



## (12) FASCICULE DE BREVET

(11) N° de publication :  
**MA 29118 B1**

(51) Cl. internationale :  
**C05F 11/08; A01N 65/00;  
C12N 1/14**

(43) Date de publication :  
**03.12.2007**

---

(21) N° Dépôt :  
**30039**

(22) Date de Dépôt :  
**28.06.2007**

(30) Données de Priorité :  
**08.12.2004 CU 2004-0277**

(86) Données relatives à l'entrée en phase nationale selon le PCT :  
**PCT/CU2005/000010 29.11.2005**

(71) Demandeur(s) :  
**INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS AGRÍCOLAS (INCA), Carretera Tapaste, Km. 3  
1/2 San José de las Lajas 32700 (CU)**

(72) Inventeur(s) :  
**FERNÁNDEZ MARTÍN, Félix ; DELL'AMICO RODRÍGUEZ, José Miguel ; PÉREZ  
CABRERA, Yuniesky**

(74) Mandataire :  
**ABU-GHAZALEH INTELLECTUAL PROPERTY (TMP AGENTS)**

---

(54) Titre : **INOCULUM MYCORHIZOGENE LIQUIDE**

(57) Abrégé : L'INVENTION CONCERNE LE DOMAINE DE L'AGRICULTURE, DE LA BIOTECHNOLOGIE DU SOL ET, D'UNE MANIÈRE PLUS SPÉCIFIQUE, LA PRODUCTION ET L'APPLICATION DES CHAMPIGNONS MYCORRHIZOGÈNES ARBUSCULAIRES, MICROORGANISMES QUI AMÉLIORENT LE RENDEMENT DE L'ABSORPTION DE NUTRIMENTS PAR LES PLANTES, LE NIVEAU HYDRIQUE, LA PRODUCTION VÉGÉTALE, LA PROTECTION CONTRE LES MALADIES DES RACINES, ETC. D'UNE MANIÈRE PLUS SPÉCIFIQUE, L'INVENTION CONCERNE UN PRODUIT LIQUIDE POUR L'APPLICATION DES CHAMPIGNONS MYCORRHIZOGÈNES ARBUSCULAIRES, EN UTILISANT UN MILIEU AQUEUX QUI PERMET D'OBTENIR UNE STABILISATION DES PROPAGULES MYCORRHIZIQUES, CE QUI FACILITE LA FORMATION D'AGRÉGATS DE SOLS ET UNE VIABILITÉ TESTÉE EN MILIEU LIQUIDE ENTRE 12 ET 18 MOIS. CE PRODUIT LIQUIDE, QUI PEUT ÊTRE UTILISÉ DANS DES SYSTÈMES D'IRRIGATION ET DE FERTIRRIGATION, LORSQU'IL EST DIRECTEMENT APPLIQUÉ DANS DES CHAMPS OU DANS DES SERRES DE CULTURE PROTÉGÉE,

PERMET DE MAÎTRISER LES MÉCANISMES DE DORMANCE DES SPORES ET D'ATTEINDRE UN NIVEAU ÉLEVÉ DE CONCENTRATION QUI PERMET ET FACILITE L'AMPLIATION ET LE TRANSPORT DUDIT PRODUIT LIQUIDE. L'APPLICATION DE CE PRODUIT PERMET DE MANIPULER LES CHAMPIGNONS MYCORRHIZOGÈNES DANS DES CULTURES RÉGIES PAR DES SYSTÈMES D'IRRIGATION À GRANDE ÉCHELLE, TOUT EN AMÉLIORANT LA PRODUCTIVITÉ ET LES CONDITIONS ÉCOLOGIQUES.

