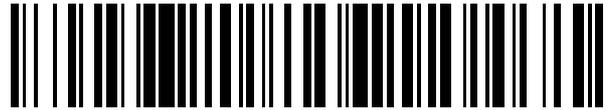


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 533 526**

51 Int. Cl.:

A01C 1/06

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.11.2010 E 10366006 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.12.2014 EP 2345319**

54 Título: **Proceso para proporcionar oligoelementos cerca de las residuoesferas o zonas del suelo que rodean los residuos de cultivo**

30 Prioridad:

18.01.2010 FR 1000165

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

10.04.2015

73 Titular/es:

**AGRONUTRITION (100.0%)
3 Avenue de L'Orchidée Parc Activestre
31390 Carbonne , FR**

72 Inventor/es:

CLAUDE, PIERRE-PHILIPPE

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 533 526 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Proceso para proporcionar oligoelementos cerca de las residuoesferas o zonas del suelo que rodean los residuos de cultivo

Campo técnico de la invención

El campo de la invención es el de materiales fertilizantes, y de forma más particular el de los suplementos de oligoelementos y biofertilizaciones (azoto)bacterianas destinadas a los cultivos agrícolas y de forraje.

Estado de la técnica

El molibdeno en producción vegetal

El molibdeno (Mo) desempeña un papel en la producción vegetal (Kaiser *et al.* 2005) como cofactor enzimático de varios metabolismos, incluyendo nitratos y nitrógeno diatómico. El Mo también desempeña un papel en la rizosfera a través de su interacción con ciertas bacterias que favorecen el crecimiento de las plantas (BFCP; El-Samad *et al.* 2005).

Según Loué (1993), de una manera general, los cereales (trigo, cebada, avena y centeno) son poco sensibles a las deficiencias de Zn, B, Mo y más sensibles a las deficiencias de Mn y Cu. Según Loué 1993, la deficiencia de Mo tiene muy poca importancia en Poaceae (gramíneas); no se ha detectado deficiencia de Mo en cereales en Francia. Dicho de este modo, debido a la implicación de la nitrato reductasa – enzima que contiene molibdeno implicada en la asimilación del nitrógeno por la planta, algunos autores (obra citada de Loué 1993) fueron capaces de detectar defectos de la fertilización con Mo en los rendimientos del cereal, pero ésto solamente en el caso de suelos muy pobres en Mo extraíble; en cereales, las deficiencias de Mo no se deberían manifestar más que en suelos con menos de 10 ng (*nanogramo*) de Mo por g de suelo. Las necesidades de Mo del maíz son muy bajas; si existen carencias, es sobre todo a nivel de las semillas que se podría manifestar si los contenidos de Mo son inferiores a 0,02 ppm, umbral crítico después de todo relativamente bajo. Por último, y con respecto a lo que concierne a las herbáceas, los contenidos de oligoelementos objetivos (de preferencia) dependen sobre todo de las necesidades de la ración animal. Sin embargo, para el Mo, los umbrales de deficiencia vegetal y de carencia animal son ambos de aproximadamente 0,1 ppm (100 ppb), mientras que el umbral de toxicidad animal es de 3 ppm (3000 ppb), umbral fácilmente franqueable – al menos por el raigrás (*Lolium spp.*).

Por lo tanto, es razonable decir que en la producción de cereales y maíz, o incluso más generalmente en lo que respecta al cultivo de herbáceas Poaceae, esta protección frente a posibles carencias en el suministro de Mo al suelo, follaje y/o semillas es a priori poco o nada defendible económicamente. A los ojos del experto en la materia, justifica en este momento este estado de la técnica la deficiencia del Mo como tratamiento de semillas de Poaceae, incluso de forma más general de todas las semillas no Fabaceae.

El molibdeno en microbiología de los suelos

El metabolismo azotobacteriano se ve afectado por la disponibilidad de molibdeno (Mo), y en menor medida del hierro (Fe), incluso del vanadio (V), cofactores del complejo enzimático de nitrogenasa responsable de la reducción del nitrógeno diatómico (Igarashi y Seefeldt 2003 ; Loveless *et al.* 1999). Esta actividad enzimática es fuente de nitrógeno reducido asimilable por la planta y/o ciertas fitohormonas, en particular ciertos ácidos indol acéticos (IAA), o auxinas. De hecho, la mayoría de las 50 enzimas de molibdeno, es decir aproximadamente un 90 %, son exclusivamente bacterianas (Mendel 2007). De éstas, solamente la nitrogenasa consta de un factor de Mo que no está unido a una molécula ptérica (Hansch y Mendel 2002).

En situaciones ecológicas en las que la tasa de producción de biomasa es moderada, la disponibilidad de Mo en los suelos por lo general no es limitante. Sin embargo, en situaciones agrícolas, sobre todo si se aumenta la actividad azotobacteriana tras la incorporación al suelo de residuos de cultivos pajizos y/o radiculares, incluso por la bacterización azotobacteriana del mismo, la disponibilidad de Mo en principio, puede ser insuficiente para permitir el pleno rendimiento de la diazotofía. En tales situaciones, el aporte de Mo es posible, aunque en la práctica es económicamente inviable.

Como aportar Mo a la residuoesfera?

Debido a un mejor contacto entre las bacterias del suelo y los residuos de cultivos pajizos que implica, por lo general se establece que la incorporación de éstos favorecerá su degradación. Sin embargo, por razones agrícolas, en particular la supresión de malas hierbas por « asfixia » de esta flora por biomasas de Cipan siempre en el lugar en el momento de la siembra, a veces se recomienda retrasar este soterramiento. Dicho ésto, este soterramiento después de la siembra - y en parte por la naturaleza de las cosas, las biomasas de Cipan Poaceae también retrasarán - por razones de orden práctico, la aplicación del Mo. Este soterramiento después de la siembra se traducirá en hacer

coincidir en el tiempo la acción estimulante del Mo en la flora (azoto)bacteriana del suelo y el aumento de la fuerza de la tasa de eliminación de nitrógeno y fósforo por las raíces. Desde un punto de vista agrícola, el Mo aplicado después de la siembra en este sentido podría ser contraproducente por lo tanto debido al aumento de la competencia entre la flora (azoto)bacteriana y las raíces del maíz, y ésto a pesar de un cierto efecto *auxinógeno* (fitógeno) al principio del cultivo.

