

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 957 733**

21 Número de solicitud: 202230529

51 Int. Cl.:

A01C 1/06 (2006.01)
A01N 63/27 (2010.01)
A01N 63/38 (2010.01)
A01N 25/08 (2006.01)
A01N 25/24 (2006.01)
A01N 25/26 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

16.06.2022

43 Fecha de publicación de la solicitud:

24.01.2024

71 Solicitantes:

CO2 REVOLUTION, S.L. (100.0%)
C/ La Oliva, 21
31382 Mélida (Navarra) ES

72 Inventor/es:

SESMA FRAGUAS, Juan Carlos

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **COMPOSICIÓN Y MÉTODO PARA EL RECUBRIMIENTO DE SEMILLAS**

57 Resumen:

Composición y método para el recubrimiento de semillas.

La presente invención se encuadra en el campo de la agrobiotecnología. Específicamente, se refiere a una composición y a un método para el recubrimiento de semillas que mejora la germinación de las mismas. La presente invención también se refiere a una semilla recubierta con la composición de la invención y al uso de dicha composición para el recubrimiento de semillas. La composición aquí descrita consta de hongos micorrícicos, bacterias del género *Pseudomonas*, un hongo del género *Trichoderma*, un retenedor de agua, una arcilla, un adherente, un disuasor de fauna y materia orgánica.

ES 2 957 733 A1

DESCRIPCIÓN

Composición y método para el recubrimiento de semillas

5 La presente invención se encuadra en el campo de la biotecnología y más concretamente dentro de la agrobiotecnología. Específicamente, se refiere a una composición y a un método para el recubrimiento de semillas que mejora la germinación de las mismas.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La búsqueda de elementos que ayuden a promover el desarrollo de plantas de forma ecológica se ha convertido en uno de los principales objetivos de la agricultura en la actualidad. Algunos de estos elementos naturales son, por ejemplo, el uso de
15 microorganismos que presentan algún tipo de efecto beneficioso sobre las plantas a las que se asocian o con las que presentan simbiosis.

Los microorganismos beneficiosos para las plantas (MBP), se consideran una alternativa natural para aliviar la presión sobre el medio ambiente resultante de la agricultura convencional. Estos microorganismos pueden ayudar a las plantas a
20 mantener o aumentar la productividad al tiempo que reducen el aporte de agroquímicos, restauran la fertilidad del suelo y/o superan los problemas causados por el estrés abiótico y biótico.

25 Dentro de los MPB destacan dos grupos principales de microorganismos, las bacterias y los hongos del suelo, principalmente las bacterias promotoras del crecimiento de las plantas, los rizobios, los hongos micorrícicos y los hongos del género *Trichoderma*.

La aplicación a gran escala de MBP podría no ser viable o económicamente factible
30 teniendo en cuenta la cantidad de inóculo microbiano necesario por planta, por lo tanto, existe la necesidad de encontrar métodos de inoculación eficientes y efectivos para aplicar estos microorganismos.

El recubrimiento de semillas se ha considerado un método preciso y rentable para la
35 administración de microorganismos. Además, permite la aplicación de los MBP a gran

escala. El recubrimiento microbiano de semillas comprende el uso de otros componentes como aglutinantes o elementos de relleno, que se mezclan con el inóculo de microorganismos. Estos componentes se usan fundamentalmente para mejorar la supervivencia de los microorganismos. Los tipos más utilizados de recubrimiento de
5 semillas son el recubrimiento de película, el peletizado y el incrustado.

El recubrimiento de película utiliza un adhesivo que suele ser un polímero como fijador para adherir los compuestos activos a la semilla, como fungicidas, insecticidas o bioestimulantes. El recubrimiento de película reduce enormemente el polvo nocivo de
10 las semillas tratadas, además de producir una superficie lisa para que las semillas fluyan fácilmente a través del equipo de procesamiento y siembra. El recubrimiento de película no cambia la forma de la semilla y tiene una menor interferencia con la germinación de las semillas y la liberación de los componentes activos.

El peletizado rodea la semilla con una capa que aumenta el tamaño y el peso de la semilla y asegura una forma lisa y uniforme; típicamente una esfera u ovoide. La peletización de las semillas mejora su manejo y la eficiencia de la plantación. La incrustación de semillas es similar a la peletización con la diferencia principal de que las semillas incrustadas retienen más de su forma original. La semilla incrustada está
20 recubierta con una capa más ligera que la peletización, destinada a suavizar y homogeneizar las superficies de la semilla para facilitar su manipulación. El peletizado y la incrustación aumentan la cantidad aplicada de ingredientes activos y mejoran el manejo de las semillas, especialmente de aquellas semillas que tienen formas irregulares.

25 Dependiendo del tipo de recubrimiento, se utiliza un equipo específico. El método más empleado es el que utiliza una bandeja giratoria. Por lo general, consiste en una bandeja redonda inclinada que gira a cámara lenta, donde los materiales se agregan gradualmente, posteriormente se tamizan y finalmente se secan. El recubrimiento de
30 película y la incrustación también se pueden llevar a cabo utilizando un lecho fluidizado, un aparato cilíndrico donde las semillas se mantienen en suspensión por un flujo de aire caliente vertical (de abajo hacia arriba) constante, mientras se rocían con materiales de recubrimiento. Otro dispositivo utilizado para la mayoría de los tipos de recubrimiento de semillas es el recubridor rotativo o rotor-estator, un tambor cilíndrico con dos discos
35 base giratorios, uno cóncavo, cuya rotación hace que las semillas se muevan

constantemente a lo largo de las paredes del tambor, y uno más pequeño que permite la atomización y proyección del recubrimiento a la masa de semilla giratoria.

