



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 343 235**

② Número de solicitud: 200900194

⑤ Int. Cl.:

C12N 1/14 (2006.01)

A01G 1/04 (2006.01)

A01N 63/04 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **23.01.2009**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **26.07.2010**

Fecha de la concesión: **31.05.2011**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **10.06.2011**

⑯ Fecha de publicación del folleto de la patente:
10.06.2011

⑰ Titular/es: **Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CISC)**
c/ Serrano, 117
28006 Madrid, ES

⑱ Inventor/es: **Bago Pastor, Alberto y**
Cano Romero, Custodia Purificación

⑳ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

㉑ Título: **Hongo formador de micorrizas arbusculares y su uso para estimular el crecimiento de plantas.**

㉒ Resumen:

Hongo formador de micorrizas arbusculares y su uso para estimular el crecimiento de plantas.

La presente invención se encuentra dentro del campo de la recuperación de áreas degradadas, revegetación, producción de inoculantes micorrícicos y biofertilizantes, agricultura ecológica y producción viverística. Se refiere a un nuevo hongo micorrícico arbuscular (HMA) que establece simbiosis micorrícica con la mayoría de plantas de interés económico y ecológico (horto-frutícolas, ornamentales, utilizadas para revegetación, etc.) y que aumenta su supervivencia, vitalidad y producción, especialmente en condiciones de altas concentraciones de metales pesados y otros xenobióticos, y reduce la necesidad de aplicación de fertilizantes químicos, pesticidas y fitosanitarios.

ES 2 343 235 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Hongo formador de micorrizas arbusculares y su uso para estimular el crecimiento de plantas.

5 La presente invención se encuentra dentro del campo de la recuperación de áreas degradadas, revegetación, producción de inoculantes micorrícicos y biofertilizantes, agricultura ecológica y producción viverística. Se refiere a un nuevo hongo micorrícico arbuscular (HMA) que establece simbiosis micorrícica con la mayoría de plantas de interés económico y ecológico (horto-frutícolas, ornamentales, utilizadas para revegetación, etc.) y que aumenta su supervivencia, vitalidad y producción, especialmente en condiciones de altas concentraciones de metales pesados y otros xenobióticos, y reduce la necesidad de aplicación de fertilizantes químicos, pesticidas y fitosanitarios.

Estado de la técnica

15 Las micorrizas arbusculares, una de las simbiosis más ampliamente extendidas en el mundo, aparecen en un amplio rango de hábitats, desde ecosistemas templados hasta los que soportan las condiciones más extremas, como las selvas tropicales o suelos antárticos. Los hongos implicados en esta interacción micorrícica pertenecen al recientemente descrito taxon *Glomeromycota* (Schussler *et al.*, 2001. *Mycol. Res.* 105:1413-1421), que incluye menos de 200 especies descritas, distribuidas por todo el mundo. Los beneficios que los hongos formadores de micorrizas arbusculares (HMA) reportan al sistema suelo-planta han sido de sobra contrastados y descritos, de manera que su uso potencial como biofertilizantes ecológicos y herramientas útiles en programas de biorremediación y recuperación de áreas contaminadas y/o degradadas está ampliamente aceptado. Aumentan la superficie absorbente del sistema radicular y mejoran las propiedades físicas de los suelos mediante la formación de agregados estables. A su vez, la glomalina, una glicoproteína específica de estos hongos, acelera los procesos de formación de micro agregados estables en el suelo, mejorando así su estructura física, incrementando los niveles de oxígeno, y facilitando una mejor colonización del organismo. De hecho se han obtenido buenos resultados utilizando los HMA para recuperar suelos desertificados, áreas naturales afectadas por estreses hídricos o salinos y, en particular, áreas contaminadas naturalmente o bien por la mano del hombre con metales pesados (Vivas *et al.*, 2003. *Env. Pollution* 126:179-189).

30 Es conocido que, de forma general, la presión evolutiva que se produce sobre los organismos que habitan en condiciones extremas origina la adquisición de caracteres particulares por parte de estos, muchos de ellos adecuados para la supervivencia en dichos medios. Un área natural que puede ser considerada como paradigmática como ecosistema degradado por efecto natural y antropogénico es la cuenca minera del Río Tinto (Huelva, España). Este río discurre por más de 90 km a través de un cinturón pirítico que confiere a sus aguas un pH de 2, elevadísimas concentraciones de Fe (2 g/l), Mg (1.3 g/l), Cu (390 mg/l), Zn (280 mg/l) y Mn (100 mg/l) entre otros metales pesados, de los que proviene su color rojo. A pesar de estas condiciones extremas, las aguas del Río Tinto contienen una sorprendentemente elevada diversidad microbiana que consisten no sólo en bacterias, sino también organismos eucarióticos como algas, amebas y hongos (entre otros).

40 Son muy pocas las plantas capaces de crecer en determinadas condiciones adversas, como suelos degradados, contaminados por el hombre o regados/afectados por aguas altamente contaminadas por metales pesados, suelos con elevado contenido en carbonatos, etc., dificultando la implantación de sistemas de biorremediación en estos suelos. La adición de hongos formadores de micorrizas arbusculares capaces de establecer simbiosis con plantas en suelos con estas características, como se ha dicho, aumentaría la superficie absorbente del sistema radicular de las plantas y mejoraría las propiedades físicas de los suelos mediante la formación de agregados estables, facilitando su biorremediación así como la presencia de una cubierta vegetal estable y autóctona que mejorase globalmente estos ecosistemas dañados.

Descripción detallada de la invención

50 Los autores de la presente invención han aislado y puesto en cultivo *in Vitro* continuo un nuevo hongo formador de micorrizas arbusculares (HMA) de los banales del Río Tinto (Huelva, España). Los autores han realizado ensayos que demuestran que el establecimiento de la simbiosis micorrícica entre este nuevo hongo y diversas plantas confiere protección especial a éstas cuando crecen en condiciones adversas, tales como suelos regados por aguas altamente contaminadas por metales pesados, suelos con elevado contenido en carbonatos, o en condiciones de producción viverística. Esta protección se muestra especialmente en un incremento importante de la supervivencia de estas plantas en esas condiciones, además de notables efectos positivos sobre su crecimiento y desarrollo.

60 La presente invención describe una nueva especie de HMA (hongos micorrícicos arbusculares) al que le ha sido asignado el código MUCL 51732, en el Belgian Co-ordinated Collection of Microorganisms (BCCMTM). Esta nueva especie ha sido caracterizada taxonómicamente por una combinación de técnicas morfológicas y moleculares.

65 Muchas plantas presentan micorrizas para aumentar la absorción de agua y sales minerales del suelo. Las micorrizas son la asociación entre raíces de una planta y el micelio de un hongo, de forma que toda la extensión del micelio participa en la absorción de nutrientes para la planta. En la Naturaleza esta simbiosis se produce espontáneamente. Se estima que entre el 90 y el 95% de las plantas superiores presentan micorrizas de forma habitual.

Es posible que un mismo hongo forme la micorriza con más de una planta a la vez, estableciéndose de este modo una conexión entre plantas distintas; esto facilita la existencia de plantas parásitas, que extraen todo lo que necesitan

ES 2 343 235 B1

del hongo micobionte y las otras plantas con las que éste también establece simbiosis. Así mismo, varios hongos (en ocasiones de especies diferentes) pueden micorrizar una misma planta al mismo tiempo.

5 El hongo de la presente invención es del género *Glomus* que pertenece al Superreino *Eukaryota*, (grupo *Metazoa/Fungi*), Reino *Fungi*, Phylum *Glomeromycota*, Clase *Glomeromycetes*, Orden *Glomerales*, Familia *Glomeraceae*.

10 Por tanto, un primer aspecto de la invención se refiere a un hongo del género *Glomus*, depositado bajo el Tratado de Budapest en el *Belgian Co-ordinated Collection of Microorganisms* (BCCMTM), con el código MUCL 51732. A partir de ahora, hongo objeto de la invención.

Otro aspecto de la invención se refiere a una espora o una hifa del hongo de la invención a partir de las cuales se generaría dicho hongo. A partir de ahora, esporas o hifas de la invención.

15 Entendiéndose por espora una célula reproductiva del hongo que emitir un tubo germinativo y micorrizar plantas hasta reproducirse y las hifas, los filamentos que, reunidos, forman el micelio del hongo. Una hifa típica micorrízica consiste en un filamento cilíndrico, ya sea intraradical o extraradical, constituido por un plasmalema cenocítico (típicamente aseptado en la mayor parte de su ciclo vital) multinucleado envuelto en una pared celular de quitina que puede dar origen a diversas estructuras intraradicales (arbusculos, ovillos arbusculados, ovillos, vesículas) o extraradicales (estructuras ramificadas de absorción ligadas o no a esporas, etc.).

20 El hongo objeto de la invención produce una fuerte colonización arbuscular que comienza con la entrada de una hifa guía en la raíz, formando un grueso apresorio.

25 El apresorio corresponde a una estructura plana, como un bulbo, que se forma cuando la hifa establece el contacto con la superficie e incrementa su diámetro, aumentando la zona de unión entre los dos organismos, lo cual permite que el patógeno se una con mayor firmeza a la planta.

Otro aspecto de la invención se refiere a una célula de la raíz de una planta que comprende el hongo de la invención, así como o raíz micorrizada de dicha planta.

30 Otro aspecto de la invención se refiere a una composición que comprende el hongo, la espora o la hifa de la invención. Dicha composición opcionalmente comprende, al menos, otro microorganismo, preferiblemente otro hongo micorrízico arbuscular (HMA) y más preferiblemente del género *Glomus*. Además, esta composición puede incluir aditivos o nutrientes así como otros compuestos seleccionados de entre fertilizantes orgánicos o inorgánicos, insecticidas, nematicidas o bactericidas o agentes de promoción del crecimiento, la nutrición o la protección de las plantas, cualquiera que sea su origen.

40 Esta composición, serviría como inoculante, o medio de micorrización. Por ejemplo, la composición podría ser un inoculante micorrízico líquido, tipo gel o sólido que, además del hongo de la invención, bien como esporas de resistencia, como micelio extraradical arbuscular, raíces micorrizadas o como todos ellos, comprendiera otras sustancias utilizadas de forma común en el cultivo de hongos HMA.

45 Por otro lado, bien la composición, bien el hongo, esporas, hifas o raíces micorrizadas de la invención pueden ser útiles para la formación de un sustrato, o cualquier material usado como soporte para cultivar plantas o germinar semillas. Por tanto, otro aspecto de la presente invención se refiere a un sustrato que comprende la composición, el hongo, esporas, hifas o raíces micorrizadas de la invención así como cualquier soporte útil en el cultivo o germinación, que se puede seleccionar de la lista que comprende, pero sin limitarse, turba, arena, perlita, vermiculita, sepiolita, minerales de arcilla, fibra de coco, corteza de pino o cualquiera de sus combinaciones.