De hecho, hay cuatro (4) casos de situaciones;

- i) suelos desnudos y por lo tanto después de la siembra de Cipan; necesita aportes de Mo ponderales de al menos 40 a 100 g por ha de difícil justificación en cultivos no *Fabaceae*;
- ii) residuos de cultivos pajizos en el suelo antes de la siembra de Cipan; necesita la dedicación de un pasaje de pulverizador agrícola para este fin igualmente de difícil justificación;
- iii) fitomasas de Cipan durante su destrucción química antes de la siembra del cultivo de referencia; este tipo de destrucción química ya no se recomienda;
- iv) Fitomasas de Cipan durante de su destrucción química después de la siembra del cultivo de referencia: estimula la flora nitrobacteriana del suelo en el momento del brote de las plántulas, siendo en ocasiones esta competencia de las *Azotobacteraceae* contraproducente.

El aporte del Mo a la residuoesfera que proviene del soterramiento de los residuos de cultivos pajizos en el suelo - pero muy capaces, en principio, de estimular el desarrollo y la actividad BFCP de las poblaciones de *Azotobacteraceae*, parece problemático y/o económicamente injustificable en producciones agrícolas de *Poaceae* y de forraje.

Cultivos intermedios que actúan como trampas para nitrato (Cipan)

Los Cipan son cultivos, generalmente de forraje y de forma ventajosa de cifras (por ejemplo, mostaza y rábano forrajero) y/o *Poaceae* (por ejemplo, raigrás, festuca) implantados después de la recogida de un cultivo de invierno y antes de la siembra de un cultivo en la primavera siguiente, es decir, en el momento del *cultivo intercalado*. El crecimiento aéreo y subterráneo de estos cultivos, que retienen el nitrógeno necesario para este fin, permite de forma eficaz « atraparlo » temporalmente, evitando de este modo que se vierta en la capa freática y/o las aguas subterráneas. Los Cipan más eficaces en términos de captación de restos de nitrógeno mineral en otoño son las *Brassicaceae*, en particular la mostaza blanca, y las *Graminae* de cereal, en particular la avena y la cebada forrajeras. Los Cipan *Brassicaceae* por lo general se pueden « helar » y se destruyen automáticamente con las heladas de otoño, en particular en el NE de Francia y Europa Occidental. Los Cipan *Poaceae*, cereales y forrajeros, se dejan en su lugar hasta que se sale del invierno; entonces se destruyen químicamente con la ayuda de un herbicida de tipo glifosato con el fin de evitar rebrotes en el seno del cultivo de la siguiente cosecha de verano, por lo general un maíz.

Sin embargo, solamente una fracción de unos 2 000 000 de hectáreas de tierras que se pueden a la en grandes cultivos en Francia se pueden beneficiar de la aplicación de CIPAN que son el objeto de una práctica de cultivo de este tipo. En su mayor parte, se trata de grandes cultivos de primavera, en particular maíz, girasol, remolacha azucarera y/o patata que han tenido como precedentes de cultivo un cereal y/o cualquier otro cultivo cosechado al final del verano, incluso a mediados de septiembre.

Sin embargo, la impopularidad mencionada de los Cipan se puede atribuir a la potencia baja de sus fertilizantes debido a una relación de C/N de sus biomásas demasiado elevada. De hecho, para los materiales orgánicos de Cipan existe una determinada relación de C/N crítica, de aproximadamente 12,5, más allá de la cual la fitodisponibilidad a corto plazo del nitrógeno orgánico se reduce drásticamente debido alguna inmovilización demasiado elevada del nitrógeno mineral por la flora bacteriana del suelo (Hodge *et al.* 2000). La mejora global de la relación de C/N de la « residuoesfera » *cipanizada* de este modo podría favorecer, en principio, esta primera fase de lanzamiento del nitrógeno; ahora hace falta que esta dinámica no venga a competir con la eliminación de NP por las raíces del maíz.

Por lo tanto, el objetivo de los aportes ocasionales de Mo al sistema de suelo/residuoesfera/suelo es mejorar el valor de fertilización Cipan no leguminosos, de forma ventajosa cebadas o avenas forrajeras, estimulando la actividad de la microflora azotobacteriana disfrutando de sus soterramientos y/o las de los restos de cultivos pajizos presentes por lo general (necesariamente) en el suelo durante sus plantaciones.

La biofertilización con la ayuda de BFCP azotobacterianas

Las BFCP (bacterias que favorecen el crecimiento de las plantas) colonizan, además de las raíces de determinados cultivos, los restos de cultivos (pajizos), los abonos organominerales y/o las biomásas radicales residuales. Los mecanismos responsables de la mejora del crecimiento comprenden : (i) la producción de sideróforos, (ii) antibiosis contra bacterias y hongos patógenos, (iii) la producción de sustancias que favorecen el crecimiento, y iv) la son movilización de fosfatos orgánicos e inorgánicos. Las BFCP pertenecen a varios géneros, que comprenden *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Cellulomonas*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, (*Brady*)*rhizobium* y *Xanthomonas*. Las *Azotobacteraceae* son bacterias libres, aerobias y capaces de

diazotrofia no simbiótica. Sus poblaciones pueden variar en el suelo pero en raras ocasiones supera de 10^2 a 10^3 por gramo de suelo. Estos inóculos, al contrario que los inóculos de *Rhizobiaceae*, se pueden aplicar a los residuos de cultivos pajizos al suelo, a los abonos organominerales. El género *Azotobacter* está formado por al menos 6 especies, que comprenden *Azotobacter chroococcum* y *Azotobacter vinelandi*. Al igual que en las *Azotobacteraceae* indígenas del suelo, las BFCP azotobacterianas reintroducidas por inoculación también se pueden beneficiar de los aportes de Mo.

