon intraradices* BEG 144
- 2,33 veces para *Funneliformis mosseae* BEG 12

40 **Ejemplos que muestran la mejora del rendimiento del tubérculo cuando las plantas se inoculan y se tratan con el monosacárido:**

Ejemplo 1: Aplicación foliar

45 Materiales y procedimientos

Se transplantaron plántulas de patata *in vitro* de 2 semanas de antigüedad (cv K19-99-0012 creciendo que crecían en medio MS modificado) en invernadero en macetas de 500 ml de sustrato de arena estéril (esterilizado dos veces durante 6 h). Las plantas se inocularon o no con 300 esporas de *Rhizopogon irregularis* (cepa INOQ QS 69) cerca de las raíces con micropipeta. Una aplicación foliar con D-glucosa (100 ppm diluido con agua del grifo estéril a pH 7, una vez, en ambas caras de las hojas, con 5 ml de solución justo después de la plantación de patata). En este caso, para obtener el rendimiento del tubérculo, las plantas fueron fertilizadas con 50 ppm de concentración de fósforo (ppm se basa en el fósforo agregado en forma de KH₂₂ PO₄₄), mezclada directamente en el sustrato estéril antes de plantar.

55 Para cada tratamiento, se realizan 4 repeticiones; las plantas se fertilizaron una vez por semana con solución de Hoagland (50 ml por maceta) que no contenía fosfato. Las plantas fueron regadas cuando fue necesario.

60 Después de 8 semanas de cultivo, los tubérculos se cosecharon y se pesaron. Los datos se analizaron unilateralmente con el sistema de análisis estadístico (v 9.1.3, SAS Institute Inc.) de ANOVA. Las medias se separaron usando la prueba de la relación K de Waller-Duncan Bayesian a $p < 0,05$.

Resultados

65 La Figura 4 muestra los datos sobre el rendimiento de tubérculos obtenidos después de la aplicación foliar de D-glucosa en plantas de patata en un suelo que contiene 50 ppm de fósforo. La presencia de hongos micorrízicos tiende a aumentar el rendimiento del tubérculo en 1,2 veces en comparación con las plantas no inoculadas (no significativo).

La presencia de hongos micorrícicos con una aplicación de D-glucosa en las hojas permite aumentar significativamente el rendimiento del tubérculo en 2,12 veces en comparación con las plantas no inoculadas.

Ejemplo 2: aplicación en el suelo

5

Materiales y procedimientos

Se transplantaron plántulas de patata *in vitro* de 2 semanas de antigüedad (cv K19-99-0012 creciendo en medio MS modificado) en invernadero en macetas de 500 ml de sustrato de arena estéril (esterilizado dos veces durante 6 h). Las plantas se inocularon o no con un inóculo micorrícico que contenía *Rhizophagus irregularis* (cepa INOQ QS 69, mezclado directamente en el sustrato al 4 %). Los tratamientos con monosacáridos fueron los siguientes:

- Una aplicación en el suelo con D-glucosa (100 ppm en forma de polvo, mezclado directamente en el sustrato, al mismo tiempo que la inoculación y justo antes de plantar). En este caso, para obtener el rendimiento del tubérculo, las plantas fueron fertilizadas con 50, 100 y 300 ppm de concentración de fósforo (ppm se basa en el fósforo agregado en forma de KH₂₂PO₄₄), mezclada directamente en el sustrato estéril antes de plantar.

Para cada tratamiento, se realizan 3 repeticiones; las plantas se fertilizaron una vez por semana con solución de Hoagland (50 ml por maceta) que no contenía fósforo. Las plantas fueron regadas cuando fue necesario.

Después de 8 semanas de cultivo, los tubérculos se cosecharon y se pesaron. Los datos se analizaron unilateralmente con el sistema de análisis estadístico (v 9.1.3, SAS Institute Inc.) de ANOVA. Las medias se separaron usando la prueba de la relación K de Waller-Duncan Bayesian a $p < 0,05$.