**ABREGE**

L'invention concerne le domaine de l'agriculture, de la biotechnologie du sol et, d'une manière plus spécifique, la production et l'application des champignons mycorrhizogènes arbusculaires, microorganismes qui améliorent le rendement de l'absorption de nutriments par les plantes, le niveau hydrique, la production végétale, la protection contre les maladies des racines, etc. D'une manière plus spécifique, l'invention concerne un produit liquide pour l'application des champignons mycorrhizogènes arbusculaires, en utilisant un milieu aqueux qui permet d'obtenir une stabilisation des propagules mycorrhiziques, ce qui facilite la formation d'agrégats de sols et une viabilité testée en milieu liquide entre 12 et 18 mois, qui peuvent être utilisés dans les systèmes d'irrigation et de l'irrigation fertilisante; il peut être appliqué directement dans le champ ou les serres protégées de culture, sans compter qu'il permet d'améliorer les mécanismes de dormance de spore et de réaliser un niveau élevé de concentration qui permet sa manipulation et son déplacement. En appliquant ce produit, des champignons mycorrhizogènes peuvent être gérés dans la culture selon les systèmes d'irrigation à grande échelle, réalisant de meilleures conditions productives et environnementales.

13 DEC 2007

## INOCULUM MYCORRHIZOGENE LIQUIDE

Etat de la technique

La présente solution technique concerne les sciences agronomiques, en particulier la production de biofertilisants organiques, et d'une manière plus spécifique, pour obtenir un inoculant mycorrhizogène liquide qui peut être appliqué au sol et aux plantes directement et à travers des systèmes d'irrigation.

Plusieurs fonctions ont été attribuées aux associations mycorrhizogènes, notamment l'amélioration de la surface absorbante du système racinaire par une augmentation remarquable de ce système, augmentation de la tolérance du sol aux toxines, la solubilisation de certains éléments nutritifs (N, P, Ca, magnésium, manganèse, Cu, Zn, B, etc.), la résistance aux conditions défavorables, comme : la sécheresse, la salinité, la sélectivité d'absorption, l'amélioration des propriétés physiques de sol dérivée de la formation des agrégats stables et une protection particulière contre des pathogènes des racines. L'application de cette association à l'agriculture implique de fortes incidences sur l'environnement, parce qu'elle favorise un meilleur équilibre parmi les différentes populations de micro-organismes présents dans la sphère mycorrhizogène et la rhizosphère de l'association champignons - plantes mycorrhizogènes et en général une protection plus élevée contre les effets de contrainte biotiques et abiotiques.

L'obtention et l'application ultérieure des *inoculumycorrhizalants* sur la base des champignons mycorrhizogènes arbusculaires dans les plantes ont des caractéristiques particulières, parce qu'elles ne poussent pas dans les milieux axéniques uniquement, mais accomplissent leur cycle de vie dans les racines des plantes hôtes, de sorte qu'une fois le cycle de la vie végétale terminé (pour la production de ces inoculants 3 à 4 plantes d'un cycle d'un mois sont utilisés), le système racinaire colonisé par le champignon est extrait, aussi bien que les propagules fongiques (mycélium extramatriciel et les spores) développés pendant l'association, aussi bien que le substrat où ils ont été effectués, tous ces composants constituant un inoculant mycorrhizogène sur une base solide (Fernandez, F. Chapitre 3. Bases Científico Técnicas Para el manejo de los sistemas micorrizados eficientemente. Dans : Rivera, Fernández, eds. INCA, La Havane. 2003).

Dans la production actuelle de ce type d'inoculant, les matières suivantes sont utilisées (Feldman, F. et Idozak, production de E. Inoculum Production of Vesicular - arbuscular mycorrhizal Fungi for use in tropical nurseries. Dans : Méthodes en microbiologie. Volume 24 ISBN 0-12-521524-X. Eds. Academic Press Limited. 1992 ; Fernandez, F et al, certificat de l'auteur 22641. OCPI. 1999) :

- Sol
- Sol + Matière Organique
- Matière Organique
- Sable
- Argiles
- Argiles + Sable
- Argiles + Matière Organique
- Sable + Matière Organique + Sol
- Solution de nutriments Dans une cuve de circulation liquide
- Vermiculite
- Pearlet
- Tourbe de Mousse
- Argile de montmorillonite expansée
- Mélanges de ces matières.