Algunas patentes relevantes ?

Un primer documento **D1** (GB 2 110 518 A) describe un revestimiento de semillas - *Fabaceae* y no Fabaceae, formado básicamente por una fracción proteica complementada con determinadas sales de (oligo)elementos. Sin embargo, aunque se menciona de forma implícita que el Mo (molibdeno) puede ser eficaz en sí mismo sobre las *no Fabaceae* (por ejemplo, maíz), esta supuesta eficacia no está apoyada por el resto de la descripción y/o – sobre todo, los ejemplos de aplicaciones que se proporcionan. De hecho, se revela que son los oligoelementos Zn (cinc), Mg (magnesio) y Mn (manganeso) los que son eficaces en sí mismos, los otros oligoelementos, que comprenden por lo tanto Mo, siendo proporcionados en conjunto (« y ») como « aditivos ». La función única del Mo – incluso como agente fitógeno proporcionado directamente a las y para las semillas, no es el objeto de ninguna otra mención en D1. Sin embargo, esta ausencia está de acuerdo con el estado de la técnica de acuerdo con la cual el Mo no se proporciona nunca en sí mismo (solo) a los cultivos de cereales y/o de maíz ya que las necesidades, incluso las deficiencias, de Mo de éstos son indetectables y/o incoherentes a todos los efectos.

Un segundo documento **D2** (Patente de Estados Unidos Nº 4 930 431 A), no describe la « vectorización » de oligoelementos en el sentido entendido cerca de los residuos que cultivos pajizos en el suelo, sino más bien la aproximación mecánica de tales abonos y de dichos residuos de cultivo al interior de un mismo surco de siembra (« surco »). De acuerdo con D2, los abonos se colocan en primer lugar en dicho surco de labranza y los residuos de cultivo se empujan a continuación (« se introducen raspando ») cerca del / en el interior de este mismo surco. Por lo tanto existen dos gestos (acciones) mecánicos implicados aquí que no tienen nada que ver con la siembra de pequeñas semillas forrajeras en el sentido entendido en la presente invención que propone un gesto unificado y que comprende de forma sorprendente una doble acción; dispersión de semillas y fertilización en el Mo de la residuoesfera (véase a continuación). También se debe indicar que D2 describe básicamente un aparato para cultivar dedicado a la siembra directa, es decir, sin labrar ni soterrar, o incluso incorporación superficial, de dichos residuos de cultivos pajizos en el suelo. Sin embargo, la presente invención no se destina – como razón, a la realización de siembras directas.

Por último, otro documento D3 (FR 2 941 592 A1) describe un aporte de Mo y de triptófano (TRP) ya sea directamente o en proximidad a la rizosfera por tratamiento de semillas, ya sea directamente o en proximidad a la residuoesfera por pulverización líquida o con la ayuda de un abono organomineral. Estos dos modos de aplicación presuponen – con razón, que los iones MoO_4 (molibdato) – un poco como los iones PO_4 (fosfato), son poco móviles en el suelo debido a su fijación fisicoquímica; en este sentido, la química del molibdeno es similar a la del fósforo. Es por esto por lo que parece que el ión molibdato debe ser, o bien pulverizado finalmente sobre el conjunto de los residuos de cultivos pajizos en el suelo, o bien localizado en la proximidad de las raíces.

Definiciones

Revestir (revestimientos); Presencia, en la superficie de una semilla, de un producto cualquiera, independientemente de su naturaleza y/o de su coformulación. Dicho producto se puede humedecer a continuación, absorber, lbarra o confinar en la superficie exterior de la semilla.

Formación de película; Revestimiento particular debido a su formulación (por ejemplo, adyuvante, aglutinante, humectante) que por definición permanecerá confinado principalmente en la superficie de la semilla, formando como resultado de este modo una « película ».

Residuos de cultivos pajizos: Los residuos de cultivo en el suelo después de la cosecha de cereales de paja, y también de residuos de cultivo de grano de maíz. Estos residuos de cultivos pajizos comprende no solamente les las cajas que se pueden cosechar sino también los rastrojos y las biomásas radiculares.

Rizoesfera: Región del suelo formada directamente e influida por las raíces y los microorganismos a los que se asocia.

Residuoesfera: Volumen o zona del suelo que rodea inmediatamente los residuos de cultivos pajizos y/o biomásas particulares residuales y que está más o menos influida por ellos. También se habla de un « núcleo » en el que se sitúa la descomposición de los residuos de cultivo.

Vectorización (del Mo o de oligoelementos en general): Aporte de un (oligo)elemento, y más particularmente aquí molibdeno (Mo) de un medio emisor – ya sea en fase sólida, líquida o gaseosa, cerca de un medio – dicho sustrato, receptor que le puede desarrollar.

Divulgación de la invención

Problema técnico

Los Cipan no Fabaceae se asocian con un efecto depresivo retardado sobre los rendimientos agrícolas. El complemento con molibdeno (Mo) de las residuoesferas formadas durante el soterramiento de Cipan en la superficie suelos que se pueden cultivar podría atenuar, en principio, este efecto retardado atribuible básicamente a un exceso de inmovilización del nitrógeno mineral. Sin embargo, este complemento es tanto problemático y/como económicamente injustificable. Por otra parte, los aportes de Mo directamente a los cultivos de cereales y/o Poaceae forrajeras mediante la pulverización de semillas y/o follajes – incluso suelos desnudos, se consideran generalmente intrascendentes, siendo las deficiencias de Mo para estos tipos de cultivo supuestamente indetectables. Queda la sobredosis de nitrógeno fertilizante con el fin de compensar el exceso de inmovilización del nitrógeno por las residuoesferas (residuos de cultivos pajizos, Cipan soterrados); esta práctica ya no se usa en la actualidad dado el riesgo de polución difusa y de ineficiencia energética.