Resultados

La Figura 5 muestra los datos sobre el rendimiento de tubérculos obtenidos después de la aplicación en el suelo de D-glucosa en plantas de patata en un suelo que contiene 50, 100 o 300 ppm de fósforo. La presencia de hongos micorrícicos tiende a aumentar el rendimiento del tubérculo en 1,09; 1,16 y 1,06 veces, respectivamente, en presencia de 50, 100 o 300 ppm de fósforo en comparación con las plantas no inoculadas (no significativo). La presencia de hongos micorrícicos con una aplicación de D-glucosa en el suelo permite aumentar significativamente el rendimiento del tubérculo en 1,97; 1,56 y 2,20 veces, respectivamente, en presencia de 50, 100 o 300 ppm de fósforo en comparación con las plantas no inoculadas, y en 1,81; 1,35 (no significativo) y 2,08 veces respectivamente en presencia de 50, 100 o 300 ppm de fósforo en comparación con las plantas inoculadas sin aplicación de D-glucosa. La aplicación de D-glucosa en el suelo en plantas no inoculadas disminuye el rendimiento de la patata en comparación con el grupo de plantas de control con 50 ppm de fósforo (1,21 veces, no significativo) y con 300 ppm de fósforo (1,72 veces, significativo), mientras que el rendimiento permanece estable por debajo de 100 ppm de fósforo (aumentado en 1,05 veces, no significativo).

Conclusiones

La aplicación de monosacáridos mejora el desarrollo de micorrizas y el rendimiento de la patata cuando se aplica en el suelo o en las hojas, independientemente de la concentración de fósforo probada. Sin embargo, se recomienda verificar el pH para una solución líquida de monosacáridos y ajustarlo a 7, especialmente en el caso de la aplicación foliar.

45

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Un uso de monosacáridos y/o disacáridos para la estimulación de la micorrización en cultivos y plantas hidropónicas, en el que los monosacáridos y/o disacáridos se usan en una concentración de 100 ppm o menos, como entre 0,1 a 100 ppm.
- 10 **2.** Un uso de monosacáridos y/o disacáridos en presencia de inóculo micorrízico para mejorar el rendimiento de cultivos y plantas hidropónicas, en el que los monosacáridos y/o disacáridos se usan en una concentración de 100 ppm o menos, preferentemente entre 0,1 y 100 ppm.
- 15 **3.** El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que los monosacáridos y/o disacáridos se seleccionan de glucosa o fructosa.
- 20 **4.** El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que los monosacáridos y/o disacáridos se aplican foliarmente.
- 25 **5.** El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que los monosacáridos y/o disacáridos se aplican sobre o cerca de las raíces de las plantas.
- 30 **6.** El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que los monosacáridos y/o disacáridos se aplican simultáneamente, por separado o secuencialmente junto con el inóculo micorrízico.
- 35 **7.** El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que los monosacáridos y/o disacáridos se aplican a cultivos micorrízicos y plantas hidropónicas en las raíces, cerca de las raíces o foliarmente.
- 40 **8.** El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2, 4 a 8, en el que el inóculo micorrízico contiene esporas y/o raíces micorrízicas y/o micelio.
- 45 **9.** El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que se aplica un fertilizante junto con los monosacáridos y/o disacáridos.
- 10.** El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores para aumentar la tolerancia al estrés de las plantas, en particular, cuando se aplican monosacáridos y/o disacáridos en combinación con inóculo micorrízico.
- 11.** Un procedimiento para la producción de inóculo micorrízico en plantas, en el que los monosacáridos y/o disacáridos están presentes en una concentración de 100 ppm o menos, como entre 0,1 a 100 ppm cuando se produce el inóculo micorrízico.
- 12.** Un procedimiento para tratar cultivos y plantas hidropónicas, que comprende la etapa de aplicar monosacáridos y/o disacáridos e inóculo micorrízico en dichas plantas, en el que la aplicación de monosacáridos y/o disacáridos e inóculo micorrízico puede ser simultánea, por separado o secuencialmente y los monosacáridos y/o disacáridos se aplican en una concentración de 100 ppm o menos, como entre 0,1 a 100 ppm.
- 13.** El uso de una composición para estimular la micorrización de plantas de cultivo, para la producción de inóculo micorrízico en plantas, para aumentar el rendimiento de los cultivos y plantas hidropónicas, en el que dicha composición contiene monosacáridos y/o disacáridos para aplicación en componentes de plantas e inóculo micorrízico para micorrización de plantas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.