50 El objeto de la presente invención es asimismo la utilización de esta nueva especie de HMA tanto sólo, como en combinación con otros microorganismos cualesquiera, en formulados a base de micorrizas para su posterior aplicación como biofertilizantes, inoculantes, enmendantes, recuperadores de suelos, fitofortificantes, etc.

55 Es objeto de la presente invención el uso en solitario o en combinaciones cualesquiera con otro material químico o biológico de la nueva especie de HMA para su uso como biofertilizante micorrízico, bioenmendante, recuperación de áreas degradadas, remediación de suelo o de aguas, producción agrícola, viverística, adyuvante para la supervivencia de plantas en condiciones de estrés oxidativo y especialmente en presencia de metales pesados, contaminación química, petrolífera, etc.

60 Constituye otro objeto de la presente invención el cultivo, propagación y producción del HMA, en cualquier tipo de medio de cultivo o biofilm, ya sean éste aséptico o no, químico o físico, o su utilización en cualquier tipo de soporte con fines biológicos, fisiológicos, químicos, físicos o ecológicos.

65 El HMA objeto de la invención se puede utilizar para su inclusión en semilleros, alvéolos, macetas, contenedores, o cualquier otro sistema similar conocido por un experto en la materia, en los que se vayan a cultivar cualquier tipo de planta, preferentemente en sus estadios más juveniles. También puede utilizarse de manera extensiva para la recuperación de suelos o áreas degradadas por actividad antropopogénica, especialmente como consecuencia de actividad minera, industrial, petrolífera, pero también como consecuencia de explanaciones de terrenos (obras civiles, taludes de

ES 2 343 235 B1

carreteras y vías ferroviarias, estaciones de esquí, parques temáticos, etc.) y obras de jardinería pública o privada. Su aplicación se puede llevar a cabo mediante la aplicación de alícuotas individualizadas de inoculante al sustrato donde se coloca la semilla o el plantón de vivero, siendo dicho sustrato cualquiera de los utilizados habitualmente en los viveros, por ejemplo turba, arena, suelo, vermiculita, perlita, sepiolita, terragreen, minerales de la arcilla y sus derivados, y las mezclas de dichos sustratos en proporciones variables; o bien mediante la breve inmersión de las raíces y/o de las semillas de las plantas en él antes de su trasplante al semillero. El HMA objeto de la invención también se puede aplicar a gran escala mediante su distribución por agua de riego o mediante camiones cuba, hidrosiembra o cualquier forma de implantación similar.

Por todo lo anterior, un aspecto de la presente invención se refiere al uso de la composición de la invención para su aplicación a un sustrato de cultivo, al agua de riego, a raíces y/o a semillas así como para estimular el crecimiento de una planta o parte de una planta, para proteger dicha planta del ataque de patógenos y/o para la recuperación de suelos o áreas degradadas. Preferiblemente suelos con altas concentraciones de metales pesados.

Es de reseñar que como plantas susceptibles de ser micorrizadas por el HMA objeto de la invención se encuentran (pero no se limitan a): plantas leñosas, arbustivas, de interés hortofrutícola, ornamentales, flores, vid, plantas aromáticas, plantas medicinales, cultivos tropicales y subtropicales, cereales, leguminosas, forrajeras o plantas silvestres.

Preferiblemente el hongo objeto de la invención estimula el crecimiento, la nutrición, la supervivencia, la resistencia a diferentes estreses abióticos y el desarrollo eco-fisiológico en la inmensa mayoría de los miembros de todas las familias de plantas terrestres.

Preferiblemente las plantas en las que se estimula el crecimiento a partir del uso del hongo de la invención, pertenecen a la Familia *Leguminosae*, *Compositae*, *Boraginaceae*, *Cistaceae*, *Alliaceae*, *Apiaceae* o *Graminaceae*.

Si la planta pertenece a la Familia *Leguminosae*, esta se selecciona, pero sin limitarse, de entre los géneros *Cicer*, *Vicia*, *Pisum*, *Lens*, *Phaseolus*, *Glycine*, *Trifolium*, *Medicago*, *Lotus* o *Sophora*. Si la planta pertenece a la Familia *Compositae*, esta se selecciona, pero sin limitarse, de entre los géneros *Chamaemelum*, *Carduus* o *Chrysanthemum*. Y por último, si pertenece a la Familia *Boraginaceae*, *Cistaceae*, *Alliaceae*, *Apiaceae* o *Graminaceae*, la planta es preferiblemente del género *Echium*, *Cistus*, *Allium*, *Daucus* y *Avena*, respectivamente.

La utilización del HMA objeto de la invención en las formas arriba indicadas promueve el establecimiento temprano de la simbiosis micorrícica arbuscular, con el consiguiente beneficio en términos de viabilidad, supervivencia, resistencia a estreses bióticos y abióticos, mejora nutricional, adaptabilidad, productividad, etc. que presentan las plantas micorrizadas con respecto a las que no lo están. Además favorece la recuperación del equilibrio del suelo, de sus características físico-químicas, de su biodiversidad y de los ciclos bio-geodinámicos. Todo lo anterior conlleva la más rápida y mejor reimplantación de la cubierta vegetal en las zonas tratadas con el HMA objeto de la invención, favoreciendo su recuperación. Asimismo el HMA colabora en el secuestro o retención de elementos químicos potencialmente nocivos para la salud de las plantas, animales, microorganismos beneficiosos y medio ambiente.

El HMA objeto de la invención se puede aplicar así mismo como potenciador del reestablecimiento (recuperación y restauración) de la cubierta vegetal de suelos degradados, y para la revegetación de zonas alteradas sometidas a estreses bióticos y abióticos. En este sentido los suelos a revegetar pueden ser, entre otros, taludes de carreteras, zonas mineras, zonas quemadas, zonas desertificadas, suelos contaminados, suelos infestados, suelos degradados por exceso de sales, suelos calcáreos, suelos de pH extremos, etc. La inoculación de plantas con aislados HMA originarios de los suelos a recuperar, y su reintroducción en esos mismos suelos, asegura el mantenimiento de la biodiversidad de los mismos, así como de sus condiciones físico-químicas, favoreciendo la reinstauración de la cubierta vegetal propia del área en cuestión.

Asimismo, constituye otro aspecto de la presente invención los procedimientos de micorrización, *in vitro* (plantas micropropagadas durante o inmediatamente después de su fase de enraizamiento, y antes de la fase de aclimatación) y *ex vitro* (plantas micropropagadas durante la fase de aclimatación, y semilleros, alvéolos, plantones, plantas de vivero o cualquier otra planta obtenible a partir de técnicas convencionales), que utilicen el hongo objeto de la presente invención. Es decir, desarrollar una planta (o células de una planta) en una solución de cultivo que contiene el hongo de la invención, o a la que se aplique el hongo objeto de la invención en cualquiera de sus estadios de desarrollo.

Aunque la adición de hongos formadores de micorrizas arbusculares capaces de establecer simbiosis con plantas se haya utilizado con anterioridad con los mismos propósitos, lo que se demuestra en los ejemplos y figuras que se adjuntan a continuación es que el hongo objeto de la invención presenta resultados claramente sorprendentes al compararlo con otros hongos del mismo género y de gran similitud (ver tabla 1). Por ejemplo, al comparar los resultados obtenidos tras la inoculación de plantas con el hongo objeto de la invención así como con *G. intraradices* MUCL43194, una cepa cuya secuencia SSU presenta un 99.8% de similitud con la secuencia SSU (SEQ ID NO:1) del hongo de la invención, se demuestra que el hongo objeto de la invención en condiciones adversas (e.g. riego con agua conteniendo elevadas concentraciones de metales pesados y otros xenobióticos) incrementa significativamente la supervivencia de las plantas con respecto a los otros HMA que no están adaptados a dichas condiciones extremas.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas

y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

5 Explicación de las figuras

Fig. 1: Microscopía óptica y electrónica de esporas juveniles del hongo objeto de la invención cultivado en condiciones *in vitro*. 1.1 grupo de dos esporas con hifas de sustentación. Barra de escala=20 μm ; 1.2., separación de la pared celular de la espora en las capas sw1, sw2 y sw3. Barra de escala=20 μm ; 1.3. vista de las tres capas sw a microscopio electrónico. Barra de escala=0.5 μm ; 1.4., esporas deformes pero perfectamente viables formadas por el hongo objeto de la invención en reactivo de Melzer. Barra de escala=50 μm ; 1.5, detalle de espora deforme. Barra de escala=20 μm ; 1.6., detalle de espora deforme en que se distinguen perfectamente sus capas sw. Barra de escala=20 μm .

Fig. 2: Microscopía óptica y electrónica de esporas maduras del hongo objeto de la invención cultivado en condiciones *in vitro*. 2.7., espora con hifa de sustentación. Barra de escala=20 μm ; 2.8. a 2.10., arquitectura de la pared esporal. Barra de escala=20 μm ; 2.11., ultraestructura de la pared esporal a microscopía electrónica de transmisión. Barra de escala=1.

Fig. 3. Fotomicrografías de la colonización intrarradical de raíces de zanahoria (*Daucus carota L.*, clon DC2) creciendo en cultivo *in Vitro* (monoxénico) con el hongo objeto de la invención (a-d) y del crecimiento extrarradical de éste (e-h). a, puntos de entrada y vesículas, b, colonización arbuscular masiva, c, detalle de hifa con vesículas intrarradicales. d, detalle de ovillos arbusculados.

Fig. 4 y 5. Árboles filogenéticos en los que se comparan el resultado del análisis SSU del hongo objeto de la invención con las secuencias publicadas de otros miembros de la familia *Glomeraceae*.

Fig. 6. Huellas genéticas del hongo objeto de la invención y de otros miembros de referencia de la familia *Glomeraceae* obtenidas por rep-PCR y su comparación electroforética.

Fig. 7. Diferentes imágenes comparativas del crecimiento de plantas en distintos suelos en el que se muestran las propiedades del hongo objeto de la invención (H) con respecto el hongo *G. intraradices*.

- (a) suelos naturales contaminados (ver tabla 2)
- (b) control, plantas no inoculadas.
- (c) Plantas inoculadas con el hongo de la invención (H)
- (d) Plantas inoculadas con el hongo *G. intraradices*.

Fig. 8. Gráfica comparativa de los resultados de supervivencia y crecimiento obtenidos en el Experimento 2.