Solución técnica

La solución técnica propuesta consiste en formar películas o revestir con molibdeno (Mo) semillas de Cipan no Fabaceae puestas en contacto directamente con residuos de cultivos pajizos en el suelo en el momento de su soterramiento en otoño. Esta valoración del Mo cerca de estos residuos de cultivos pajizos (forrajeros) no Fabaceae es nuevo debido a que dichas semillas, *a priori*, no se tratan específicamente con Mo debido a la llamada inconsistencia de tales aportes de Mo a los Cipan y grandes cultivos no Fabaceae. De hecho, esta vectorización objetivo sobre todo las floras azotobacterianas de residuoesferas recién formadas a partir de dichos residuos de cultivos pajizos una vez soterrados.

Más específicamente, se trata de proceso de acuerdo con la reivindicación 1 para la vectorización de oligoelementos cerca de los residuos de cultivos pajizos en el suelo y/o las residuoesferas *in situ* que presuponen una vez soterradas en la superficie de los suelos que se pueden cultivar que consiste en semillas no Fabaceae y sales solubles de dichos oligoelementos. Este soterramiento se puede hacer mediante trabajo de cultivo simplificado (TCS) en lugar de que arado más profundo, incluso por simple disqueaje y/o con la ayuda de un rastrillo giratorio que aseguran una introducción de las semillas y de los residuos de cultivo en la superficie a unos cuantos cm de profundidad. Este proceso para la vectorización de oligoelementos se caracteriza por que las sales de oligoelementos vectorizadas de este modo se eligen entre un grupo que comprende las sales de cinc (Zn), cobre (Cu), manganeso (Mn), hierro (Fe), boro (B) y/o molibdeno (Mo); la vectorización del Mo se reivindica en particular en el presente documento.

Se forman películas de semillas no Fabaceae o se revisten con dichas sales de oligoelementos antes de sus puestas en contacto con los residuos de cultivos pajizos en el suelo. Esta vectorización de oligoelementos cerca de dichos residuos de cultivos pajizos en el suelo se sustituye por lo tanto con pulverización de estos residuos con soluciones líquidas de estas sales. La formación de películas de las semillas se puede hacer de acuerdo con el estado de la técnica, ya sea con la ayuda de aplicación, ya sea por dispersión. Esta dosis de Mo – llevaba de forma ventajosa en forma de sales catiónicas Ibarra o de amonio usada normalmente de este modo en agricultura, se puede reducir si se busca un aporte conjunto de triptófano – de forma ventajosa hasta 10 g por hectárea y/o un exceso de acumulación previa de Mo por BFCP azotobacterianas. El equivalente de una dosis - hectárea de Mo está comprendido entre 1 y 100 g, más particularmente entre 10 y 40 g, y de forma ventajosa de aproximadamente 25 g se aporta por lo tanto a los residuos de cultivos pajizos en el suelo.

Por lo tanto, las semillas se ponen en contacto con los residuos de cultivos pajizos en el suelo en aproximadamente 5 cm de profundidad en la superficie de un suelo que se puede cultivar, incluso de forma más ventajosa sobre como máximo aproximadamente 2 cm de profundidad. La presencia de residuos pajizos en el suelo esenciales aún sin soterrada en el momento de la siembra no es habitual y contrario al estado de la técnica que recomienda la preparación de un lecho de semillas lo más uniforme posible con el fin de favorecer el contacto de suelo / semilla. Por lo tanto, dicho ésto, es útil adoptar aquí una práctica de cultivo denominada simplificada (TCS) que permite incorporar de forma simultánea, en la superficie del suelo, residuos de cultivos pajizos y semillas.

La superficie del suelo recubierta inicialmente con residuos de cultivos pajizos y que recibe, por puesta en contacto con estos residuos de cultivo, al menos una semilla individual es lo más pequeña posible, ya sea comprendida entre 1 y 10 cm², de forma más particular entre 2 y 8 cm², y de forma ventajosa de aproximadamente 4 a 5 cm². De forma teórica, las dimensiones de estas superficies de suelos que se pueden cultivar, cubiertas inicialmente con residuos pajizos, son función del tamaño de las semillas; para una dosis ponderal dada, un número más elevado de semillas pequeñas ocupará aún más superficies cultivables pequeñas facilitando de este modo la dispersión del Mo y su puesta en contacto con las residuoesferas. En la práctica, habrá que asegurar un reparto de las semillas de la forma más homogénea posible.

Por lo tanto, se trata también de semillas forrajeras no Fabaceae revestidas o con las que se han formado películas de Mo para la vectorización del Mo cerca de los residuos de cultivos pajizos en el suelo y/o las residuoesferas *in situ* que se presuponen una vez soterradas en la superficie de suelos que se pueden cultivar. Sus pesos de mil granos (PMG) está comprendido entre 500 y 3000 mg, y de forma ventajosa como máximo de 1000 mg. Estos PMG presuponen dosis por hectárea ponderalmente equivalentes a entre 15 y 40 kg, y de forma ventajosa del orden de 25 kg. Se trata de proporcionar entre 8 y 25 millones de semillas individuales (propágulos) por hectárea, ya sea como

media una semilla por unidad de superficie de aproximadamente 8 a 10 cm² para los PMG más importantes (*i.e.* de 2 a 3 g ; por ejemplo, *Lolium multiflorum* y *L. perenne*), y como máximo algunos - 2 a 4, cm² para los PMG más bajos (*es decir*, como máximo 1 g ; por ejemplo, *Festuca*, *Dactylis*, incluso *Agrostis*).