La mayoría de los estudios sobre MBP aplicados a través del recubrimiento de semillas
5 tienen como objetivo promover el crecimiento, el rendimiento y la protección de los cultivos contra patógenos. Los estudios han demostrado que el recubrimiento de semillas con estos microorganismos puede ayudar a los cultivos a mejorar el establecimiento y la germinación de las plántulas o a lograr altos rendimientos y mejorar la calidad de los alimentos, reduciendo así el uso de fertilizantes químicos.

10

El documento de patente US2019200644A1 divulga formas de producto que comprenden sustratos recubiertos con partículas que llevan agentes activos, métodos de obtención de dichas formas de producto y los usos de estas. El sustrato es una pastilla de abono con un agente activo seleccionado entre pesticidas químicos,
15 biofertilizantes como bacterias vivas, levaduras y hongos, algas, esporas bacterianas vivas, esporas de levadura y esporas de hongos para su uso en la promoción o en la mejora del crecimiento de las raíces y/o de los brotes de las semillas germinadas.

El documento de patente US2014342905A1 describe composiciones microbianas y
20 métodos útiles para la producción de plantas de cultivo. En particular, estas composiciones y métodos son útiles para mejorar el crecimiento de las plantas y/o suprimir el desarrollo de patógenos vegetales y enfermedades patógenas. Las semillas pueden ser recubiertas de manera sustancialmente uniforme con una o más capas de las composiciones microbianas. Al mismo tiempo, la composición puede contener otros
25 agentes capaces de mejorar la germinación y la calidad de los productos o una combinación de ellos, por ejemplo, adherentes, dispersantes y otros nutrientes.

El documento de patente WO2021181422 describe una composición y un proceso para el recubrimiento de material de siembra utilizando esta composición. La composición de
30 biocapa descrita en este documento comprende al menos un cultivo microbiano, un excipiente, un polímero, un ácido orgánico, almidón y un disolvente. Este documento de patente también describe un proceso para recubrir un material de semilla que comprende: mezclar la composición con el cultivo microbiano y un pesticida para obtener la composición de biocapa, añadir la composición de biocapa a un material de
35 semilla y, finalmente, un paso de secado para recubrir el material de semilla, en el que

la adición de la composición de biocapa al material de semilla se realiza en un volumen en el rango de 5 ml/1000g - 100 ml/1000g de semilla. La composición de biocapa proporciona un mayor porcentaje de germinación, mejora la absorción de nutrientes, el vigor de las plántulas y el crecimiento en las semillas recubiertas en comparación con las semillas no recubiertas.

Existen diferentes estudios que se basan en el uso combinado de microorganismos beneficiosos para las plantas con distintos componentes que permiten el recubrimiento de las semillas con el objetivo de mejorar el rendimiento de las plantas y la protección de los cultivos contra patógenos. Sin embargo, existe la necesidad de llevar a cabo una mayor investigación sobre el recubrimiento microbiano de semillas para que pueda tener un uso más amplio.

La investigación sobre la formulación de inoculantes; por ejemplo, la supervivencia y la viabilidad microbiana, la selección de los componentes o los costes de producción, aún está poco explorada. Incluso cuando se considera el mismo tipo de componentes es importante considerar las propiedades químicas y físicas que pueden diferir y dictar la eficiencia del material de recubrimiento como relleno o portador. En la actualidad, uno de los materiales más utilizados como recubrimiento para diversos usos es el alginato, ya que sus gránulos ofrecen la ventaja de no ser tóxicos, además de ser incapaces de abrirse en entornos ácidos, mientras que sí lo hacen con facilidad en entornos alcalinos. Sin embargo, aunque el alginato tiene la capacidad de aumentar la supervivencia bacteriana, también puede obstaculizar la germinación, reducir la vida útil de las semillas recubiertas o aumentar el coste del producto final. La combinación de diferentes MBP también puede ser un desafío, ya que el funcionamiento de los consorcios microbianos y su supervivencia en las semillas recubiertas están influenciados por la especie de la planta y las condiciones de crecimiento.

Por lo tanto, existe la necesidad de encontrar combinaciones de componentes, incluidos microorganismos, y métodos que permitan un mejor recubrimiento y encapsulación de las semillas, que mejoren la germinación de las semillas y la supervivencia de las plantas una vez germinadas.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La capacidad de mejorar la germinación de vegetales es importante dentro de la industria agrícola ya que de esta forma se puede conseguir bien un buen crecimiento de las plantas en regiones poco adecuadas para su desarrollo, o bien mejorar el desarrollo en lugares adecuados dando lugar a una mayor productividad por parte de las plantas,
 5 con el consiguiente beneficio económico. Si estos beneficios se dan, además, reduciendo el uso de fertilizantes químicos, se genera también un beneficio medioambiental.

Existen microorganismos beneficiosos para las plantas (MBP) que pueden tener un
 10 efecto positivo en su crecimiento, aumentando su rendimiento, aportando tolerancia a diferentes tipos de estrés abiótico o biótico o mejorando su germinación. El recubrimiento de las semillas de las plantas con estos microorganismos puede mejorar la germinación y supervivencia de las plantas una vez germinadas.

La presente invención se refiere, en un primer aspecto, a una composición, de ahora en adelante "la composición de la invención", que comprende: al menos un hongo micorrízico, una bacteria del género *Pseudomonas*, un hongo del género *Trichoderma*, un retenedor de agua, una arcilla, un adherente, al menos un disuasor de fauna y materia orgánica.
 20

Los hongos micorrízicos se caracterizan porque para desarrollar su ciclo vital por completo necesitan establecer relaciones simbióticas con las raíces de las plantas vasculares. Esta relación se establece mediante la formación de unas estructuras que permiten el intercambio de nutrientes y que reciben el nombre de micorrizas. Existen
 25 diferentes tipos de micorrizas, entre ellas destacan las endomicorrizas, las ectomicorrizas y las ectendomicorrizas. Las endomicorrizas, se caracterizan por la presencia de hifas en el interior de las células del córtex radical. Las ectomicorrizas, por el contrario, se distinguen porque las hifas del hongo no penetran en el interior de las células del córtex de las raíces. Las ectendomicorrizas se definen por presentar
 30 afinidades con los dos tipos de micorrizas, ectomicorrizas y endomicorrizas.