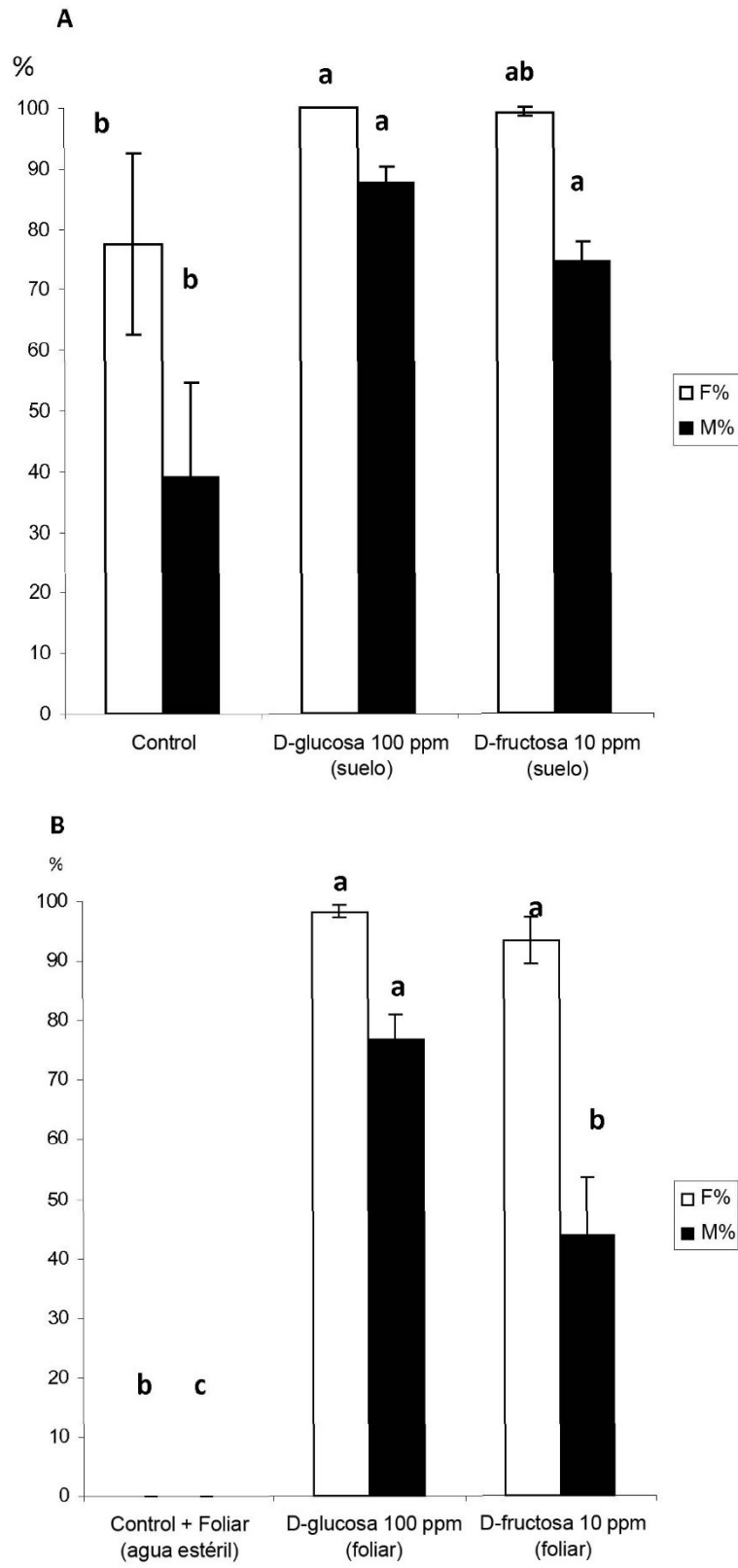


Figura 1