5 Ventajas proporcionadas y la actividad de la invención

La ventaja más evidente que proporciona la invención es permitir *de facto* la vectorización del Mo cerca de los residuos de cultivo en el suelo sin recurrir a un pasaje de pulverizador dedicado. El aspecto práctico y económico de este enfoque no es despreciable. En efecto, y tal como se ha mencionado anteriormente, la simple dispersión de semillas sobre residuos de cultivo en el suelo es bastante más sencilla de poner en práctica que el proceso mecánico propuesto en el documento D2 (documento de Patente de Estados Unidos N° 4 930 431 A); la presente invención por lo tanto es más ventajosa para el usuario. En efecto, el molibdato aquí es capaz de dopar la diazotrofia de las residuoesferas incluso si no se pulveriza directamente sobre las mismas, sino más bien simplemente proporcionado -« vectorizado » en parte, a través de semillas con película de Mo.

La fertilización – por la formación de película de semillas y/o de otro modo, de cultivos de Poaceae, comprende *Lolium*, *Triticum*, *Zea*, y *Hordeum*, considerándose por lo tanto hasta este momento – con razón, por el experto en la materia, como incongruente e inútil, por lo tanto, no se espera la obtención de ningún resultado agrícola o fitógeno.

Por último, el soterramiento a una determinada profundidad de las semillas no Fabaceae forrajeras después de la incorporación de los residuos de cultivo permitirá seleccionar las semillas más vigorosas. Este vigor relativo a las plántulas establecidas de este modo permite una producción óptima de fitomasas a pesar de un lecho de semillas variado contrario a las costumbres del experto en la materia. La selección de plántulas vigorosas mediante la aparición de semillas soterradas en profundidad es un fenómeno conocido (Dornbush y Wilsey 2010) aunque poco mencionado en agronomía.

Breve descripción de dibujos y figuras

Figura 1 : Movilización del nitrógeno por plántula (ug-MOBN / plántula) de raigrás (*Lolium multiflorum*) de acuerdo con el tipo de vectorización del Mo (es decir, con o sin Mo, o de acuerdo con la presente invención - AZMo) cerca de las residuoesferas formadas por residuos de cultivos pajizos soterrados aproximadamente a 2 cm en la superficie de un suelo que se puede cultivar en maceta y en invernadero 28 días después de la siembra en el momento del primer corte (c1). Estos resultados los proporciona un primer ensayo con seis (6) repeticiones colocadas en bloques (RCBD).

Figura 2 : Movilización del nitrógeno por plántula (ug-MOBN / plántula) de raigrás (*Lolium multiflorum*) de acuerdo con el tipo de vectorización del Mo (es decir, con o sin Mo, o de acuerdo con la presente invención - AZMo) cerca de las residuoesferas formadas por residuos de cultivos pajizos soterrados aproximadamente a 2 cm en la superficie de un suelo que se puede cultivar en maceta y en invernadero 56 días después de la siembra después del segundo corte (c12). Estos resultados los proporciona un primer ensayo con seis (6) repeticiones colocadas en bloques (RCBD). Las medias asociadas con las mismas letras son similares.

Figura 3 : Restos de nitrógeno mineral 28 después de la siembra durante el primer ensayo con seis (6) repeticiones colocadas en lo que es « Fisher ». Se debe tener en cuenta que el exceso de acumulación aparente (pero no significativo a una p.c. (α) de un 5 %) de nitrógeno mineral (Nm) en los suelos parece sobre todo que se atribuye a la acumulación de amonio (NH₄⁺) a expensas de nitrato, de donde aparece un cierto aumento del % de NH₄⁺ en estos restos.

Figura 4 : Movilización del nitrógeno por plántula (ug-MOBN / plántula) de raigrás (*Lolium multiflorum*) de acuerdo con el tipo de vectorización del Mo (es decir, con o sin Mo, o de acuerdo con la presente invención - AZMo) cerca de las residuoesferas formadas por residuos de cultivos pajizos soterrados aproximadamente a 2 cm de la superficie de un suelo que se puede cultivar en maceta y en invernadero 28 días después de la siembra en el momento del primer corte (c1). Estos resultados los proporciona un segundo ensayo con cuatro (4) repeticiones colocadas en cuadrado latino.

Figura 5 : Movilización del nitrógeno por plántula (ug-MOBN /plántula) de raigrás (*Lolium multiflorum*) de acuerdo con el tipo de vectorización del Mo (es decir, con o sin Mo, o de acuerdo con la presente invención - AZMo) cerca de las residuoesferas formadas por residuos de cultivos pajizos soterrados aproximadamente a 2 cm de la superficie de un suelo que se puede cultivar en maceta y en invernadero 56 días después de la siembra después del segundo corte (c12). Estos resultados los proporciona un primer ensayo con cuatro (4) repeticiones colocadas en cuadrado latino. Las medias asociadas con las mismas letras son similares.