El eje de las Y representa el peso medio seco de las plantas en gramos (g)

H representa el hongo de la invención

Ejemplos de realización de la invención

Con el fin de comprobar los efectos del objeto de la invención descrito anteriormente, se realizaron diversas pruebas aplicando el inoculante sobre semillas y plantas micropropagadas en condiciones *in vitro* y *ex vitro*. Los resultados se muestran en los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1

55 Análisis morfológico

Materiales y Métodos

Se aislaron esporas (de una muestra de suelo) y micelio extrarradical (ERM) de todos los estadios de desarrollo del hongo propagado *in vitro*, y esporas maduras fueron recuperadas de cultivo de macetas (cultivo *ex vitro*). El material fúngico fue montado en portas con alcohol polivinílico/ácido láctico/glicerol (PVLG) y también con una mezcla de PVLG y reactivo de Melzer (1:1, v/v). Las esporas (tanto intactas como aplastadas) fueron observadas con un microscopio Nikon Eclipse 800 equipado con óptica de contraste de fases Normarski. Se tomaron microfotografías con una cámara Nikon Coolpix 4500. Se siguió la terminología de las esporas de Walker (1983) (Walker, 1983. *Mycotaxon* 18: 443-455) y Stürmer & Morton (1997) (Stürmer y Morton, 1997. *Mycologia* 89, 72-81). Las observaciones de color se hicieron en base al código de cuadro de colores del International Culture Collection of Arbuscular and vesicular-arbuscular mycorrhizal Fungí (INVAM).

ES 2 343 235 B1

Para la microscopía electrónica de transmisión (TEM) las esporas se trataron con un buffer fosfato al 0.2M con 2,8% de glutaraldehído, y 1.5% de p-formaldehído a 4°C durante 18 horas, lavadas y centrifugadas en agua doblemente destilada, post-fijadas en un 2% de ácido ósmico acuoso, deshidratadas, teñidas con acetato de uranilo, y embebidas en LRWhite (London Resin Company Ltd.). Se montaron secciones ultrafinas en parrillas y se observaron en un microscopio electrónico Zeiss EM902 a 80 kv.

Resultados (Descripción morfológica) Fig. 1 y 2:

Los hongos de la presente invención tienen esporocarpo ignoto, esporas aisladas o en agregados lábiles de 2 a 5 esporas, producidas distal o intercaladamente a lo largo de las ramificaciones de las hifas, la hifa distal rápidamente septada y colapsada, diferenciadas en su producción intra o extraradical. Las esporas juveniles (cultivos *in vitro* de 4 meses, Fig. 1) son hialinas a amarillo pálido, globosas, de 42-90 μm de diámetro, ovoides a piriformes, 62-67 - 72-77 μm de diámetro, de superficie lisa. La pared de las esporas jóvenes constituye una única pared con tres capas detectables con un grosor total de 2.0-4.8 μm . La pared externa (sw1) es hialina, de 0.5-1.0 μm de grosor, mucilaginosa, evanescente, débilmente reactiva al reactivo de Melzer; la capa intermedia (sw2) es hialina, de 1.0-1.5 μm de grosor, rígida, a veces doble, distinguible pero no fácilmente diferenciable de la capa 1, y no reacciona frente al reactivo de Melzer; la pared interna (sw3) es hialina a amarillo pálido, 1.6-2.8 μm de grosor, laminada con una débil ordenación de las láminas, no reactiva frente a Melzer.

La hifa de sustentación de las esporas jóvenes persiste en la espора, y es recta a ligeramente acampanada, de 6.4- (9.6-14.4) μm de diámetro en la base de la espора. El poro está abierto, de 6.4 a 7.2 μm . Las paredes de la hifa de sustentación son continuas con la pared de la espора, y de 3.6 - 4.8 μm de grosor en el punto de unión con la espора, decreciendo a 1.5 - 2.0 μm de grosor a las 30-35 μm desde la espора. La pared externa (sw1) adelgaza en rápidamente, entre 5-10 μm desde la hifa de sustentación, mientras que las paredes media e interna (sw 2-3) se detectan hasta 30 μm desde la espора. Las esporas maduras extrarradicales (cultivos *in vitro* y *ex vitro* de 12 meses) son de amarillas pálidas (0/0/60/0), a amarillas-pardas (0/30/100/0), globosas a subglobosas, de 110-172 μm de diámetro (tamaño medio 125-140 μm), ovoides a elipsoides, a veces amigdalazas a tuberculadas, de 72-91 x 104-124 μm de tamaño.

Las paredes de las esporas maduras (Fig. 2) están hechas de 5 capas en tres grupos: el grupo 1 lo constituyen las capas sw 1-2, con la capa externa (sw 1) hialina, mucilaginosa, evanescente, de grosor irregular (0.8-2.5 μm de grosor), rojiza al reactivo de Melzer, siempre presente en esporas obtenidas *in vitro*, generalmente ausente o mucho más delgada en esporas obtenidas *ex vitro*. La capa sw2 es hialina a amarilla (0/0/60/0), rígida, de 1.6 - 2.9 μm de grosor, con la superficie externa lisa y la superficie interna ocasionalmente granular según se observa en esporas cultivadas *ex vitro*, ninguna de ellas reactiva al reactivo de Melzer, y fácilmente separables de la sw1. El grupo 2 lo constituyen la capa sw3, que es hialina, rígida, de superficie lisa, 1.5-2.8 μm de grosor, que se rompe en piezas poligonales cuando se le aplica presión y no reactiva al Melzer. El grupo 3 está constituido por las capas sw 4-5, siendo la sw 4 amarilla (0/10/80/0) a amarilla-parda (0/30/100/0), laminada, de superficie lisa y 2.6-4.8 μm de grosor, muy reactiva al Melzer; y la sw 5 hialina, semi-rígida a flexible, de superficie lisa, y de 0.8 - 1.0 μm de grosor, no fácilmente separable de la capa 4 y no reactiva al Melzer.

Las capas de la pared de las esporas con formas irregulares están hechas de 3 capas detectables similares a las de las esporas juveniles. La hifa de sustentación de las esporas maduras es cilíndrica, de 9.6-12.8 μm de diámetro en la espора, o ligeramente acampanada de 12.8-14.4 μm de diámetro, de igual color que la espора. La pared de las hifas de sustentación tiene un grosor de 3.2-4.8 μm al nivel del poro y está hecha de las capas de la pared esporal con la excepción de la capa sw5 que permaneció indetectable y sw1 que decrecía en grosor entre los primeros 5-10 μm desde la espора. Poro abierto de 1.5-2.6 μm de diámetro, ocasionalmente cerrado por el engrasamiento de las paredes de la hifa de sustentación, raramente cerrado por un septo curvo al nivel del poro provocado por la capa sw5. Esporóforo único, de 35 a 300 μm de longitud, 6.5-12.0 μm de anchura con la pared en continuidad directa con la de las hifas exploradoras. Las esporas intrarradicales se diferencian en grupos laxos que deforman los tejidos de la raíz y modifican las capas epidérmicas hasta su liberación desde la raíz. Las esporas juveniles son amarillas pálidas a amarillas doradas de 68-74 μm de diámetro; las esporas maduras son amarillas a amarillas pardas, globosas a subglobosas, de 100-156 μm de diámetro, nunca ovoides, amigdaloides o tuberculadas. Esporas juveniles o maduras pueden producirse en el mismo segmento de raíz y ser encontradas en los mismos grupos de esporas. La pared esporal, hifa de sustentación y red de hifas de las esporas intrarradicales juveniles o maduras son similares a las descritas para las esporas extrarradicales.

Estado micorrízico: El hongo objeto de la invención produce una fuerte colonización arbuscular que comienza con la entrada de una hifa guía en la raíz, formando un grueso apresorio. La colonización intraradical recuerda a la micorriza de tipo Paris. Los arbusculos se forman a menudo de célula a célula, y no son frecuentes las hifas intercelulares o están ausentes (Fig. 3a y c). Los arbusculos son bastante especiales, recordando más a ovillos arbusculares ("arbusculate cols") (Fig. 3b y d), y recordando a los formados por *G. mosseae* más que a los formados por *G. intrarradices*. Las vesículas no son frecuentes, aunque se encuentran a veces en bajo número. Tienen forma de pera y se forman intercelularmente, tiñéndose más débilmente que las esporas cuando se tiñe con azul de tripán.

Asociación micorrízica: en el campo, el hongo objeto de la invención ha sido aislado de la rizosfera de un consorcio de plantas pertenecientes principalmente a las familias Compositae (*Chamaemelum sp.*, *Carduus sp.*, *Chrysanthemum sp.*), pero que también incluía plantas de las familias Boraginaceae (*Echium sp.*), Cistaceae (*Cistus sp.*) y Graminaeae (*Avena sp.*). Tras seis semanas en cultivo monoxénico utilizando el medio mínimo "M" (Chabot *et al.*, 1992.

Mycologia 84(3):315-321) con raíz de zanahoria transformada (*Daucus carota* L., clon DC-2) la colonización media de las raíces fue del 42.0% (21.8 s.d.) (Fig. 3). En cultivo de macetas (cultivo *ex vitro*) en invernadero junto con diferentes hospedadores como *Allium porrum* L., y *Trifolium sp.* la colonización micorrícica media de las raíces fue de un 50-80%.

5

Ejemplo 2

Análisis molecular del hongo objeto de la invención

10

Material y métodos

Análisis por PCR de la región 18S del ADN: Se muestrearon aproximadamente 1000 esporas a partir de cultivo monoxénico, disolviendo el medio de cultivo de acuerdo con el método de Doner y Bécard (1991) (Doner y Bécard (1991). *Biotechnology Techniques* 5: 25-28). La extracción de ADN se llevó a cabo siguiendo un protocolo que utiliza el buffer de extracción CTAB, extracción de proteínas con fenol-cloroformo y precipitación con isopropanol. El ADN fue resuspendido en 50 μ L de buffer TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5).

Las reacciones PCR se llevaron a cabo con 1/10 del extracto de ADN. Los siguientes reactivos fueron adicionados: 20 1x PCR buffer (20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, Invitrogen, USA), 1.5 mM MgCl₂, 0.2 μ M de cada rADN primer, 200 μ M de cada dNTP (Finnzymes Oy, Finland), 2.5 unidades de Taq ADN polymerase (Invitrogen, USA). Los dos primers usados fueron VANs1 (Simon *et al.*, 1993. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 4211-4215) y NS8 (White *et al.*, 1990. In: PCR protocols: a guide to methods and applications. Part 3. Academic Press, Inc. 315-322). La amplificación fue llevada a cabo en una máquina PTC200 DNA (MJ Research, USA) bajo el siguiente protocolo: una primera etapa de desnaturalización a 94°C durante 5 min., seguido de 40 ciclos a 94°C durante 30 s., 55°C durante 1 min. y 72°C durante 2 min. La amplificación terminaba con un paso final de elongación a 72°C durante 10 min.