Los hongos presentes en las ectomicorrizas incluyen, pero sin limitar, a los géneros *Rhizopogon*, *Cenococcuym*, *Cortinarius*, *Thelefora*, *Pisolithus*, *Lactarius* y *Suillus*. Los hongos presentes en las ectendomicorrizas incluyen, pero sin limitar a, el género
 35 *Endogone*.

El término “género” se refiere a la categoría de la clasificación biológica (categoría taxonómica) que se ubica entre la familia y la especie y que comprende una o más especies morfológicamente similares relacionadas filogenéticamente. Por “categoría taxonómica” se entiende el nivel de jerarquía utilizado para la clasificación de los organismos. En la presente invención se entiende por “especie” una clasificación taxonómica inferior al concepto de género. Más concretamente se refiere a cada uno de los subgrupos en los que se dividen los géneros.

- 5 En una realización particular, el hongo micorrízico de la composición de la invención es seleccionado de la lista de géneros que consiste en: *Pisolithus*, *Rhizopigon*, *Lactarius*, *Tuber* o cualquiera de sus combinaciones.

- 15 En una realización más particular, el hongo micorrízico es seleccionado de la lista que consiste en: *Pisolithus tinctorius*, *Rhizopigon roseolus*, *Lactarius deliciosus*, *Tuber spp* o cualquiera de sus combinaciones.

- 20 *Pisolithus tinctorius*, *Rhizopigon roseolus* y *Tuber spp* son hongos micorrízicos subterráneos que tienen la capacidad de aumentar la supervivencia de las plantas cultivadas en condiciones adversas. Son capaces de micorrizar plantas en sus primeros estadios, proteger la radícula frente a patógenos, potenciar la resiliencia de la plántula por una mayor resistencia al estrés hídrico y mejorar la absorción de nutrientes. *Lactarius deliciosus*, *Rhizopigon roseolus* y *Tuber spp* son especies comestibles y comercializables y se caracterizan porque pueden micorrizar plantas coníferas, por ejemplo, pero sin limitarse a ello, las especies de pino y pseudotsuga.

En otra realización particular, la bacteria del género *Pseudomonas* de la composición de la invención es de la especie *Pseudomonas fluorescens*.

- 30 El género *Pseudomonas* se caracteriza por ser un género de bacilos rectos o ligeramente curvados, Gram negativos, oxidasa positivos, aeróbicos estrictos, aunque en algunos casos pueden utilizar el nitrato como aceptor de electrones. La especie *Pseudomonas fluorescens* es capaz de ayudar a la planta en su crecimiento inicial con un efecto biofertilizante al mismo tiempo que realiza una sinergia en la micorrización de la planta con los hongos micorrízicos. La especie *Pseudomonas fluorescens* estimula el

crecimiento de la planta mediante la producción de antibióticos, con lo que evita enfermedades a la planta producidas por otras bacterias y hongos patógenos. También acelera la germinación de las semillas y el crecimiento de las plantas por la síntesis de hormonas, como auxinas, giberelinas y citoquinas, y otras sustancias, como promotores
5 específicos de crecimiento.

Las auxinas son un grupo de fitohormonas que funcionan como reguladoras del crecimiento vegetal (esencialmente provocan la elongación de las células) y pueden ser naturales (sintetizadas por una célula vegetal de manera silvestre) o artificiales
10 (sintetizadas en el laboratorio). Ejemplos de auxinas naturales incluyen, sin limitar a, ácido indol-3-acético (AIA), ácido 4-cloroindol-3-acético (4-Cl-IAA) y ácido fenilacético. Ejemplos de auxinas artificiales incluyen, sin limitar a, ácido indolbutírico (AIB) y ácido naftalenacético (ANA).

15 La giberelina es una fitohormona producida en la zona apical, frutos y semillas, cuyas principales funciones son la interrupción del período de latencia de las semillas, haciéndolas germinar, la inducción del desarrollo de yemas y frutos y la regulación del crecimiento longitudinal del tallo. Ejemplos de giberelinas incluyen, sin limitar a, el ácido giberélico (GA3), giberelina A1 (GA1) y giberelina A4 (GA4).

20 Las citocinas son fitohormonas que promueven la división y la diferenciación celular. Ejemplos de citocininas incluyen, sin limitar a, la cis- y trans-zeatina, la isopenteniladenina, la dihidrozeatina (con sus respectivos derivados glicosilados), la benciladenina, la kinetina y la topolina.

25 En otra realización particular, el hongo del género *Trichoderma* de la composición de la invención es de la especie *Trichoderma viride*.

El género *Trichoderma* es un género de hongos de la familia Hypocreaceae. Este género
30 se caracteriza por tener un efecto de control biológico frente a patógenos. El género *Trichoderma* protege el suelo de los cultivos de dos maneras: combatiendo la aparición de plagas y de otros hongos parasitarios en el medio de cultivo de la planta y estableciendo una relación con la zona radicular de la planta mediante la cual estimula el correcto desarrollo de las raíces trabajando en sinergia con los hongos micorrícicos.

35

La especie *Trichoderma viride* es de amplio espectro, permite controlar eficientemente hongos fitopatógenos como, por ejemplo, *Rhizoctonia*, *Pythium*, *Fusarium* y *Armillaria*, y es completamente inocua para los animales, incluyendo a los humanos. Además, promueve el crecimiento de las plantas y degrada compuestos tóxicos presentes en el
5 suelo.