Modo de realización preferente de la invención

El soterramiento de residuos de cultivos puestos en contacto de este modo con dichas semillas forrajeras – de forma ventajosa no *Fabaceae*, se puede realizar por simple trabajo de cultivo simplificado (TCS) mejor que en lugar de arado más profundo, incluso por simple disqueaje y/o con la ayuda de un rastrillo giratorio que aseguran una introducción de las semillas y de los residuos de cultivos pajizos en la superficie del suelo a algunos cm de

profundidad. Esto permite incorporar de forma simultánea, en la superficie del suelo, residuos de cultivos pajizos y semillas. La presencia de la parte básica de restos pajizos en el suelo no siempre soterrados en el momento de la siembra no es habitual y es contraria al estado de la técnica que recomienda la preparación de un lecho de semillas lo más uniforme posible con el fin de favorecer el contacto de suelo / semilla. Este uso de los TCS es posible debido al hecho de que – a pesar de determinadas exigencias en términos de preparación de lechos de semillas y/o de profundidades de siembra, las semillas de *Poaceae* y *Brassicaceae* sembradas a más profundidad (es decir, por debajo de 20 mm) pueden proporcionar cubiertas vegetales del mismo modo en masa que las semillas del mismo tipo sembradas con más criterio. Es esta plasticidad de dichas semillas – incluso en este sentido Lamb y Johnson 2004 "y Aberle *et al.* 2003, durante la implantación de plántulas productivas que permiten hacer que la presente invención funcione.

La dosis de Mo – proporcionada de forma ventajosa en forma de sales catiónicas y/o de amonio usada normalmente de esta forma la agricultura, se puede reducir si se realiza un aporte conjunto de triptófano – de forma ventajosa a una altura de una decena de g por hectárea, y/o un exceso de acumulación previo de Mo mediante BFCP azotobacterianas. La formación de películas de semillas se puede hacer de acuerdo con el estado de la técnica, ya sea con la ayuda de aplicación, ya sea por dispersión.

Teóricamente, las dimensiones de las superficies de los suelos que se pueden cultivar recubiertas con restos pajizos son función del tamaño de las semillas : para una dosis ponderal dada, un número más elevado de pequeñas semillas ocupará tantas más superficies cultivables pequeñas facilitando de este modo la dispersión del Mo y su puesta en contacto con las residuoesferas. Dicho ésto, en la práctica, habrá que asegurar un reparto de las semillas lo más homogéneo posible.

Por último, estos PMG presuponen dosis – por hectárea ponderalmente equivalentes a entre 15 y 40 kg, y de forma ventajosa del orden de 25 kg. Por lo tanto, se trata de proporcionar entre 8 y 25 millones de semillas individuales (propágulos) por hectárea, ya sea como media una semilla por unidad de superficie de más de 8 a 10 cm² para los PMG más importantes (es decir, de 2 a 3 g ; por ejemplo, *Lolium multiflorum* y *L. perenne*), y como máximo algunos - 2 o 4, cm² para los PMG más bajos (es decir, como máximo 1 g ; por ejemplo, *Festuca*, *Dactylis*, incluso *Agrostis*).

30 Aplicaciones bioindustriales y agrícolas

Con el fin de ilustrar de qué modo la invención es susceptible de aplicación en agricultura, el inventor ha realizado – en invernadero y en macetas, dos ensayos. Para realizar ésto, el inventor ha usado un suelo alsaciano de la región de Thann (68; Tabla 1), secado previamente de forma pasiva al aire y tamizado a 5 mm.

Tabla 1 : Caracterización fisicoquímica del suelo alsaciano

Parámetro	Unidad	gewn
Arcilla	%	27,0
LF/LG	Na	1,72
Arenas finas	%	18,1
pH (agua)	Na	5,7
Materia orgánica	g/kg-suelo	55,5
CEC	mEq/kg-suelo	101
Saturación CEC	%	56
P ₂ O ₅ asimilable	mg/kg-suelo	37
K ₂ O intercambiable	mg/kg-suelo	80
MgO intercambiable	mg/kg-suelo	200
CaO intercambiable	mg/kg-suelo	1850
Z _n -DTPA	ug/kg-sol	700

Con estos dos ensayos de aplicación, el inventor ha buscado demostrar que la vectorización del Mo cerca de las residuoesferas por pulverización líquida de residuos de cultivos pajizos en el suelo se puede realizar igualmente bien por la puesta en contacto de estos residuos de cultivos pajizos con determinados tipos de semillas forrajeras no Fabaceae. Esta vectorización del Mo – por tanto sin excluir las de otros oligoelementos, es nueva y tiene en contra

hábitos y prejuicios del experto en la materia para el que un tratamiento tal con molibdeno de semillas no Fabaceae – en particular Poaceae, es incongruente e inútil.

Ensayo de aplicación de AZMo

El inventor aplicó el equivalente de 25 g de Mo a 25 kg de semillas de festuca ovina (*Festuca ovina*, variedad « Clio »), es decir, el equivalente de 1 mg de Mo por g de semillas. Para realizar esto, hubo que mezclar 100 g de estas semillas (PMG = 0,75 g) con 25 ml de una solución que comprende 2,5 ml de FixaMo® (es decir, 40 g de Mo por l; Agronutrition, Carbonne, Fr), es decir de forma suficiente para impregnarlas con humedad. Esta solución se absorbió suficientemente en unas horas por las semillas para permitir un recuento preciso de las mismas. En este sentido, aproximadamente 25 de esta semilla se pueden mezclar de forma muy dedicada a 5 g de residuos de cultivos pajizos - secos, triturados y tamizados a 4 mm, impregnados con 5 ml de agua. Esta mezcla de residuos de cultivo / semillas fue seguida de la incorporación de 200 g de suelo, siendo el conjunto colocado por encima de 550 g del mismo suelo en una maceta de 1 l, cuya superficie de apertura superior es de aproximadamente 100 cm². Se supervisa una cierta cantidad de arena inerte todo con el fin de evitar la propagación de algas y la dispersión de semillas. Como blanco, se usan semillas sin tratar. Como control de referencia, el inventor usó tales semillas sin tratar pero con residuos de cultivo impregnados con 5 ml una solución que contiene 4 mg de Mo por l, es decir el equivalente de 25 g de Mo pero para 5 a 7 toneladas (10⁶ g) de tales residuos pajizos y por hectárea a 10 cm de profundidad en superficie de un suelo que se puede cultivar.