El producto PCR fue clonado en *Escherichia coli* utilizando el sistema de clonado Gateway (Invitrogen, USA) y secuenciado usando el kit de secuenciación "DYEnamic ET terminador cycling" (cat n° US 810 50, Amersham Pharmacia Biotech, GB). Los clones fueron secuenciados utilizando los siguientes primers: NS1, NS2, NS3, NS4, NS5, NS6, NS7, NS8 (White *et al.*, 1990. In: PCR protocols: a guide to methods and applications. Part 3. Academic Press, Inc. 315-322). Las secuencias fueron analizadas con un secuenciador automático (CEQ™ 2000 XL DNA analysis system, Beckam Coulter Inc., USA), editadas con Sequencher v.4.1.4 (Gene Code Corporation, Ann Arbor, MI), alineadas con Clustal X 1.5 (Thompson *et al.*, 1997. *Nucleic Acids Research*, 25:4876-4882) y corregidas manualmente.

Para completar el análisis las secuencias SSU obtenidas fueron comparadas con el alineamiento (ALIGN_000124) utilizado por Schwarzott *et al.* (2001) (Schwarzott *et al.*, 2001. *Mol. Phylogen. Evol.* 21:190-197). Los árboles filogenéticos fueron obtenidos mediante análisis "neighbor joining" bajo la biparamétrica de Kimura en PAUP v.4.0b10 (Swofford, 2003. PAUP. Phylogenetic analysis using parsimony. Versión 10. Sinauer, Sunderland, MA). Los árboles fueron evaluados por análisis "bootstrap" (1000 repeticiones para "neighbor joining").

Análisis por rep-PCR: El ADN total fue extraído a partir de esporas obtenidas de cultivo monoxénico utilizando el kit FastDNA (Carlsbad, CA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante para material fúngico. La amplificación PCR fue ajustada para obtener un volumen final de 20 μ L. Se empleó con aproximadamente 1-10 ng del ADN de base utilizando los siguientes reactivos: tampón 1X Titanium Taq (BD Biosciences); 0.5 μ M del primer ERIC IR:1R (SEQ ID NO: 1); 21 (SEQ ID NO: 2) (Invitrogen); 2 mM de cada dNTPs (Invitrogen); 1X Titanium Taq mix (Ultratherm Taq DNA polymerase 250 μ ; BD Titanium Taq DNA polymerase 1:9). La amplificación se llevó a cabo en un termociclador de ADN (Mastercycler ep Gradient S) utilizando el siguiente protocolo: desnaturalización a 95°C durante 7 min, 35 ciclos a 94°C durante 3 s, 92°C durante 30 s, 50°C durante 1 min, 65°C durante 1 min 30 s, y una etapa de elongación a 65°C durante 8 min.

Resultados

55

Análisis por PCR de la región 18S del ADN: La secuencia obtenida para el hongo objeto de la invención por análisis PCR de la subunidad ribosomal 18S SEQ ID NO: 3. Las secuencias SSU de los clones seleccionados fueron insertadas en los alineamientos de genes SSU de hongos micorrícicos arbusculares publicados por Schwarzott *et al.* (2001) (Schwarzott *et al.*, 2001. *Mol. Phylogen. Evol.* 21:190-197). El árbol filogenético obtenido (Fig. 4 y 5) usando el análisis "neighbour joining" mostró que las secuencias del hongo objeto de la invención se agrupaba en el Grupo 1 de la familia *Glomeraceae* descrita por Schussler *et al.* (2001) (Schussler *et al.*, 2001. *Myc. Res.* 105, 1413-1421), y está próximamente relacionado con las secuencias de *G. intraradices* (Tabla 1): 99,6% de similitud con la secuencia de *G. intraradices* DAOM 197198 (que es un consenso de las secuencias con n° de acceso GeneBank AJ301859 y X58725) proveniente de esporas obtenidas *ex Vitro*; y 99,8 de similitud con *G. intraradices* MUCL 43194 AFTOL proveniente de esporas en cultivo *in Vitro* (Lutzoni *et al.*, 2004. *American Journal of Botany* 91(10): 1446-1480).

65

TABLA 1

Porcentaje de similitud con la secuencia SSU del hongo de la invención (H) con respecto a las secuencias SSU de diferentes especies de hongos pertenecientes a la familia *Glomeraceae*

Hongo (H)	Porcentaje de similitud
<i>G. intraradices</i> MUCL43194 AFTOL	99.8
<i>G. intraradices</i> DAOM197198	99.6
<i>G. fasciculatum</i> BEG 53	99.2
<i>G. proliferum</i> MUCL 41827	97.8
<i>G. manihotis</i> W3224	97.8
<i>G. vesiculiferum</i> L20824	97.6
<i>G. manihotis</i> FL879	97.5
<i>G. clarum</i> BR147B	97.2
<i>G. sinuosum</i> MD126	97.1
<i>G. coremoides</i> Biorize	96.7
<i>G. mosseae</i> BEG12	96.4
<i>G. claroideum</i> BEG 31	91.3
<i>S. castanea</i> BEG1	90.3

Análisis por rep-PCR

Las huellas genéticas obtenidas a partir de la comparación mediante rep-PCR entre el hongo objeto de la invención y cepas de referencia de *G. intraradices* Schenck & Smith, *G. clarum* Nicolson & Schenk y *G. claroideum* Schenck & Smith permitieron segregar el hongo objeto de la invención de las otras especies de *Glomus* ensayadas (Fig. 6a). Las huellas genéticas obtenidas revelaron que el perfil genético del hongo objeto de la invención difería considerablemente de las otras especies de *Glomus*, que compartían entre ellas la totalidad de las bandas expresadas (Fig. 6b).

Ejemplo 3

Ensayos de supervivencia de plantas en diversas condiciones de estrés

Material y métodos

Semillas de trébol (*Trifolium pretense* L., var. Violeta) fueron esterilizadas en superficie (lejía diluida al 5% con agua) y pregerminadas en vermiculita autoclavada (121°C, 20 min.). Tras una semana las plántulas fueron transferidas a macetas de 300 ml de volumen conteniendo bien suelo natural de las orillas del Río Tinto (a su paso por Nerva, Huelva, España) (Tabla 2) (Experimento 1), o bien suelo agrícola mezclado con arena de cuarzo (1 parte de suelo por 9 de arena v:v) tinalizado durante tres días consecutivos (Experimento 2). En ambos casos una tercera parte de las macetas fueron inoculadas con el hongo objeto de la invención, otra tercera parte con el hongo micorrízico de referencia *G. intraradices* DAOM197198, y la otra tercera parte fueron dejadas sin inocular (controles). Se prepararon ocho repeticiones por tratamiento. Las macetas del Experimento 1 se regaron tres veces en semana con agua corriente, mientras que las del Experimento 2 se regaron tres veces en semana con 0, 25, 50 y 100% de agua del Río Tinto diluida en su caso con agua corriente. En el Experimento 2 los riegos comenzaron una semana después del trasplante de las plántulas. Tres semanas tras el inicio del experimento se redujo el número de plantas por maceta para que quedasen 3 plántulas en cada una de ellas. Los dos experimentos (1 y 2) se mantuvieron en cámara de cultivo (24°/18°C día/noche, 12 horas de fotoperiodo) durante cuatro meses.

Pasado este tiempo la parte aérea de las plantas de cada tratamiento fue recolectada y su peso fresco anotado. Muestras de las raíces de cada tratamiento fueron evaluadas para constatar su colonización micorrízica de acuerdo con el método de tinción y recuento de Philips y Hayman.

ES 2 343 235 B1

TABLA 2

Composición del suelo de las orillas del Río Tinto y comparación con un suelo de la zona de Huelva no contaminado

Elemento	Suelo no contaminado	Suelo de las orillas del Río Tinto	Factor de contaminación
Cu (mg/Kg)	17	966	x 57
Pb (mg/Kg)	39	1105	x 28
Zn (mg/Kg)	21	380	x 18
Ca (g/Kg)	1.3	13.8	x 10
Fe (g/Kg)	14	116.6	x 8.3
Mn (mg/Kg)	242	1365	x 5.6
Mg (g/Kg)	1.5	7.9	x 5.3
Cd (mg/Kg)	Por debajo de los límites de detección	2.4	--

Resultados

Las plantas de trébol se desarrollaron inicialmente bien en ambos Experimentos. Sin embargo, seis semanas tras el inicio del ensayo ya se observaban diferencias claras entre los tratamientos. En el experimento 1 (suelo natural del Río Tinto) todas las plantas parecían saludables, pero las inoculadas con el objeto de la invención eran las mayores, mientras que las plantas control (no inoculadas) eran las mas pequeñas (Fig. 7a). En el experimento 2 (agua del Río Tinto) las plantas no inoculadas (control) eran mas pequeñas que las inoculadas, y dos meses después del inicio del experimento las que estaban siendo regadas con el 100% de agua del Río Tinto empezaron a morir (Fig. 7b, columna derecha de macetas). Para este tiempo las plantas inoculadas tanto con el objeto de la invención como por *G. intraradices* se desarrollaban aún correctamente (Fig. 7c, 7d) con las tratadas con el objeto de la invención y regadas con el 25% de agua del Río Tinto siendo las mayores; y las inoculadas con *G. intraradices* y regadas con el 100% del agua del Río Tinto siendo las menores y comenzando a mostrar algunos síntomas de toxicidad (Fig. 7d, inserto).

Transcurridos cuatro meses tras el inicio del ensayo no se observaban diferencias entre las plantas inoculadas o no en el experimento 1 (datos no mostrados), y sus pesos secos oscilaban entre 0,40 y 0,65 g. En este tiempo todas las plantas regadas con el 100% de agua del Río Tinto (Experimento 2) habían muerto (ya hubiesen sido inoculadas o no, Fig. 8, porcentajes en la parte superior de las columnas). Las plantas no inoculadas y aquellas inoculadas con el aislado no autóctono (*G. intrarradices*) que habían sido regadas con agua de Río Tinto al 50% habían muerto también; mientras que el 12,5% de las plantas inoculadas con el hongo autóctono (objeto de la invención) sobrevivieron (Fig. 8). Las tasas de supervivencia fueron 62,5% tanto para las plantas no inoculadas (control) y las inoculadas con *G. intraradices* que habían sido regadas con agua del Río Tinto al 50%, mientras que para las inoculadas con el objeto de la invención alcanzaron un 87,5% (Fig. 8). En el caso de las plantas regadas con el 0% de agua del Río Tinto (es decir, plantas regadas con agua corriente) todas las plantas inoculadas sobrevivieron, mientras que sólo el 87,5% de las plantas no inoculadas lo hicieron (Fig. 8).