En otra realización particular, el retenedor de agua de la composición de la invención es un hidrogel compuesto por Poliacrilato de Potasio, preferiblemente en polvo. Los retenedores de agua se aplican para la retención de agua y nutrientes en suelos,
10 mejorando la gestión del agua y el crecimiento de las plantas, actuando como reservorio de agua y liberándola según las necesidades de las plantas. El hidrogel compuesto por Poliacrilato de Potasio es ambientalmente seguro y biodegradable.

En otra realización particular, el adherente de la composición de la invención es un
15 polímero sintético o natural, preferiblemente seleccionado de la lista que consiste en: alcohol polivinílico, acetato polivinílico, metilcelulosa, carboximetilcelulosa, maltodextrina, goma arábica, goma xantana o cualquiera de sus combinaciones, más preferiblemente goma xantana.

20 El término "adherente" se refiere al componente que puede mantener unidos dos o más componentes por contacto superficial. La selección del tipo y la concentración adecuados de adherente es crucial para la germinación de las semillas, el desarrollo de las plantas y la viabilidad de los microorganismos aplicados. La goma xantana es un polisacárido que se extrae de una bacteria y se presenta en un polvo blanquecino.

25 En otra realización particular, la arcilla de la composición de la invención es seleccionada de la lista que consiste en: atapulguita, sepiolita, arcillas caoliniticas, o cualquiera de sus combinaciones, preferiblemente atapulguita.

30 Las arcillas permiten alojar los hongos y las bacterias descritos en párrafos anteriores, que hacen una importante labor en la ayuda al desarrollo de las plántulas. Además, realizan una importante labor de retención de agua, aporte de nutrientes y alojamiento de la radícula en el suelo.

35

En otra realización particular, el disuasor de fauna de la composición de la invención es extracto de chile, perfume de hombre comercial o una combinación de ambos, preferiblemente una combinación de ambos.

- 5 El término "disuasor de fauna" se refiere a aquel componente que tiene la capacidad de ahuyentar a los animales. Tanto el extracto de chile, como el perfume de hombre comercial tienen un efecto disuasorio muy satisfactorio y significativo.

- En otra realización particular, la materia orgánica de la composición de la invención es
10 fibra de madera, preferiblemente fibra de madera cribada de menos de 0,5 mm.

- En otra realización particular, la composición de la invención comprende las siguientes concentraciones: entre 0,2 y 0,5 gramos de esporas de hongo micorrízico, entre 0,3 y 0,8 ml de bacterias del género *Pseudomonas*, entre 0,1 y 0,3 gramos del hongo del
15 género *Trichoderma*, entre 0,1 y 0,3 gramos de retenedor de agua, entre 0,05 y 0,1 gramos de adherente, entre 2,0 y 2,8 gramos de arcilla, entre 0,1 y 0,3 gramos de extracto de chile, entre 0,2 y 0,5 ml de perfume comercial y entre 0,2 y 0,6 gramos de materia orgánica.

- En otra realización más particular, la composición de la invención comprende las siguientes concentraciones: 0,3 gramos de esporas de hongo micorrízico, 0,5 ml de bacterias del género *Pseudomonas*, 0,1 gramos del hongo del género *Trichoderma*, 0,1 gramos de retenedor de agua, 0,05 gramos de adherente, 2,4 gramos de arcilla, 0,1 gramos de extracto de chile, 0,3 ml de perfume comercial y 0,4 gramos de materia
25 orgánica.

- Los hongos micorrízicos se añaden a la mezcla de la invención preferiblemente en forma de spora. El término "spora" se refiere a la célula reproductora producida en los esporangios de los hongos, ya sea asexualmente o como resultado de un proceso de
30 reproducción sexual, generalmente haploide y unicelular, que al mismo tiempo permite la dispersión y la supervivencia por largo tiempo (dormancia) en condiciones adversas.

- En otra realización particular, la composición de la invención puede comprender además otros elementos necesarios para la germinación, el desarrollo y el crecimiento de la
35 planta. Así, dicha composición puede opcionalmente comprender, aunque sin limitarnos,

fuentes de carbono, sales minerales y/o nutrientes orgánicos e inorgánicos. La composición puede comprender también otros elementos, como biofertilizantes o bioestimulantes que favorezcan la germinación, al tiempo que protejan a las semillas y eviten que se sequen. El término "biofertilizante" tal y como se utiliza en la presente invención se refiere a sustancias o mezclas de las mismas producidas por organismos o a los mismos organismos, los cuales, ayudan al crecimiento y/o desarrollo de las plantas. El término "bioestimulante" en la presente invención se refiere a sustancias y/o microorganismos que mejoran la nutrición aportada por el fertilizante, potenciando la absorción de nutrientes, ayudando al cultivo frente a condiciones de estrés y actuando sobre los procesos bioquímicos que mejoran el metabolismo de la planta, haciendo que se obtengan producciones de mayor calidad y cantidad.

Adicionalmente, la composición de la invención puede comprender compuestos que participen en el desarrollo vegetal, tales como las fitohormonas. Las fitohormonas son sustancias producidas por las células vegetales que intervienen en multitud de procesos biológicos y que son capaces de regular los fenómenos fisiológicos de las plantas. Ejemplos de fitohormonas que pueden emplearse en la composición de la invención incluyen, sin limitar a, auxinas, giberelinas y citocinas. Los términos "auxinas", "giberelinas" y "citocinas" han sido definidos o explicados en párrafos anteriores, y dicha definición es aplicable al presente aspecto inventivo. Además, la composición de la invención también puede comprender macroelementos y microelementos que proporcionen nutrientes a las plantas.