Les produits mycorrhizogènes développés des matières susmentionnées, sont directement appliqués à la graine vêtue avec 10%, selon le poids de la graine à mettre directement dans le champ (Fernandez, F et al. Le Certificat de l'Auteur 22641. OCPI. 1999) ou l'application directe des inoculants au taux de 1 à 2 T. h-1. Dans le cas de la planche de semis et les cultures de pépinière, le taux d'application ne doit pas dépasser 1 kg.m<sup>2</sup>, et 10 g/graine,

mettant toujours le produit au-dessous de la graine à semer respectivement (Sieverding, E. Vesicular. Arbuscular Mycorrhiza in Tropical Agrosystem. Deutsche Gesellschaft für technische Zusammenarbeit (GTZ) GMBH, République Fédérale d'Allemagne 1991. 371 p).

L'application de ces inoculants par des systèmes d'irrigation ou l'irrigation fertilisante est principalement due à l'absence d'un inoculant liquide qui satisfait aux caractéristiques appropriées, lui permettant de résister aux changements brusques de la pression hydrostatique produite dans les tubes d'irrigation.

La production des inoculants mycorrhizogènes arbusculaires a été développée sur la base de l'application du solide, semi solide aux substrats de floculant et l'utilisation sur une plus petite échelle de ces micro-organismes dans des milieux liquides.

Concernant les milieux solides, certains exemples de brevets ayant utilisé plusieurs substrats de multiplication sont disponibles, à titre d'exemple : US4945059, JP7123979, JP4187081, DE10161443, et DE10221762. Ces inoculants sont peu convenables, puisqu'ils gèrent généralement de grands volumes de substrats, la germination de spore est affectée par les longues périodes de dormance, la concentration de propagule dans ce produit est normale, c.-à-d., il ne peut pas être concentré à la taille désirée.

Dans le cas des inoculants semi solides, les brevets suivants ont été publiés : EP0726305, EP0596217, EP0072213, US5120344, EP0495108, EP0475433, US5436218, US3437625, US3557562, EP0023347, US2856380, US3857991, et GB2381264. Ces produits relèvent sur les substrats utilisés comme des gels, copolymères, argiles, dans des milieux floculants. Similairement, les volumes importants sont gérés dans l'application agricole qui ne peut pas surmonter les périodes de dormance dans les spores des champignons mycorrhizogènes.

Les inoculants liquides présentés dans les brevets, sont généralement reliés avec *l'ectomycorrhiza* (CN1420167, US2 004208852) et nous n'avons trouvé qu'un liquide signalé par les japonais (JP4141023), sur la base de l'utilisation d'un stabilisateur (acide citrique ou son sel) pour protéger les spores.

En général, les produits mycorrhizogènes reconnus n'ont pas de germination de spore uniforme et les mécanismes de dormance de ces espèces fongiques ne peuvent pas être améliorés, parce que les substrats sur lesquels ces inoculants sont présentés ne confèrent pas de conditions de contrainte aux propagules qui accélèrent les procédés de germination des spores une fois inoculées en conditions naturelles.

D'autre part, les inoculants mycorrhizogènes préparés jusqu'à présent, ayant une limite normale de propagules mycorrhiziques, n'ont pas été signalés, parce que le procédé d'obtention n'est pas doté de la concentration d'une quantité plus élevée de propagules spécifiques. Le produit mycorrhizogène reconnu avec une concentration plus élevée a actuellement une relation de spore : mycélium de 50 spores. g-1 substrat 65mg. Substrat de mycelium-1 (Fernández, F. Chapter 3. Bases científico técnicas par el manejo de los sistemas micorizados efficientemenete. Dans : Rivera, Fernández, eds. INCA, Havana. 2003).

La glycoprotéine spécifique de ces champignons, désignée par la Glomaline, accélère le processus de formation des micros agrégats stables dans le sol, améliorant leur structure physique, augmentant les niveaux de l'oxygène, et permettant une meilleure colonisation de l'organisme. Puisque la Glomaline est excrétée d'une manière normale uniquement pendant la symbiose, ou sous l'action d'un certain milieu d'excrétion, il ne semble pas être excrétée au support solide dans les inoculants mycorrhizogènes reconnus, et les niveaux où on le trouve dans le sol, dépendent du statut symbiotique avec l'organisme, et ils ne peuvent pas augmenter au-delà des limites permises par cette symbiose.