Tras cosechar las plantas la colonización micorrícica de las raíces fue analizada (Tabla 3). Todas las plantas del experimento 1, ya fueran inoculadas o no, presentaban colonización por micorrizas arbusculares, sin que existiesen diferencias estadísticas en términos de colonización entre ellas. En el caso del experimento 2, las plantas control no presentaron colonización micorrícica. Las plantas inoculadas con *G. intraradices* o con el hongo objeto de la invención presentaron diferencias estadísticas en la colonización, con *G. intraradices* se mostró una mayor tasa de colonización que el hongo objeto de la invención en todos los casos. Es importante remarcar que el incremento en la concentración de agua del Río Tinto afectó muy negativamente la colonización del hongo no autóctono *G. intrarradices*. Por el contrario, la colonización micorrícica por el hongo autóctono objeto de la invención se mantuvo en todos los tratamientos. Las raíces de las plantas tratadas con el 100% del agua del Río Tinto en todos los tratamientos, así como aquellas tratadas con el 50% de agua del Río Tinto en los tratamientos control y *G. intraradices* fueron imposibles de analizar en cuanto a su colonización micorrícica debido a su importante estado de degradación.

ES 2 343 235 B1

No se encontraron diferencias estadísticas entre plantas inoculadas o no en el experimento 1 en lo que se refiere a peso seco al final del ensayo. Los resultados de los análisis de peso seco en el experimento 2 se muestran en la Fig. 8. Se obtuvieron diferencias significativas entre las plantas control y las inoculadas con ambos hongos micorrícicos en los tratamientos 0% y 25% del agua del Río Tinto. No hubo diferencias significativas entre las plantas inoculadas con *G. intraradices* o el hongo objeto de la invención, aunque estas últimas fueron ligeramente mas grandes. Las únicas plantas regadas con el 50% de agua del Río Tinto que fueron capaces de sobrevivir fueron las inoculadas con el hongo objeto de la invención; aún así permanecieron pequeñas y mostraron ciertos síntomas de toxicidad.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 343 235 B1

REIVINDICACIONES

1. Un hongo perteneciente a la cepa con número de depósito MUCL 51732.
- 5 2. Célula de raíz que comprende el hongo según la reivindicación 1.
3. Raíz micorrizada que comprende la célula según la reivindicación 2.
- 10 4. Una espora o una hifa del hongo según la reivindicación 1.
5. Composición que comprende el hongo según la reivindicación 1.
6. Composición según la reivindicación 5 que además comprende otro hongo micorriza arbuscular (HMA).
- 15 7. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 5 o 6 que además comprende otro microorganismo.
8. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7 que además comprende un aditivo seleccionado de entre fertilizantes orgánicos o inorgánicos, agentes químicos o biológicos promotores del crecimiento de las plantas, agentes químicos o biológicos protectores de las plantas, insecticidas, nematocidas o bactericidas.
- 20 9. Sustrato que comprende la composición según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8.
10. Uso de la a composición según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8 para su aplicación a un sustrato de cultivo, al agua de riego, a raíces y/o a semillas.
- 25 11. Uso del hongo según reivindicación 1, de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8 o del sustrato según la reivindicación 9 para estimular el crecimiento de una planta o parte de una planta.
- 30 12. Uso del hongo según reivindicación 1, de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8 o del sustrato según la reivindicación 9 para proteger una planta del ataque de patógenos.
13. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 11 o 12 donde la planta se selecciona de entre la familia *Leguminoseae*, *Compositae*, *Boraginaceae*, *Cistaceae* o *Graminaceae*.
- 35 14. Uso según reivindicación 12 donde la planta se selecciona de entre los géneros *Trifolium*, *Chamaemelum*, *Carduus*, *Chrysanthemum*, *Echium*, *Cistus*, *Allium* o *Avena*.
15. Uso del hongo según reivindicación 1, de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8 o del sustrato según la reivindicación 9 para la recuperación de suelos o áreas degradadas.
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