Los macroelementos son aquellos elementos que se expresan como % en la planta o en g/100g. Los principales son nitrógeno, fósforo, potasio, calcio, magnesio y azufre. Los microelementos se expresan como ppm. (parte por millón) = mg/Kg = mg /1000g, y los principales son hierro, cinc, cobre, manganeso, molibdeno, boro y cloro. Existen además otros nutrientes beneficiosos como por ejemplo el silicio, el sodio y el cobalto que fortalecen algunas características de las plantas en diferentes especies.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de la composición de la invención para el recubrimiento de semillas.

El recubrimiento de semillas es el proceso por el que se recubre la superficie de la semilla con materiales exógenos (sólidos y/o líquidos), formando una capa más o menos

continua, con el objetivo de proporcionar y/o liberar compuestos activos como reguladores de crecimiento, micronutrientes e inóculos microbianos, que protejan a la semilla frente a fitopatógenos y permitan una mejora de la germinación y del crecimiento de la planta.

5

Los tipos de recubrimiento de semillas son ampliamente conocidos en el estado de la técnica y cualquiera de ellos puede emplearse en el contexto de la presente invención. La elección del tipo de recubrimiento (por ejemplo, recubrimiento tipo película, incrustación o peletizado), dependerá de los requisitos del cultivo. En una realización preferida del uso de la composición de la invención para el recubrimiento de semillas, dicho recubrimiento es del tipo biopelícula (*biofilm*).

10

Las técnicas y los equipos para el recubrimiento de semillas también son ampliamente conocidos en el estado de la técnica, y cualquiera de ellos puede emplearse en el contexto de la presente invención. No obstante, en una realización particular, el recubrimiento de la semilla puede realizarse empleando una bandeja giratoria, un lecho fluidizado o un recubridor rotativo (rotor-estator).

15

Otro aspecto de la presente invención se refiere a una semilla recubierta con la composición de la invención, de ahora en adelante "la semilla de la invención".

20

La semilla de la invención puede pertenecer a cualquier planta como, por ejemplo, pero sin limitar a, plantas forestales, de cultivo, ornamentales y forrajeras.

25

En una realización particular, la semilla de la invención además está encapsulada en un material semifluido que comprende fibra de madera, preferiblemente que comprende el producto comercial ForestGold®. El producto comercial ForestGold® comprende fibra de madera y turba en una proporción de 80/20.

30

En otra realización particular, el material semifluido además comprende agua, quitosano y goma xantana.

La fibra de madera junto con el agua, el quitosano y la goma xantana permite crear un material de una textura flexible pero resistente, que hace que la semilla de la invención recubierta con la composición de la invención pueda ser dispersada en el campo

35

utilizando varios medios, como, por ejemplo, pero sin limitar a, drones, quads, robots, máquinas de siembra.

5 En otra realización particular, el encapsulado es de al menos 1cm³ de grosor alrededor de la semilla de la invención.

En la presente invención, el término "encapsular" o "encapsulado" se refiere al proceso por el que a la semilla recubierta con la composición de la invención se le añaden otros materiales exógenos, formando una cápsula, con el objetivo de mejorar su manejo y/o
10 dispersión, y proteger a la semilla frente a diferentes tipos de estrés biótico y abiótico.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método, de ahora en adelante "el método de la invención", para el recubrimiento de semillas, que mejora la germinación de las mismas, y que comprende los siguientes pasos:

- 15 i) preparar la composición de la invención;
- ii) añadir la mitad de la composición preparada en (i) a la semilla en presencia de agua y homogeneizar;
- iii) añadir la otra mitad de la composición preparada en (i) a la semilla resultante del paso (ii) en presencia de agua y homogenizar;
- 20 iv) dejar secar la semilla resultante del paso (iii); y
- v) preferiblemente repetir los pasos (i) a (iv) al menos una vez más, más preferiblemente al menos cuatro veces más.

Como entiende el experto en la materia, el tamaño del recubrimiento de la semilla es regulable, por lo que, tal y como se describe en el paso (v) del método de la invención,
25 se pueden repetir los pasos (i) a (iv) con el objetivo de conseguir un recubrimiento de mayor tamaño. Preferiblemente, se repiten los pasos (i) a (iv) del método de la invención al menos una vez más, y más preferiblemente se repiten al menos cuatro veces más.

30 En otra realización particular, el secado del paso (iv) del método de la invención se realiza a una temperatura de entre 20 y 25 °C, preferiblemente a 22 °C.

En otra realización particular, el método de la invención comprende una etapa adicional (vi) de encapsulado de la semilla resultante en un material semifluido que comprende
35 fibra de madera, preferiblemente que comprende el producto comercial ForestGold®.

El término "encapsular" o "encapsulado" ya ha sido definido o explicado en párrafos anteriores y dicha definición es aplicable al presente aspecto inventivo.

- 5 En otra realización particular, el material semifluido además comprende agua, quitosano y goma xantana.

En otra realización particular, el encapsulado del paso (vi) se realiza hasta aportar al menos 1 cm³ de material semifluido alrededor de la semilla.

10

Como entiende el experto en la materia, se pueden emplear diferentes sustratos para encapsular la semilla. Estos sustratos tienen que permitir un buen alojamiento de la semilla en el suelo y un buen desarrollo de la radícula. En el método de la invención, el sustrato empleado para la encapsulación de la semilla es la fibra de madera, pero
15 pueden emplearse alternativa o adicionalmente otros sustratos como, por ejemplo, pero sin limitar a: turba (turba rubia, turba negra), turba cribada, turba no cribada, vermiculita o perlita.

20

En otra realización particular, el método de la invención además comprende un paso adicional al final del método donde dicho paso comprende escarificar las semillas resultantes en peróxido de hidrógeno, preferiblemente al 20-40%, más preferiblemente al 30%, y/o hidratar las semillas resultantes en agua destilada, preferiblemente durante al menos 24h.