Por lo tanto, existen tres modalidades;

1. un blanco sin molibdenización de semillas y residuos de cultivo
2. un control sin molibdenización de semillas, el equivalente de 25 g de Mo por hectárea siendo aportado a las 10 toneladas de residuos de cultivos pajizos.
3. un tratamiento con molibdenización de semillas a través del aporte del equivalente 25 g de Mo a 25 kg de semillas - aquí *Festuca*, pero aquí sin la susodicha molibdenización de residuos de cultivos pajizos.

Se debe indicar que no hay modalidad con *molibdenización* de semillas ET de residuos de cultivo.

Esta reconstitución en maceta debe simular un trabajo simplificado del suelo capaz de colocar las semillas a unos cuantos centímetros (cm) de profundidad – de forma ventajosa como máximo 2 cm. De hecho, aquí los 200 g de suelo que comprenden las semillas y residuos de cultivo ocupan una capa de aproximadamente 2 cm de espesor; la capa inferior que comprende los 550 g de suelo es de aproximadamente 5,5 cm. El inventor repitió estas tres modalidades seis (6) veces en el cuadro de un simple dispositivo en bloques de Fischer, siendo las tres modalidades colocadas de forma aleatoria en el interior de cada bloque.

Con el fin de demostrar claramente que el Mo que forma película sobre las semillas de *Festuca ovina* se « vectoriza » de forma eficaz cerca de los residuos de cultivos pajizos soterrados (residuoesferas), estas semillas (propágulos vegetales) se desactivaron por calefacción a 65 grados C durante al menos 90 minutos ; por lo tanto no podrán germinar y proporcionar una plántula ; son inertes en este sentido. En su lugar, se colocaron cincuenta semillas de *Lolium multiflorum* (raigrás) en la superficie de cada maceta, hundidas ligeramente y recubiertas con arena inerte. El efecto fitógeno de la modalidad AZMo no se podrá más que atribuir a una vectorización del Mo cerca de los residuos pajizos, no habiéndose puesto en contacto dicho Mo de forma eficaz nunca directamente con las semillas de raigrás. Se debe observar que aquí éstas se siembran 28 días después de la pseudosiembra de semillas de festuca inertes pero que portan Mo. Pero de este modo, el inventor pudo realizar un primer corte (c1) 28 días después de la siembra (jps) del raigrás – es decir 56 jps de festuca, y un segundo corte (c12) 56 jps – es decir 84 jps de festuca. Después de este segundo corte, el inventor también midió los niveles de nitrato y amonio en los suelos como « restos » de nitrógeno; en principio, el inventor esperaba un cierto exceso de acumulación de este nitrógeno mineral (Nm = nitratos + amonio) debido a una actividad más grande de las floras azotobacterianas del suelo / residuoesferas.

Con el fin de evitar carencias nutricionales sin perjudicar la actividad azotobacteriana que se debe beneficiar de esta vectorización del Mo, se proporciona un mínimo de nitrógeno mineral (nitrato de amonio) a partir de la siembra (es decir, 12 mg de N por kg de suelo) mediante una solución de nutrientes y de oligoelementos desprovista de Mo.

Una vez que se realiza el primer corte aproximadamente 56 jps de la festuca, también se debe realizar un segundo aporte de nitrógeno mineral más consecuente (es decir, 35 mg de N por kg de suelo) con el fin de asegurar un rebrote vigoroso del raigrás que se puede cosechar 54 jps de la festuca (c2) ; la actividad azotobacteriana de la residuoesfera se reabsorbe habitualmente en este estadio – al menos durante los ensayos en invernaderos, esta abundancia relativa de N no será contraproducente en términos de diazotrofia azotobacteriana.

Una de que las fitomasas se han cosechado – siendo añadidos los valores del primer (c1) y segundo cortes (c12), ésta se secaron por calefacción a 60 grados C y se analizaron para sus contenidos en N ; la movilización del nitrógeno (MOBN) para estos materiales secos de las partes aéreas (MSPA) se podrá calcular de este modo (MSPA x % de N). Estos valores de MSPA y de MOBN resultantes de seis repeticiones se sometieron a análisis de

varianza (Anova) que permiten – cuando sea apropiado, la comparación múltiple (véase, Duncan) de los promedios de MSPA y MOBN de las tres modalidades. También es útil hacer el recuento del número de plántulas emergidas por maceta ; el cálculo de MSPA y MOBN por plántulas - en mg y ng respectivamente, siendo a menudo más precisos. Como alternativa, el número de plántulas emergidas por maceta también puede servir de covariable cuantitativa durante un análisis de covarianza (Ancova). Se debe observar que el Anova y el Ancova deberían conducir a las mismas conclusiones.

Los MOBN 28 y 56 jps del raigrás se indican en las Figuras 1 y 2, respectivamente. El efecto fitógeno percibido en 28 jps (c1; Figura 1) confirma esto y se llega a poder defender de forma estadística a 56 jps (c12; Figura 2) ; este desajuste de tiempo se puede atribuir al tiempo necesario para el que se realiza la reaparición la aamonificación del nitrógeno de origen diazotrófico. En este sentido, 56 jps AZMo es tan potente como para pulverizar de forma directa de las residuoesferas con Mo; dicha « vectorización » de las semillas con Mo es por lo tanto probablemente capaz de sustituir una pulverización líquida de los residuos s pajizos con Mo.

También se debe observar la dosificación de los restos de Nm de 84 jps de la festuca (Figura 3). El exceso de acumulación aparente de Nm en presencia de Mo saquí parece que se debe en mayor medida a una acumulación de amonio (NH₄); la proporción del mismo (% de NH₄) en los restos es particularmente elevada para AZMo. Este predominio del amonio está de acuerdo con la actividad (azoto)bacteriana más elevada. De hecho, el nitrógeno del suelo de origen diazotrófico que vuelven a lanzar las bacterias debe estar ante todo aamonificado; la acumulación transitoria del amonio se convierte por lo tanto en un índice *de facto* de importancia relativa de la actividad diazotrófica (azoto)bacteriana del suelo.