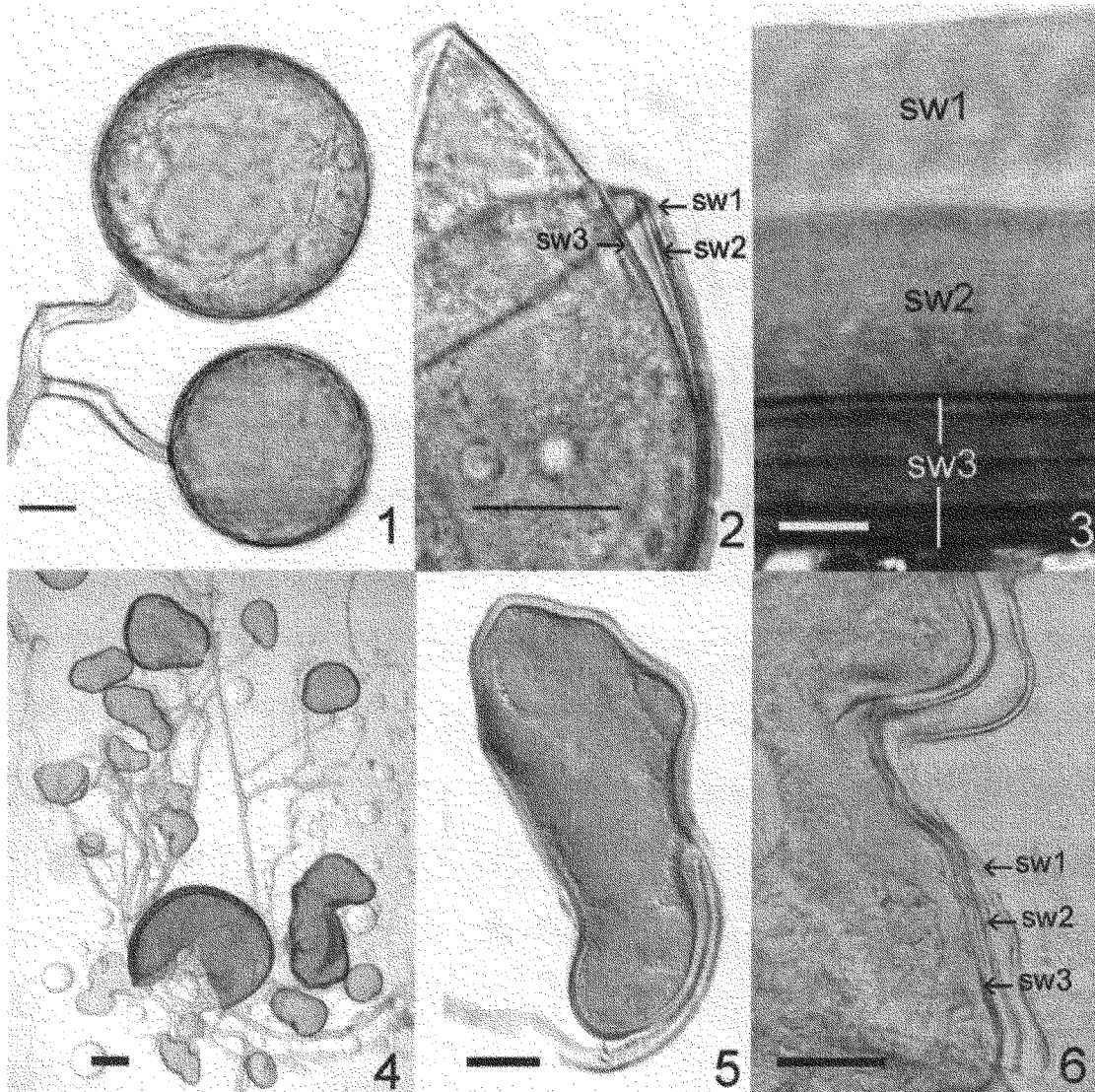


FIG.1

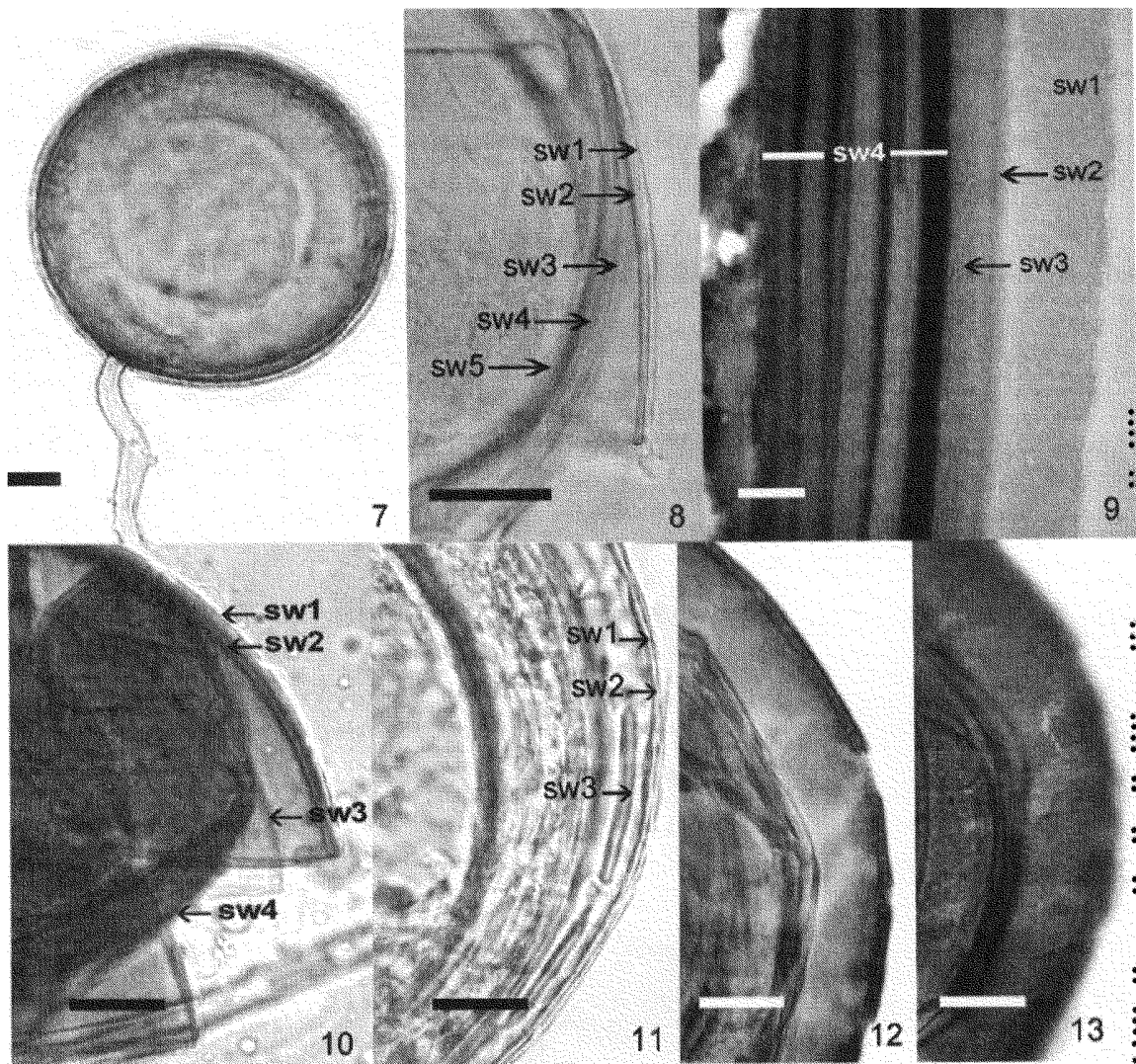


FIG.2

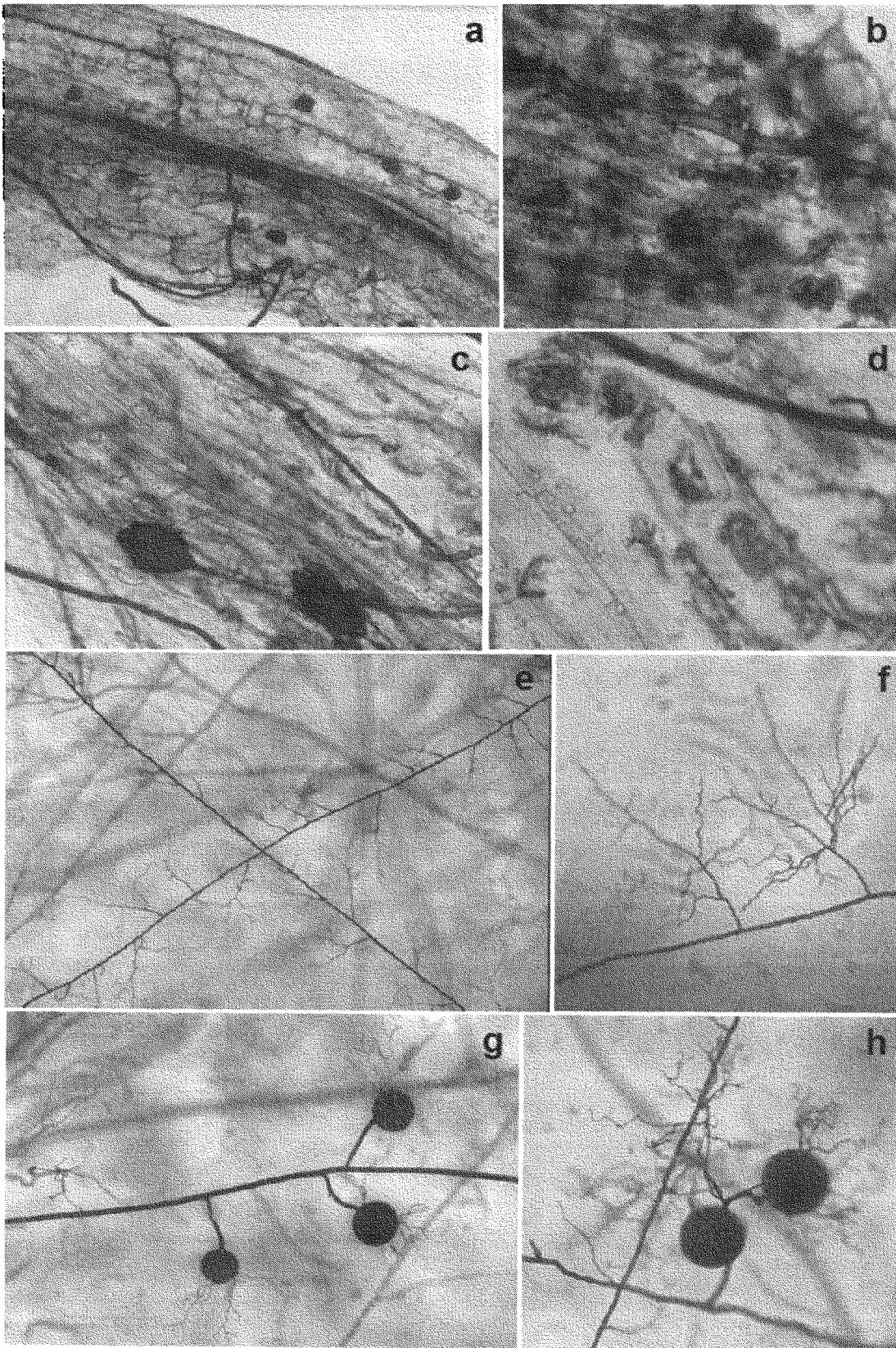


FIG.3

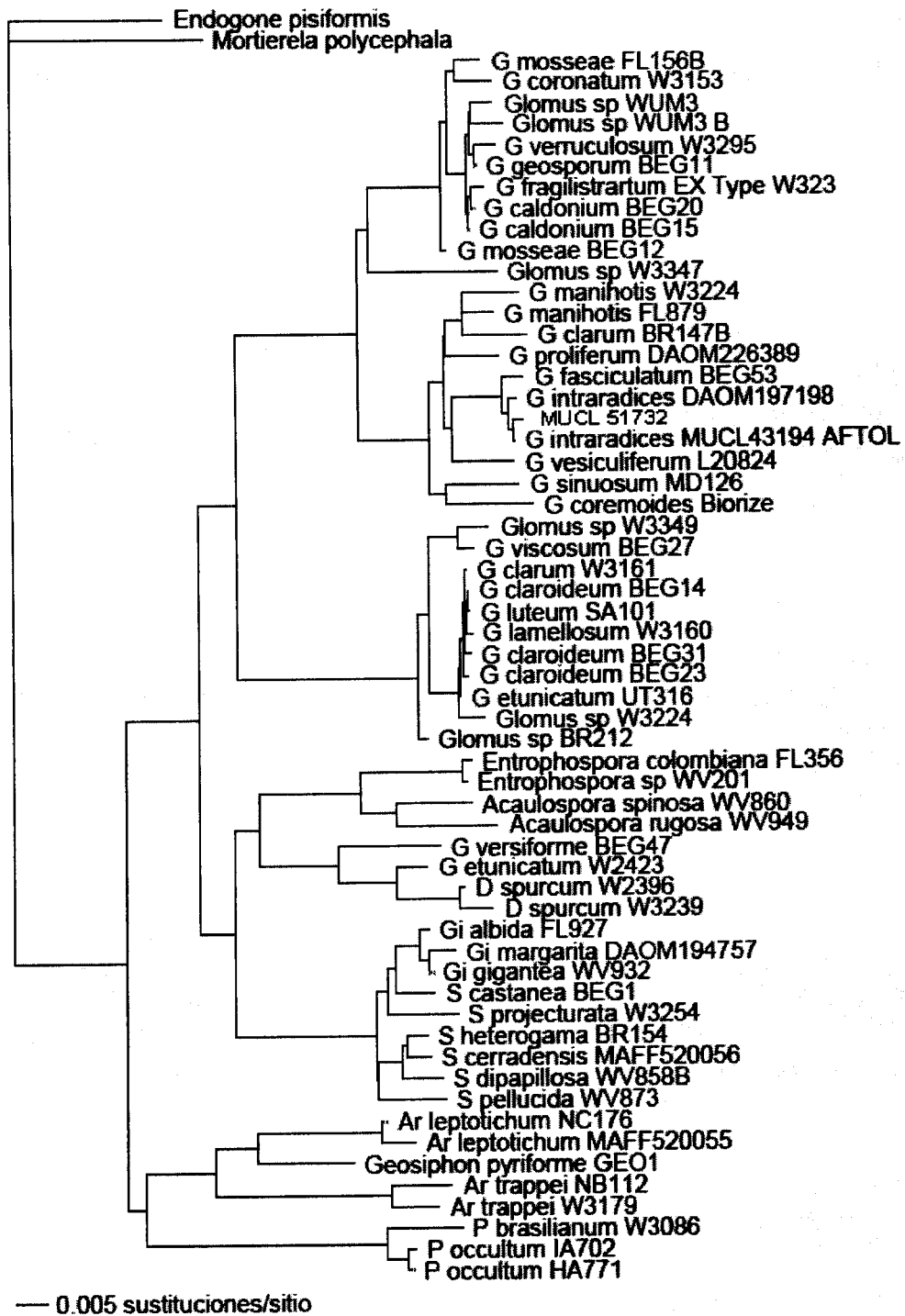


FIG.4

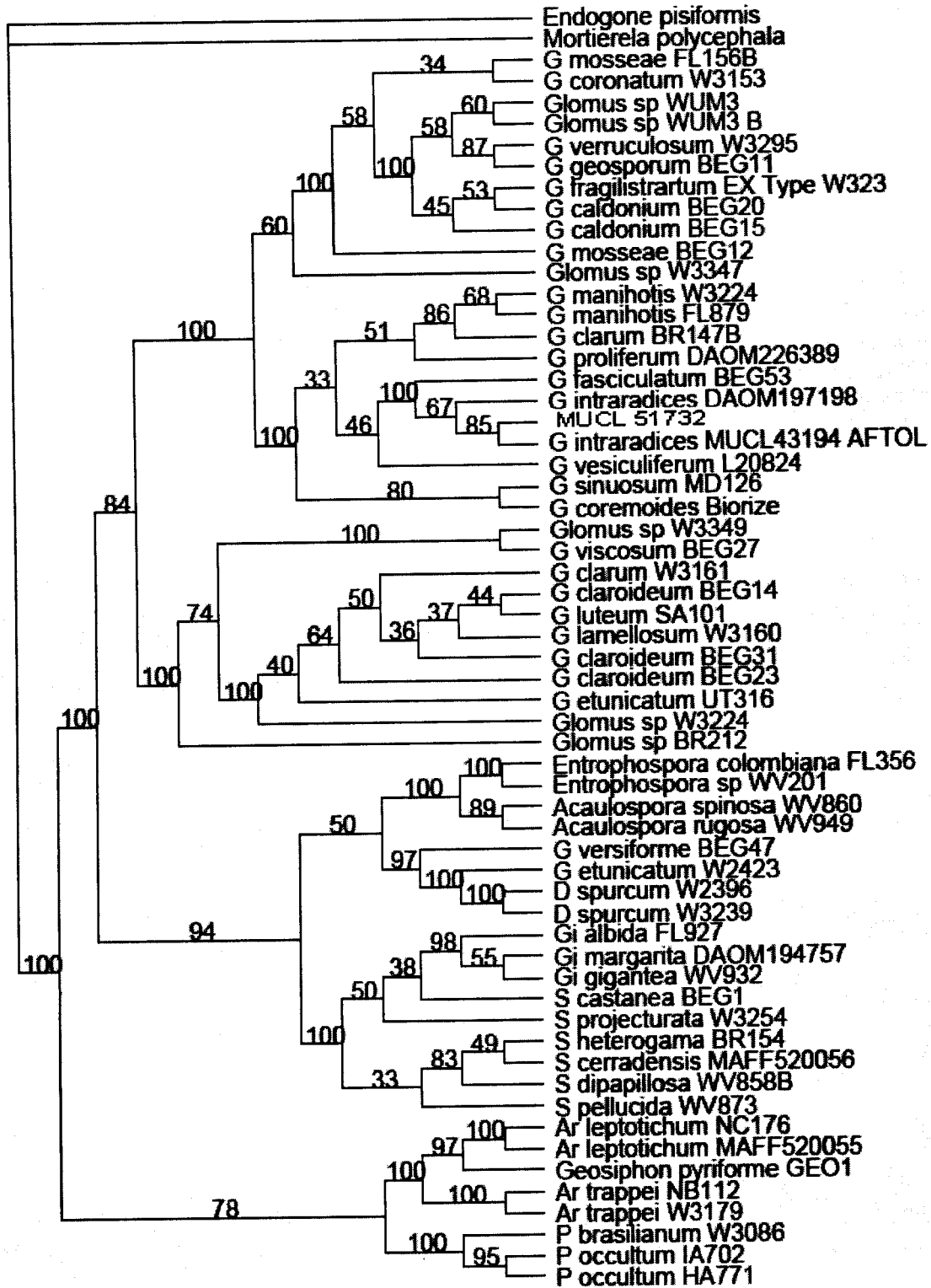


FIG.5

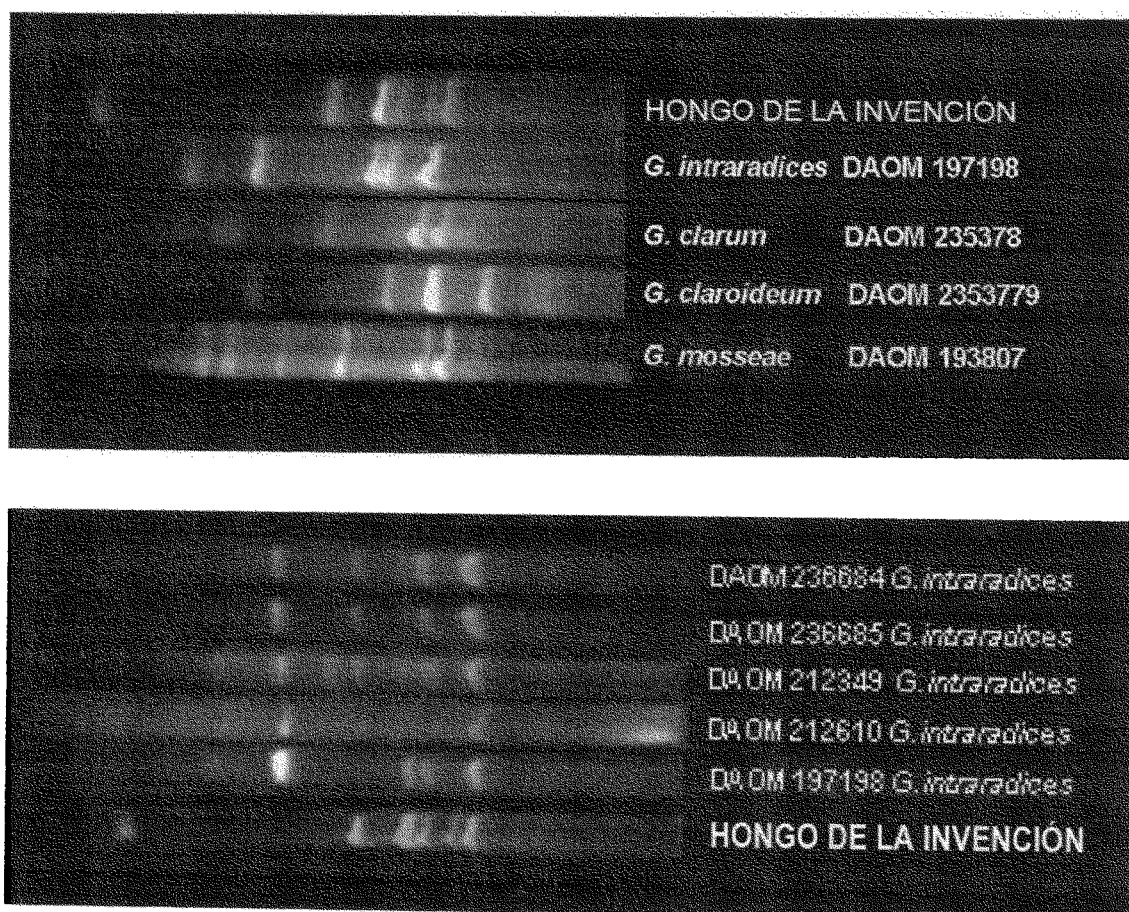


FIG.6

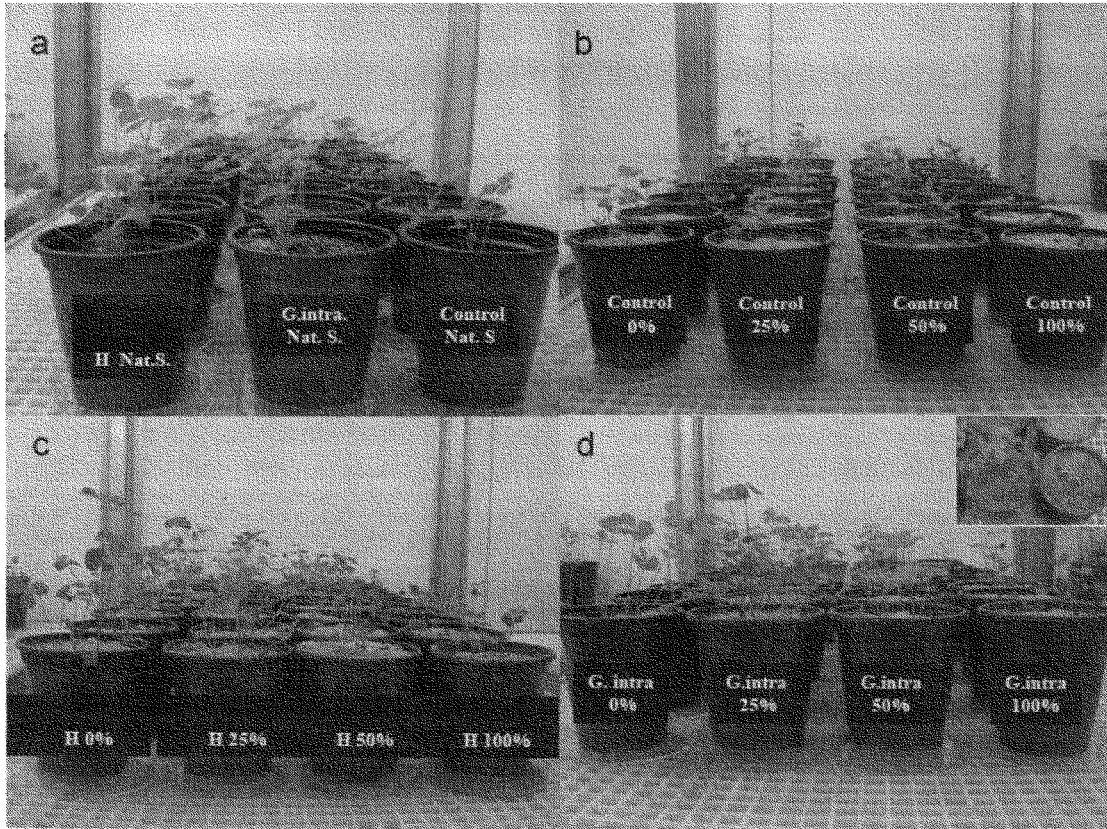


FIG.7

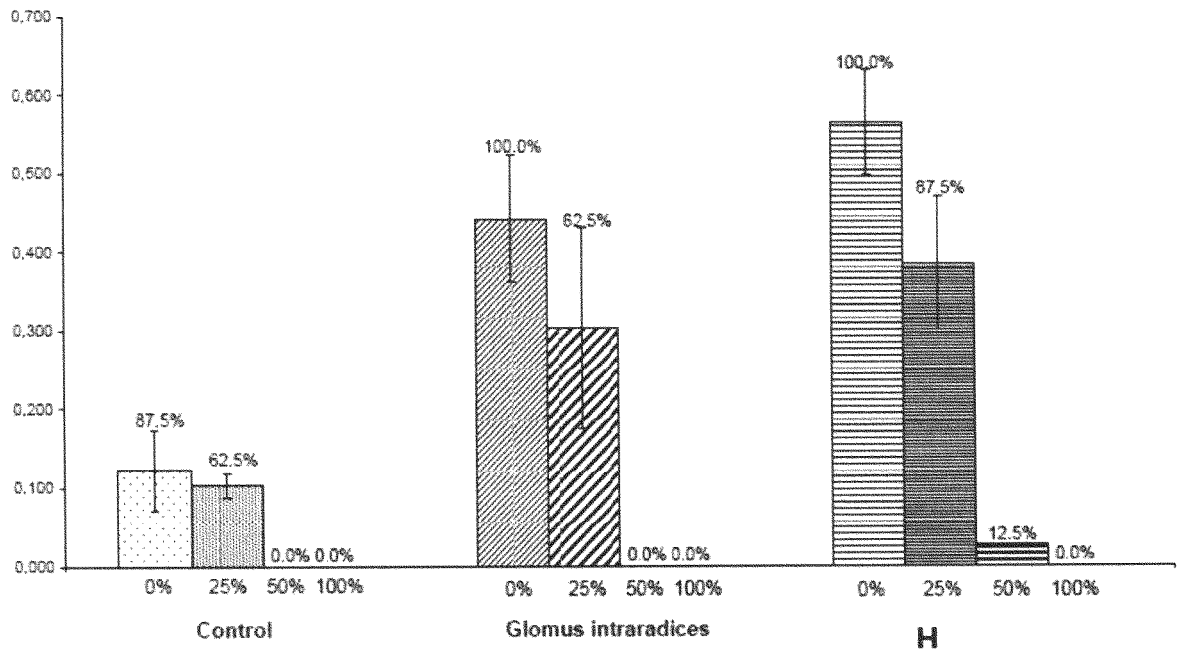


FIG.8

ES 2 343 235 B1

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Consejo superior de investigaciones científicas
- 5 <120> Hongo formador de micorrizas arbusculares y su uso para estimular el crecimiento de plantas
- <130> 1641.247
- 10 <160> 3
- <170> PatentIn version 3.5
- 15 <210> 1
<211> 22
<212> DNA
<213> artificial sequence
- 20 <220>
<223> Primer ERIC IR:1R
- 25 <400> 1