25

La escarificación es una técnica que se lleva a cabo con el fin de acortar el tiempo de germinación de las semillas. Se trata de una abrasión de la pared exterior de la semilla (tegumento) para permitir que el endospermo entre en contacto con el aire y el agua. Se puede realizar por abrasión, con productos químicos, o de forma física o mecánica empleando un cuchillo, aguja o papel de lija, teniendo cuidado de no dañar el interior de
30 la semilla. En la presente invención, la escarificación de las semillas se hace con productos químicos; preferiblemente se hace una inmersión de las semillas en peróxido de hidrógeno (H₂O₂), más preferiblemente a una concentración de entre el 20% y el 40%, ambos extremos incluidos, aún más preferiblemente a una concentración del 30%, más preferiblemente en agitación. La escarificación de las semillas puede ser más o
35 menos agresiva, dependiendo del tiempo de inmersión de las semillas en H₂O₂. El que

sea más o menos agresiva depende del tamaño de la semilla, es decir, cuanto más pequeña sea la semilla, menos tiempo durará la inmersión en H₂O₂.

EJEMPLOS

5

A continuación, se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que ponen de manifiesto la efectividad de la composición y del método de la invención.

10 1. Componentes

Los inventores han llevado a cabo una búsqueda de componentes que mejoren la germinación y la supervivencia de las plantas una vez germinadas.

1.1. Hongos micorrizicos

15 Existe una gran variedad de hongos micorrizicos que colonizan las plantas. Los inventores han seleccionado cuatro hongos para su incorporación en las semillas. Estos hongos son: *Pisolithus tinctorius*, *Rhizopogon roseolus*, *Lactarius deliciosus*, y *Tuber spp.*

20 Estos hongos han sido seleccionados por ser hongos pineros, en especial *Pisolithus* y *Rhizopogon*. Son capaces de micorrizar plantas en sus primeros estadios, proteger a la radícula frente a patógenos, potenciar la resiliencia de la plántula por una mayor resistencia al estrés hídrico, mejorar la absorción de nutrientes y crecer más. Además, *Rhizopogon roseolus*, *Lactarius deliciosus* y *Tuber spp* son especies comestibles y
25 comercializables.

1.2. Bacterias

Las bacterias seleccionadas por los inventores han sido bacterias del género *Pseudomonas*, más concretamente de la especie *Pseudomonas fluorescens*. *P.*
30 *fluorescens* es capaz de ayudar a la planta en su crecimiento inicial con un efecto biofertilizante al mismo tiempo que realiza una sinergia en la micorrización de la planta con los hongos mencionados en el apartado anterior.

1.3. Hongos del género *Trichoderma*

35 Los inventores han seleccionado la especie *Trichoderma viride* por el efecto de control

biológico frente a patógenos que tiene este hongo. Además, *Trichoderma viride* tiene un amplio espectro de actuación.

1.4. Materia orgánica

- 5 Los inventores han seleccionado diferentes tipos de materia orgánica para ser testados como aditivo. Estas materias son: fibra de madera cribada <0.5 mm, turba cribada <0.5 mm, polvo de mazorca de maíz 250 μ o biocarbón 250 μ .

Los inventores realizaron varias pruebas de adherencia y encapsulado con estos tipos
10 de materia orgánica y con el resto de los componentes definidos en este apartado y, finalmente, seleccionaron la fibra de madera por generar el mejor resultado, además de ser el producto más sostenible y con certificado ecológico.

1.5. Disuasorios de fauna

- 15 Los inventores han seleccionado dos aditivos como disuasorios de fauna ecológicos y de residuo 0; el extracto de chile y el perfume de hombre comercial. Los resultados obtenidos con los dos productos fueron similares; presentaban un efecto disuasorio muy satisfactorio y significativo sobre las semillas no tratadas. Sobre 100 semillas colocadas en un entorno con gran número de roedores y conejos, las semillas tratadas tuvieron un
20 45% menos de depredación.

1.6. Geles y retenedores

En el estado de la técnica estos productos ya han sido testados en numerosos ensayos. Los inventores han decidido utilizar un hidrogel compuesto por Poliacrilato de Potasio,
25 preferiblemente en polvo.

1.7. Adherentes

Entre los muchos adherentes que se conocen en el estado de la técnica, entre ellos, el alcohol polivinílico, el acetato polivinílico, la metilcelulosa, carboximetilcelulosa,
30 maltodextrina, goma arábica o goma xantana; los inventores han elegido la goma xantana como adherente por ser un producto económico y con una capacidad adherente elevada.

1.8. Arcillas

- 35 Las arcillas permiten alojar los inóculos de los hongos y bacterias que hacen una

importante labor ayudando al desarrollo de las plántulas. Además, realizan una importante labor de retención de agua, aporte de nutrientes y permiten el alojamiento de la radícula en el suelo. Los inventores seleccionaron tres tipos de arcilla para ser testadas: atapulguita, sepiolita y arcillas caoliníticas. El producto final encapsulado fue similar con las tres arcillas seleccionadas, aunque el mejor encapsulado se obtuvo con atapulguita.

2. Técnicas de empildoramiento

Los inventores han realizado un gran número de ensayos de empildorado añadiendo diferentes concentraciones de los componentes mencionados en el apartado anterior. Han utilizado una técnica similar (biopelícula) a la que se utiliza para el recubrimiento de semillas agrícolas con fungicidas, pero han introducido una serie de modificaciones e innovaciones las cuales se describen a continuación.