## DESCRIPTION DE L'INVENTION

L'objectif principal de la présente invention consiste à obtenir un produit liquide qui permet une manipulation massive des champignons mycorrhizogènes, avec une qualité et une efficacité supérieures, de sorte qu'il puisse être directement appliqué dans des doses appropriés et profitables particulièrement par le système d'irrigation localisé ou par d'autres systèmes.

Pour obtenir cet inoculant, il faudrait se conformer aux étapes suivantes:

1. Semer les plantes hôtes de *Braquiaria decumbens*, *Sorghum Vulgare* ou des espèces micotrophiques différentes des plantes hôtes qui poussent sur un substrat reproducteur : sol, argiles kaoliniques ou montmorilloniques, *pearlet*, *zepeolite*, vermiculite et matière organique (appliqués selon les besoins symbiotiques).
2. Ces plantes sont directement inoculées en plaçant, 10 grammes de champignons mycorrhizogènes au-dessous des graines, pour leur production les espèces suivantes ont été utilisées individuellement: *Glomus fasciculatum*, *Glomus clarum*, *Glomus spurcum*, *Glomus mosseae*, *Glomus intrarradices*, *Gigaspora margarita*, et d'autres espèces de Glomales et de Diversisporales, toutefois d'autres espèces de champignons mycorrhizogènes peuvent également être utilisées.
3. À la fin du cycle de la plante, sa partie supérieure est enlevée, et un substrat solide cohérent est obtenu dans un mélange de propagules mycorrhiziques (racines colonisées, mycélium fongique et spores de résistance) et le support initial.
4. Ensuite, les propagules mycorrhiziques sont extraits par la méthode de décantation et tamis humide à travers plusieurs passoires dont la rance varie entre 400 µM et 40, selon les espèces de champignons mycorrhizogènes en question ; la fraction solide recueillie dans la passoire la plus fine, est centrifugée et ensuite la fraction liquide est décantée avec les propagules fongiques.
5. Lorsque tous les composants mycorrhizogènes sont séparés, ceux-ci sont superficiellement désinfectés avec une solution de la chloramine T (2%) pendant 5 minutes ; ils sont lavés trois fois avec de l'eau distillée stérile et placés en sulfate de streptomycine pendant 24 heures. Une fois terminés, ils sont mis dans un mélange aqueux contenant le sorbitol (entre 5 et 10 %), le Manitol (2 %), le Tween 40, (5 %), le Tween 80 (2 %), le Polyéthylenglycol 4000, pour s'appliquer à une gamme entre 100 et 500 mg.L-1 et agar de 0.8 à 0.1 %. dans ce cas, le produit peut être préparé jusqu'aux limites physiques permises de l'unité propagule.mL-1 du milieu de culture.

6. La solution aqueuse avec les propagules se composerait des éléments suivants :

a) Composants actifs:

- Propagules mycorrhiziques: Spores de résistance, mycélium extramatriciel arbusculaire, Glomaline et des racines inférieures à 40 µM, colonisées avec le champignon en question.

b) D'autres composants :

Le "sorbitol, à une gamme qui varie entre 5 et 10 %,"

Le « Manitol, à une gamme qui varie entre 2 et 5 %, »

Le "Tween 40, à une gamme qui varie entre 5 et 7 %,"

Le « Tween 80 à une gamme qui varie entre 2 et 7 %,"

Le Polietilenglycol appliqué à une gamme qui varie entre 100 et 500 mg.L -1

"L'agar à une gamme qui varie entre 0.8 et 0.1 % ».

Lorsque ces procédés sont terminés, un produit est prêt à être appliquée dans le champ ou par le système d'irrigation localisé, garantissant que les propagules mycorrhiziques, particulièrement les spores, doivent être protégés des effets de la pression osmotique superficielle et qu'une fois ils sont appliqués dans l'eau, ils peuvent influencer sur les

mécanismes de dormance de spore et atteindre une forte capacité de colonisation, développant une récolte positive.