atgtaagctc ctggggattc ac 22
- 30 <210> 2
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial sequence
- 35 <220>
<223> Primer 2I
- 40 <400> 2

aagtaagtga ctgggggtgag cg 22
- 45 <210> 3
<211> 1745
<212> DNA
<213> SSU (18s) del Hongo de la invención
- 50 <400> 3
atatgcttgt ctcaaagatt aagccatgca tgtctaagta taaatcgttt atacaggtga
60
aactgcgaat ggctcattaa atcagttata atttatttga tagtacctta ctacttggat
120
aaccgtggta attctagagc taatacatgc taaaacctcc gacttctgga aggggggtgta
180
tttattagat aaaaaaccaa tatcgggcaa ccgattccct tggtgattca taataacttt
240
tcgaatcgta tgactttacg tcgacgatga atcattcaaa tttctgccct atcaactttc
300
gatggttagga tagaggccta ccatgggtggg aacgggtaac ggggtgtag ggcacgacac
360
65 cggagagggga gcctgagaaa cggctaccac atccaaggat ggcagcaggc gcgcaaatta
420

ES 2 343 235 B1

480 cccaatcccc acacggggag gtagtgacaa taaataacaa tacggggttc tttaggatct
 5 cgtaattgga atgagtacaa tttaaatctc ttaacgagga acaattggag ggcaagtctg
 540
 gtgccagcag ccgcggtaat tccagctcca atagcgtata ttaaagttgt tgcagttaaa
 600
 10 aagctcgtag ttgaatttcg gggttagtag gttggtcattg cctctgggat gtactgggtct
 660
 cactgattcc tccttcctta tgaaccgtaa tgccattaat ttgggtgtgc ggggaatttg
 720
 15 gactgttact ttgaaaaaat tagagtgttt aaagcaagct aacgcttgaa tacattagca
 780
 20 tgggaataatg aaataggacg ttcgatctta ttttgttggg ttctaggatt gacgtaatga
 840
 ttaatagggga tagttggggg cattagtatt caattgtcag aggtgaaatt cttggattta
 900
 25 ttgaagacta actactgcga aagcatttgc caaggatgtt ttcattaatc aaggacgaaa
 960
 gttaggggat cgaagacgat cagataccgt cgtagtctta accataaact atgccgacta
 1020
 30 gggatcggat gatgttaatt ttttaatgac tcattcggcg ccttacggga aaccaaagtg
 1080
 35 tttgggttcc ggggggagta tggctgcaag gctgaaactt aaaggaattg acggaagggc
 1140
 accaccaggg gtggagcctg cggcttaatt tgactcaaca cggggaaact caccaggtcc
 1200
 40 agacatagta aggattgaca gattgagagc tctttcttga ttctatgggt ggtggtgcat
 1260
 ggccgttctt agttggtgga gtgatttgtc tggttaattc cgttaacgaa cgagacctta
 1320
 45 acctgctaaa tagctaggcc taacattggt aggtcgccag cttcttagag ggactatcgg
 1380
 tgtttaaccg atggaagttt gaggcaataa caggtctgtg atgcccttag atgttctggg
 1440
 50 ccgcacgcgc gctacactga tgaagtcatc gagttcattt cctttatcgg aagatatggg
 1500
 55 taatcttttg aaacttcacg gtgctgggga tagagcattg caactattgc tcttgaacga
 1560
 ggaatcccta gtaagtacaa gtcactagct tgtgctgatt acgtccctgc cctttgtaca
 1620
 60 caccgcccgt cgctactacc gattgaaatg cttagtgagg ccttcggatt gaaattcggg
 1680
 gactggcaac agactcttgg ttttgaaaag ttggacaaac ttggtcattt agaggaagta
 1740
 65 aaagt
 1745



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 343 235

② Nº de solicitud: 200900194

③ Fecha de presentación de la solicitud: 23.01.2009

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	RUIZ-LOZANO J.M. ET AL., "Effects of Arbuscular-Mycorrhizal Glomus Species on Drought Tolerance: Physiological and Nutritional Plant Responses" Applied and Environmental Microbiology (1995), pág.456-460, todo el documento	1-15
A	DUPONNOIS R. ET AL., " The mycorrhizal Glomus intraradices and rock phosphate amendment influence plant growth and microbial activity in the rhizosphere of Acaciaholosericea" Soil Biology and Biochemistry (2005), 37, pág.1460-1468,todo el documento	1-15
A	PORCEL R. ET AL., "A gene from the arbuscular mycorrhizal fungus Glomus intraradices encoding a binding protein is up-regulated by drought stress in some mycorrhizal plants", Environmental and experimental Botany (2007), pág.251-256, todo el documento	1-15
A	US 20080064598 A1 (ROUGEMONT et al) 13.03.2008, todo el documento	1-15
A	ES 2096528 A1 (INSTITUT DE RECERCA I TECNOLOGIA AGROALIMENTARIES (IRTA)) 01.03.1997, todo el documento	1-15

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

27.05.2010

Examinador

M. Hernández Cuéllar

Página

1/5

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N 1/14 (2006.01)

A01G 1/04 (2006.01)

A01N 63/04 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N, A01G, A01N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC,WPI,BIOSIS,MEDLINE,EMBASE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 27.05.2010

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-15	SÍ
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-15	SÍ
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión:

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

1. Documentos considerados:

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	RUIZ-LOZANO J.M. ET AL., "Effects of Arbuscular-Mycorrhizal Glomus Species on Drought Tolerance: Physiological and Nutritional Plant Responses" Applied and Environmental Microbiology (1995), pág.456-460, todo el documento	- -
D02	DUPONNOIS R. ET AL., " The mycorrhizal Glomus intraradices and rock phosphate amendment influence plant growth and microbial activity in the rhizosphere of Acacia holosericea" Soil Biology and Biochemistry (2005), 37, pág.1460- 1468,todo el documento	- -
D03	PORCEL R. ET AL., "A gene from the arbuscular mycorrhizal fungus Glomus intraradices encoding a binding protein is up-regulated by drought stress in some mycorrhizal plants", Environmental and Experimental Botany (2007), pág.251-256, todo el documento	- -
D04	US 20080064598 A1	13-03-2008
D05	ES 2096528 A1	01-03-1997

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La invención de la presente Solicitud Internacional se refiere a una cepa de hongo micorrízico arbuscular (HMA) denominada MUCL 51732 capaz de establecer simbiosis micorrízica con una gran diversidad de plantas de forma que aumenta la supervivencia, vitalidad y producción, especialmente en condiciones de altas concentraciones de metales pesados y otros xenobióticos y reduce la necesidad de aplicación de fertilizantes químicos, pesticidas y fitosanitarios.

1.- NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA

La cepa MUCL 51732 aunque presenta unos porcentajes de homología elevados con cepas de la especie *G. intraradices*, no es 100% idéntica. En consecuencia esta Oficina considera que las reivindicaciones 1-15 cumplen el requisito de novedad.

Los documentos D01 y D03 se refieren a la contribución de la simbiosis de los hongos micorrízicos arbusculares sobre la tolerancia a las condiciones de sequía. El documento D01 describe un estudio de siete especies fúngicas que pertenecen al género *Glomus* en cuanto a su capacidad para aumentar la tolerancia a la sequía de plantas de lechuga. Este estudio comparativo demuestra que todas las especies analizadas tienen, en función de sus características particulares, un efecto mayor o menor sobre el estrés hídrico de las plantas huésped que afecta a su vez a otros parámetros como el crecimiento de la planta, la absorción de minerales, la tasa de intercambio de CO₂, la acumulación de prolina etc...El documento D03 se centra en el estudio de los posibles mecanismos que subyacen al aumento de la tolerancia en condiciones de bajo aporte hídrico. Los autores han aislado el gen que codifica la proteína BiP cuya expresión aumenta en estas condiciones no solo in vitro sino también ex vitro cuando existe simbiosis natural con las plantas.

En el documento D02 se examinan los efectos de la simbiosis de la especie *Glomus intraradices* sobre el crecimiento de la rizosfera *Acacia holosericea*, la disponibilidad de fosfato de la planta así como la actividad microbiana del suelo en función de la adición o no adición de fosfato mineral. De acuerdo con este estudio la inoculación con *G. intraradices* es muy beneficiosa para el crecimiento de *A. holosericea* y la simbiosis optimiza la solubilización del fosfato mineral y afecta a la actividad microbiana de la hifosfera de *A. holosericea*.

Los documentos D04 y D05 divulgan aplicaciones concretas de la especie *G. intraradices*. El documento D04 se refiere a preparaciones de este hongo arbuscular cuya inoculación en plantas complementa el uso de fertilizantes. El documento D05 describe el uso de *G. intraradices* en un método para la micorrización del suelo de campos de cultivo en explotaciones agrarias.

Hoja adicional

La cepa de la invención se comporta, en líneas generales, como los hongos micorrícicos arbusculares, en particular de la especie *G. intraradices*, analizados en el estado de la técnica: estimula el crecimiento, la nutrición, la supervivencia, la resistencia a diferentes estreses abióticos y el desarrollo de las plantas. No obstante, esta Oficina considera significativas las diferencias sobre los efectos que aporta la cepa MUCL 51732 con respecto a otras cepas que presentan una elevadísima homología genética. En este sentido, esta Oficina considera que las reivindicaciones 1-15 cumplen el requisito de actividad inventiva.