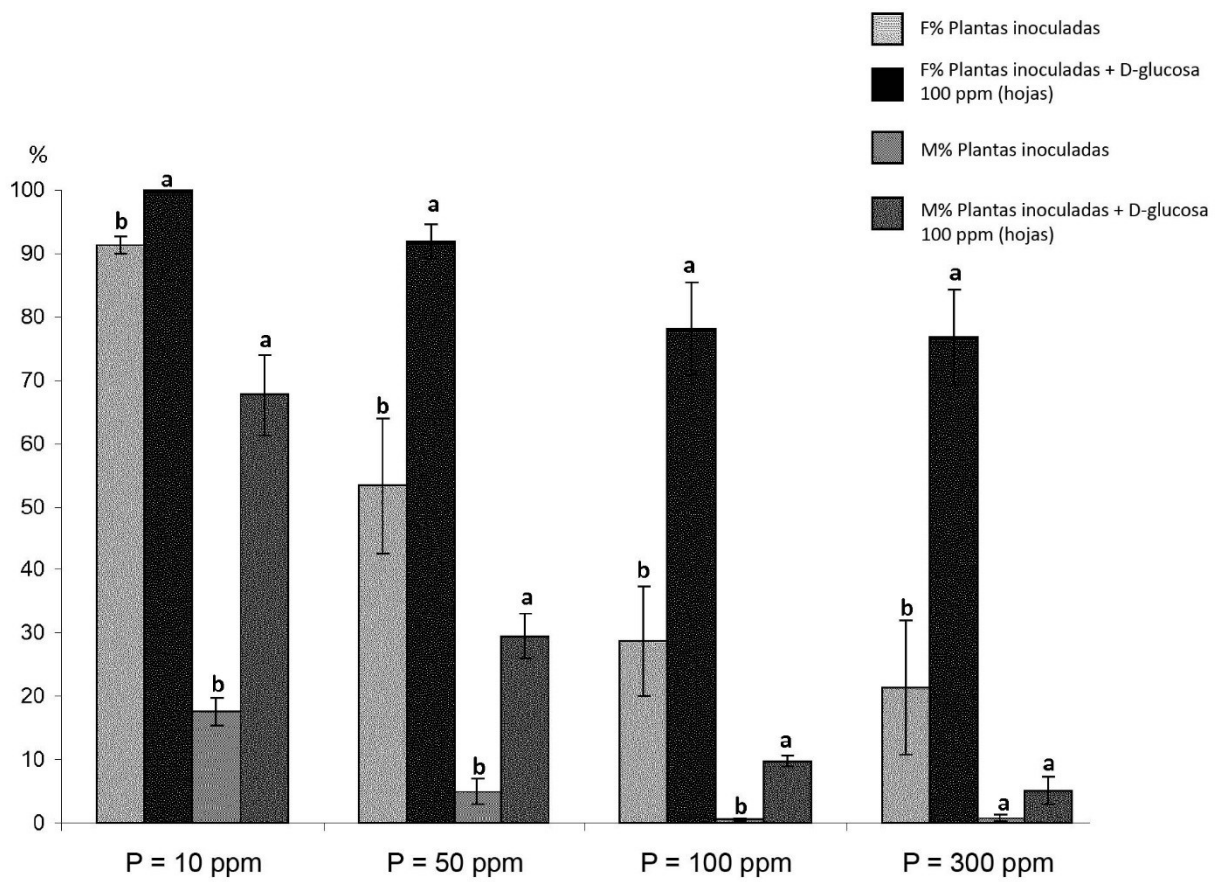


Figura 2

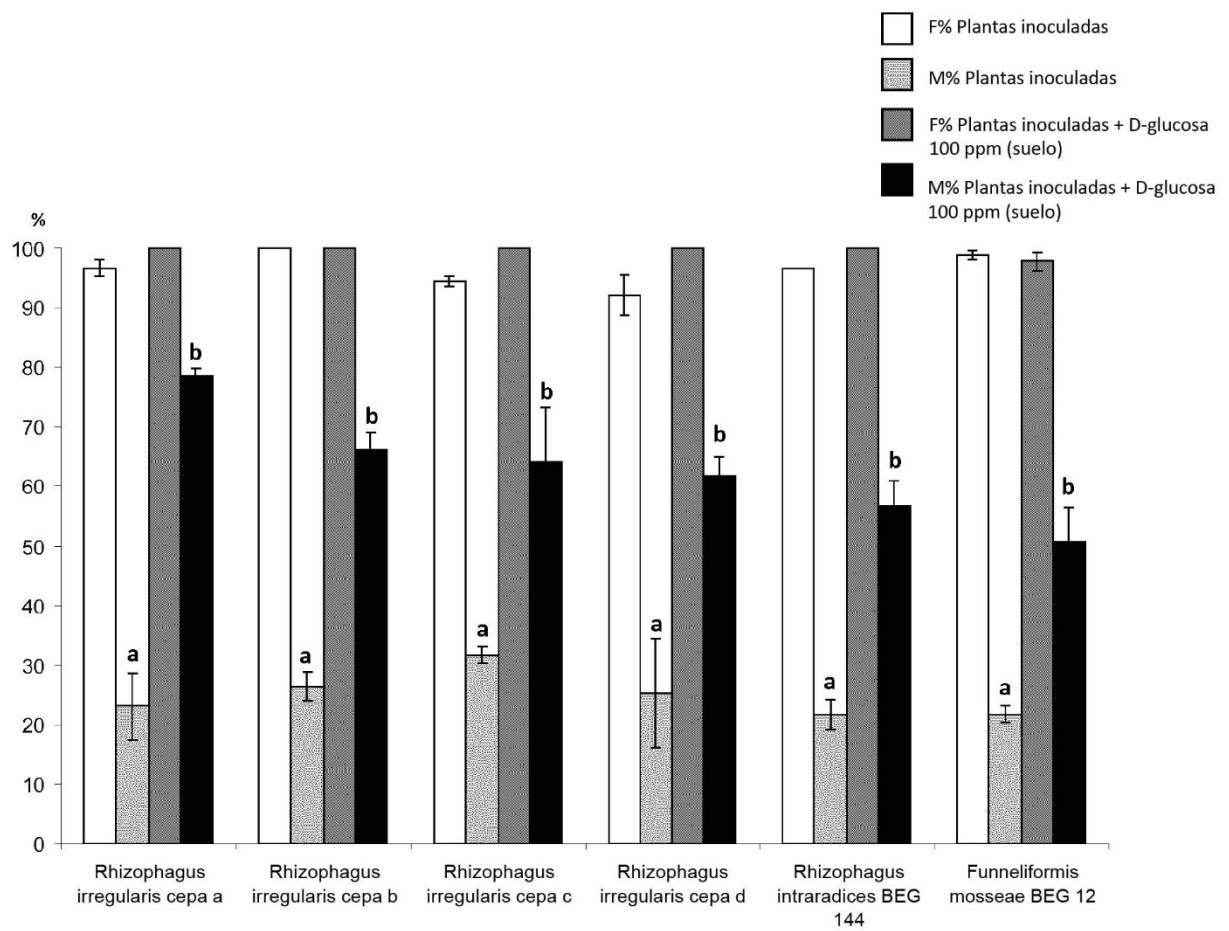