En primer lugar, para realizar el recubrimiento de semillas se preparó una mezcla con diferentes aditivos para probar su recubrimiento. Las proporciones de cada aditivo para 30 g de semillas fueron las siguientes:

- 0.3 g de esporas de *Pisolithus tinctorius*, *Rhizopigon roseolus*, *Lactarius deliciosus* y *Tuber spp* al 33%.
- 0.5 ml de la bacteria *Pseudomonas fluorescens*.
- 0.1 g del hongo *Trichoderma viride*.
- 0.4 g de fibra de madera.
- 0.1 g de gel retenedor.
- 0.05 g de goma xantana.
- 2.4 g de atapulguita.
- 0.1 g de extracto de chile
- 0.3 ml de perfume comercial.

Una vez preparada la mezcla, se introdujeron las semillas en un recipiente estanco y se les añadió 1.1 ml de agua, se homogeneizó mediante agitación, y posteriormente se añadió la mitad de la mezcla preparada previamente. Se agitó hasta conseguir homogeneidad y se repitió el mismo proceso con el agua y la mezcla de aditivos restantes.

Se dejaron secar las semillas a una temperatura de 22 °C, y una vez secas, se llevó a

cabo el mismo proceso cuatro veces más con el fin de crear un recubrimiento más grueso.

3. Desarrollo de una cápsula biodegradable

- 5 Los inventores han desarrollado además una nueva cápsula biodegradable, definiendo así un nuevo producto con una elevada eficiencia.

Se testaron un gran número de encapsulados de semillas de todo tipo. Para que la semilla tuviera un buen alojamiento en el suelo y un buen desarrollo de la radícula debía
10 contener algo lo más similar posible a lo que encuentran las semillas en un vivero, donde las condiciones son las óptimas para la germinación de las semillas. De esta forma, los inventores comenzaron a trabajar con turbas y sustratos para la fabricación de la cápsula biodegradable. Tras realizar ensayos con distintos tipos de turba (turba rubia, turba negra), cribada y no cribada, vermiculita y perlita, optaron por utilizar un producto
15 comercial basado en la fibra de madera. Este producto es sostenible y se genera a partir de madera y no de turba, que es un producto extractivo no sostenible. Así, los inventores llevaron a cabo los ensayos en los que generaron una cápsula de fibra de madera usando como sustrato el producto denominado ForestGold® producido por la empresa Pindstrup. Con esta fibra se generó un polímero con la adición de agua, quitosano y
20 goma xantana que permitió crear un material de una textura flexible, pero resistente, capaz de ser dispersado en el campo por diferentes medios como, por ejemplo, drones o máquinas de siembra.

El resultado final consistió en una semilla encapsulada en un biomaterial semifluido
25 capaz de alojar no solo la semilla sino los aditivos anteriormente testados con éxito. El tamaño del encapsulado es regulable, pero supone aportar 1 cm³ de biomaterial alrededor de la semilla conteniendo los hongos micorrícicos, las bacterias, los hongos del género *Trichoderma*, los retenedores de agua, las arcillas, los disuasorios de fauna y la materia orgánica en un elevado porcentaje (90% en peso).

30 Los ensayos de germinación realizados con este encapsulado han dado un resultado del 100% de fiabilidad, es decir, han permitido la germinación del 100% de las semillas tratadas con esta técnica, siempre teniendo en cuenta la capacidad germinativa de cada lote de semillas utilizado.

35

4. Nuevos sistemas de pregerminación

Los inventores han utilizado dos técnicas para los ensayos de pregerminación.

4.1. Escarificación con peróxido de hidrógeno

- 5 Los inventores han realizado ensayos con tiempos diferentes para distintas especies. En todos los casos se realizó una inmersión de las semillas en H₂O₂ al 30% de concentración en agitación y posteriormente se hizo un lavado con agua destilada.

- 10 Para *Pinus pinea* y *Pinus pinaster* se hizo una escarificación de 20 minutos. Mientras que, para *Pinus halepensis*, *Pinus nigra*, *Pinus sylvestris* y *Pinus radiata* se realizó una aplicación menos agresiva, de 3 minutos, debido al pequeño tamaño de las semillas.

- Este sistema tuvo unos resultados muy dispersos de forma general, pero supuso una mejora en la germinación de las semillas de *P. pinea* y *P. pinaster* del 9%.

15

4.2. Hidratación a 24 horas en agua destilada

Se trata de un tratamiento muy común, pero con un efecto muy positivo con el objetivo de conseguir la germinación rápida de las semillas.

- 20 En ambos casos se vieron importantes diferencias en la velocidad y desarrollo en la germinación. Como dato medio se obtuvo una reducción del 64% en el tiempo de germinación de la semilla.

REIVINDICACIONES

1. Composición que comprende: al menos un hongo micorrícico, una bacteria del género *Pseudomonas*, un hongo del género *Trichoderma*, un retenedor de agua, una arcilla, un adherente, al menos un disuasor de fauna y materia orgánica.
2. Composición según la reivindicación 1, donde el hongo micorrícico es seleccionado de la lista de géneros que consiste en: *Pisolithus*, *Rhizopigon*, *Lactarius*, *Tuber* o cualquiera de sus combinaciones.
3. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, donde el hongo micorrícico es seleccionado de la lista que consiste en: *Pisolithus tinctorius*, *Rhizopigon roseolus*, *Lactarius deliciosus*, *Tuber spp* o cualquiera de sus combinaciones.
4. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la bacteria del género *Pseudomonas* es de la especie *Pseudomonas fluorescens*.
5. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde el hongo del género *Trichoderma* es de la especie *Trichoderma viride*.
6. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde el retenedor de agua es un hidrogel compuesto por Poliacrilato de Potasio, preferiblemente en polvo.
7. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde el adherente es un polímero sintético o natural, preferiblemente seleccionado de la lista que consiste en: alcohol polivinílico, acetato polivinílico, metilcelulosa, carboximetilcelulosa, maltodextrina, goma arábica, goma xantana o cualquiera de sus combinaciones, más preferiblemente goma xantana.
8. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde la arcilla es seleccionada de la lista que consiste en: atapulguita, sepiolita, arcillas caolínificas, o cualquiera de sus combinaciones, preferiblemente atapulguita.

9. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde el disuasor de fauna es extracto de chile, perfume de hombre comercial o una combinación de ambos, preferiblemente una combinación de ambos.
- 5 10. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde la materia orgánica es fibra de madera, preferiblemente fibra de madera cribada de menos de 0,5 mm.
- 10 11. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que comprende las siguientes concentraciones: entre 0,2 y 0,5 gramos de esporas de hongo micorrícico, entre 0,3 y 0,8 ml de bacterias del género *Pseudomonas*, entre 0,1 y 0,3 gramos del hongo del género *Trichoderma*, entre 0,1 y 0,3 gramos de retenedor de agua, entre 0,05 y 0,1 gramos de adherente, entre 2,0 y 2,8 gramos de arcilla, entre 0,1 y 0,3 gramos de extracto de chile, entre 0,2 y 0,5 ml de perfume comercial y
15 entre 0,2 y 0,6 gramos de materia orgánica.
- 20 12. Composición según la reivindicación 11, que comprende las siguientes concentraciones: 0,3 gramos de esporas de hongo micorrícico, 0,5 ml de bacterias del género *Pseudomonas*, 0,1 gramos del hongo del género *Trichoderma*, 0,1 gramos de retenedor de agua, 0,05 gramos de adherente, 2,4 gramos de arcilla, 0,1 gramos de extracto de chile, 0,3 ml de perfume comercial y 0,4 gramos de materia orgánica.
- 25 13. Uso de la composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 para el recubrimiento de semillas.
- 30 14. Semilla recubierta con la composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.
- 35 15. Semilla según la reivindicación 14 que además está encapsulada en un material semifluido que comprende fibra de madera, preferiblemente que comprende el producto comercial ForestGold®.
16. Semilla según la reivindicación 15, donde el material semifluido además comprende agua, quitosano y goma xantana.

17. Semilla según cualquiera de las reivindicaciones 15 o 16, donde el encapsulado es de al menos 1cm³ de grosor.
- 5 18. Método para el recubrimiento de semillas que comprende los siguientes pasos:
- i) preparar una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12;
 - ii) añadir la mitad de la composición preparada en (i) a la semilla en presencia de agua y homogeneizar;
 - 10 iii) añadir la otra mitad de la composición preparada en (i) a la semilla resultante del paso (ii) en presencia de agua y homogenizar;
 - iv) dejar secar la semilla resultante del paso (iii); y
 - v) preferiblemente repetir los pasos (i) a (iv) al menos una vez más, más preferiblemente al menos cuatro veces más.
- 15 19. Método según la reivindicación 18, donde el secado del paso (iv) se realiza a una temperatura de entre 20 y 25 °C, preferiblemente a 22 °C.
- 20 20. Método según cualquiera de las reivindicaciones 18 o 19, que comprende una etapa adicional (vi) de encapsulado de la semilla resultante en un material semifluido que comprende fibra de madera, preferiblemente que comprende el producto comercial ForestGold®.
- 25 21. Método según la reivindicación 20, donde el material semifluido además comprende agua, quitosano y goma xantana.
- 30 22. Método según cualquiera de las reivindicaciones 20 o 21, donde el encapsulado del paso (vi) se realiza hasta aportar al menos 1 cm³ de material semifluido alrededor de la semilla.
- 35 23. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 18 a 22, que además comprende un paso adicional al final del método donde dicho paso comprende escarificar las semillas resultantes en peróxido de hidrógeno, preferiblemente al 20-40%, más preferiblemente al 30%, y/o hidratar las semillas resultantes en agua destilada, preferiblemente durante al menos 24h.



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA

- 21 N.º solicitud: 202230529
22 Fecha de presentación de la solicitud: 16.06.2022
32 Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

5 Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	66 Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	US 2019307056 A1 (REECE et al.) 10/10/2019, párrafos 7, 22, 33, 38, 70, 77, 85, 87, 88, 103, 105	1-14, 18, 19
Y		15, 17, 20, 22, 23
X	CN 110622967 A (BEAUTIFUL LAND BEIJIN ECOL. ENV. ENG TECH RES INST.) 31/12/2019 todo el documento.	1-14
X	US 5300127 A (WILLIAMS PAUL M) 05/04/1994 columna 2, línea 24-columna 3, línea 42; reivindicación 1.	1-14, 18, 19
Y	US 2579735 A (BURGESSER FREDERICK W) 25/12/1951, reivindicación 1, columna 2	15, 17, 20, 22
Y	LIZÁRRAGA-PAULÍN E-G. et al. Maize seed coatings and seedling sprayings with chitosan and hydrogen peroxide: their influence on some phenological and biochemical behaviors. Journal of Zhejiang University. Science. B China, 2013, vol. 14, páginas 87 - 96, ISSN 1862-1783 (Electronic), DOI: 10.1631/jzus. B1200270 pubmed:23365007	23
A	WO 2018128986 A1 (MONSANTO TECHNOLOGY LLC) 12/07/2018, párrafos 72, 82, 86-88	2-5
A	PEARSON D. E et al. Spicing up restoration: can chili peppers improve restoration seeding by reducing seed predation.? Restoration Ecology,2019, vol. 27, páginas 254-260, ISSN 1061-2971(print) ISSN 1526-100X(electronic), DOI:10.1111/rec.12862	9

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
03.03.2023

Examinador
A. I. Polo Diez

Página
1/2

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A01C1/06 (2006.01)

A01N63/27 (2020.01)

A01N63/38 (2020.01)

A01N25/08 (2006.01)

A01N25/24 (2006.01)

A01N25/26 (2006.01)

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

A01C, 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, INTERNET, BIOSIS, CAPLUS