L'invention proposée se compose d'un inoculant qui, selon sa forme de production, peut être fortement infectieux, parce que des concentrations très élevées peuvent être atteintes, sans plus de limitations en comparaison avec ceux physiques qui permettent cette dissolution aqueuse, ou les commodités pour son application, réalisant des concentrations de l'ordre de 1 ou 2 millions de spores. L-1 et 1 et 2 grammes de mycélium L-1.

En outre, en raison du fait que les propagules mycorrhizogènes sont dans un milieu aqueux, la sécrétion de la Glomaline est stimulée, qui est présente à des concentrations élevées dans la composition de cet inoculant, lui donnant des caractéristiques spéciales, accélérant de cette manière, avec son application directe, les processus de formation de micro agrégats stables dans le sol, améliorant sa structure physique immédiatement, et augmentant les niveaux de l'oxygène, qui favorisent une meilleure colonisation de ce micro-organisme, garantissant un développement efficace de symbiose mycorrhizogène. Cet inoculant favorise l'application directe du produit dans le sol, diminuant son volume en augmentant sa concentration, permettant de cette manière sa manipulation et déplacement, et éliminant le travail.

On le monte sur un appui liquide concentré, avec une viabilité de 8 mois, qui peut être complètement appliqué par des systèmes de d'irrigation fertilisante, réalisant une distribution homogène, établie par des expériences à différentes échelles. Ce fait a garanti une inoculation réussie de toutes les plantes par le système d'irrigation, qui est observé par des augmentations significatives de rendement (voir le rapport technique).

#### **REFERENCES**

- Dell Amico. et al, Journal of Agricultural Science.. 2002
- Feldmann, F and Idczak, E. Inoculum production of Vesicular -arbuscular Mycorrhizal Fungi for use in tropical nurseries. In: Methods in Microbiology. Volume 24 ISBN 0-12-521524-x. Eds. Academic Press Limited. 1992
- Fernández, F. Capitulo 3. Bases Científico Técnicas para el manejo de los sistemas micorrizados eficientemente. En: Rivera, Fernández, eds. INCA, La Habana. 2003.
- Fernández, F et al,. Patente 22641. OCPI. 1999
- Sieverding, E. Vesicular Arbuscular Mycorrhiza in Tropical Agrosystem. Deutsche Gesellschaft fur techniische Zusammenarbeit (GTZ) GMBH, federal Republic of Germany.1991. 371 p.



**REVENDEICATIONS**

1. Un inoculant mycorrhizogène liquide caractérisé en ce qu'il contient la composition suivante :
  - a. le propagule mycorrhizogène composé par des spores de résistance, le mycélium externe arbusculaire, la Glomaline et des racines inférieures à 40  $\mu$ M, colonisés avec le champignon en question.
  - b. Le sorbitol à une gamme qui varie entre 5 et 10 %.
  - c. Le mannitol à une gamme qui varie entre 2 et 5 %. Le
  - d. Tween 40 à une gamme qui varie entre 5 et 7 %.
  - e. Le Tween 80 à une gamme qui varie entre 2 et 7 %.
  - f. Le Polyéthylenglycol est appliqué à une gamme qui varie entre 100 et 500 mg.L<sup>-1</sup>.
  - g. L'agar à 0.1 %
  
2. Un inoculant mycorrhizogène liquide selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il peut être appliqué dans l'eau par des systèmes d'irrigation et par l'irrigation fertilisante.
  
3. Un inoculant mycorrhizogène liquide selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il permet un niveau de concentration de l'ordre de 1 ou 2 millions de spores.L<sup>-1</sup> et de 1 et 2 grammes de mycelium.L<sup>-1</sup>.
  
4. Un Inoculant mycorrhizogène liquide selon la revendication 1 où le polyéthylenglycol peut être utilisé avec plusieurs poids moléculaires, à une gamme qui varie entre 4000 et 10000 avec une concentration de dissolution selon le poids moléculaire dans une gamme qui varie entre 100 et 500 mg.L<sup>-1</sup>.