Figura 3

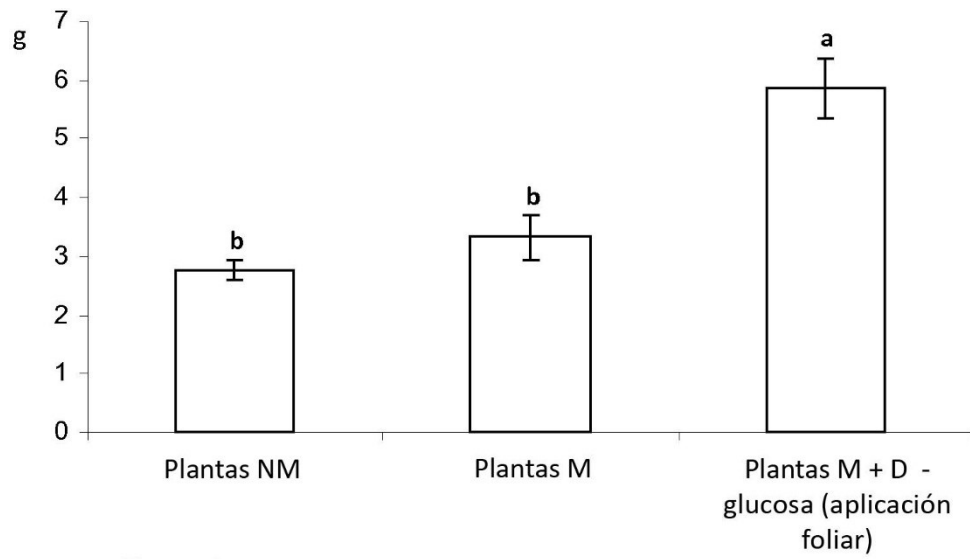


Figura 4

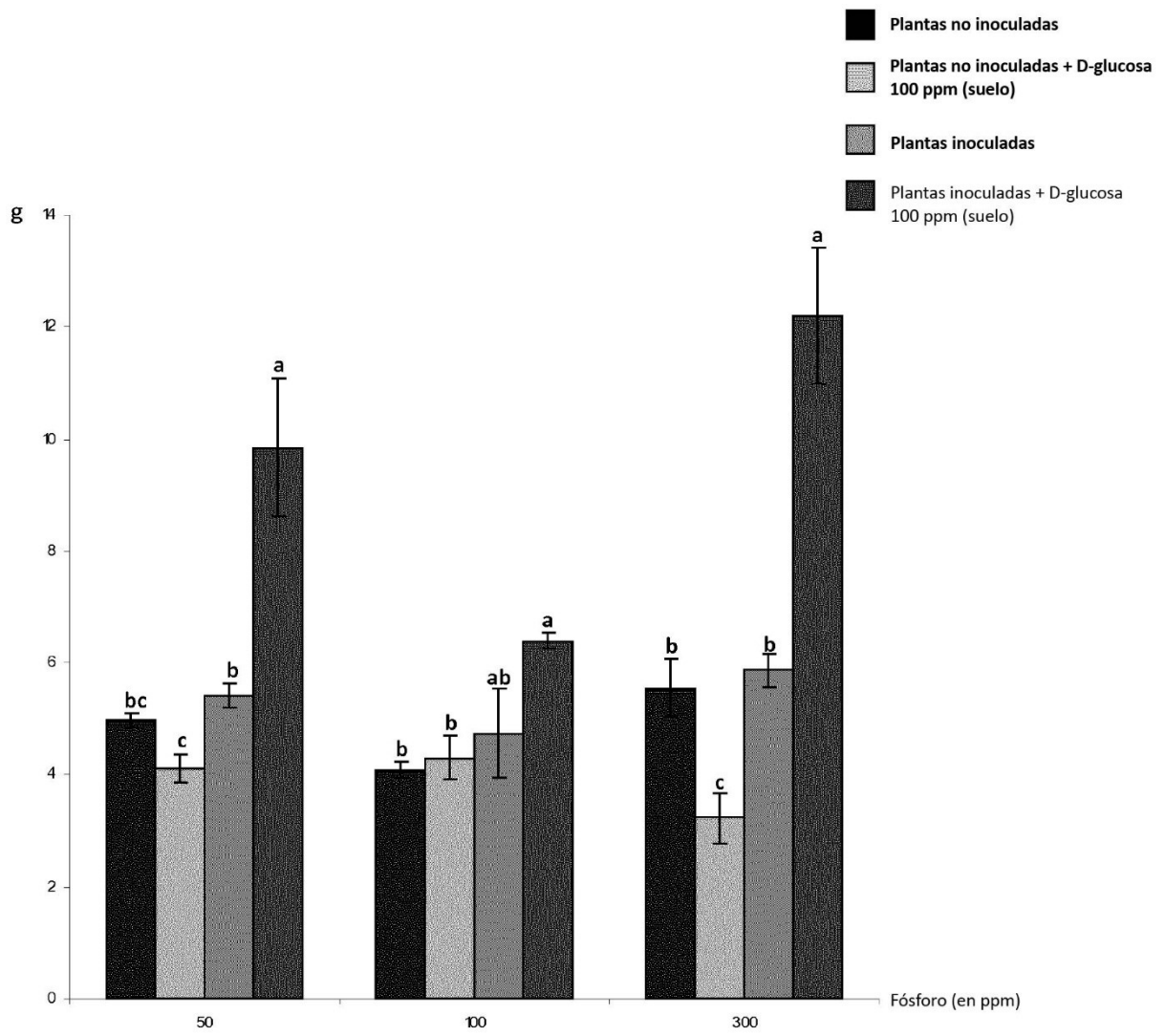


Figura 5