Aquí se debe observar que la molibdenización de las semillas en lugar de la pulverización directa de los residuos de cultivos pajizos será en principio igualmente eficaz, no solamente en términos fitógenos (MOBN), sino también a nivel de la residuoesfera en términos de acumulación de nitrógeno. En situaciones agrícolas, esta acumulación también será susceptible de movilización por el cultivo al final del invierno. Un simple cultivo intermedio para atrapar el nitrato (Cipan) que consiste en *Festuceae* y/o *Lolium multiflorum* también podrá no solamente atrapar sino también contribuir de forma positiva al balance del cultivo de referencia siguiente, por ejemplo un maíz.

30 **Ensayo de aplicación de AZMo-bis**

Para confirmar esta equivalencia ventajosa entre la molibdenización de los restos pajizos por pulverización líquida y puesta en contacto con semillas no Fabaceae con molibdeno, el inventor había implantado una segunda vez un segundo ensayo crítico de AZMo. Por el contrario, el inventor esta vez implantó, en la superficie de los suelos reconstituidos en macetas, una media de 50 plantas de *Lolium multiflorum* por maceta sin aplazar 28 días sus siembras con respecto a las de las semillas de festuca inertes. Además de las *Festuca ovina* (festuca ovina), estas plántulas de raigrás producen más MSPA y permiten aumentar la precisión del ensayo.

En este sentido, el invento no realizó más que cuatro (4) repeticiones de las tres (3) modalidades mencionadas. Por último, justo cuando debería aparecer MOBN en las dos modalidades con molibdenización ya sea residuos de cultivo por pulverización líquida, ya sea – en el sentido de la presente invención, mediante vectorización por puesta en contacto de las semillas tratadas con Mo y dichos residuos de cultivos pajizos. Dado que en este caso, los MSPA se han producido con *Lolium multiflorum*, este efecto fitógeno del tratamiento de semillas *Festuceae* con respecto a *Lolium* se atribuye necesariamente a una acción indirecta de estas semillas tratadas a través de la residuoesfera. Los datos en la Figura 4 (c1 a 28 jps) y la Figura 5 (c12 a 56 jps) confirman una vez más que la simple dispersión de las semillas con molibdeno y puestas en contacto de este modo con los residuos de cultivos pajizos en el suelo puede sustituir una pulverización liquidar estos últimos; la simplicidad de esta práctica y la doble acción de las semillas – tanto en cuanto propágulos vegetales Y vectores para abonos con oligoelementos a base de Mo, solamente puede ser ventajoso para el usuario.

Por último, aquí se debe tener en cuenta que el uso de semillas de festucas inertes no sirve más que para ilustrar que la vectorización del Mo cerca de los residuos de cultivo es la responsable del efecto fitógeno en el raigrás sembrado a partir de ese momento. En situaciones más agrícolas, *in situ*, ya no es necesario recurrir a este tipo de siembra en dos tiempos (festuca inerte / raigrás cosechable), y se propone la simple siembra – en el sentido de la presente invención, de semillas viables con molibdeno de *Agrostis*, *Dactylis*, *Festuca*, *Bromus* y/o *Lolium*.

Referencias, bibliografía y patentes relevantes

- Allen, R.M., J.T. Roll, P. Rangaraj, V.K. Shah, G.P. Roberts y P.W. Ludden. 1999. Incorporation of molybdenum into the iron-molybdenum cofactor of ntirogenase. J. Biol. Chem. 274: 15869-15874.
- Claude, P-P. y L. Fillion. 2004. Effet de l'apport d'un inoculum bactérien aux résidus de de culture de maïs-grain au sol sur le rendement et la qualité de blés d'hiver panifiables en France. Agrosol (desde « Agrosolutions ») 15 (1) : 23-29.
- Dornbush, Mathew E. y Brian J. Wilsey. 2010. Experimental manipulation of soil depth alters species richness and co-occurrence in restored tallgrass prairie. J. Ecol. 98, 117-125.
- El-Samad, Abd H.M., H.M. El-Komy, M.A.K. Shaddad y A.M. Hetta. 2005. Effect of molybdenum on nitrogenase

and nitrate reductase activity of wheat inoculated with *Azospirillum brasilense* grown under drought stress. *Gen. Appl. Plant Physiol.* 31: 43-54.

Halsall, D.M.. 1993. Inoculation of wheat straw to enhance lignocellulose breakdown and associated nitrogenase activity. *Soil Biology and Biochemistry*, 25, Publicación 4, Páginas 419-429.

5 Hodge, A. 2004. The plastic plant: root responses to heterogeneous supplies of nutrients. *New Phytologist* 162: 9-24.

Hodge, A., D. Robinson y A. Fitter. 2000. Are microorganisms more effective than plants at competing for nitrogen? *Trends in Plant Sci.* 5 (7) : 304-318.

10 Igarashi, R.Y. y L.C. Seefeldt. 2003. Nitrogen fixation : the mechanism of the Mo-dependent nitrogenase. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology.* 38: 351-384.

Kaiser, B.N., K.L. Gridley, J. Ngaire-Brady, T. Phillipset S.D. Tyerman. 2005. The role of molybdenum in agricultural plant production. *Ann. Bot.* 96: 754-754.

15 Loveless, T.M., J. Royden Saah si P.E. Bishop. 1999. Isolation of nitrogen fixing bacteria containing molybdenum-independent nitrogenases from natural environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 4223-4226.

Loué, André. 1993. *Oligoéléments en agriculture*. Ediciones SCPA Nathan 1993.

Mendel, R.R. 2007. Biology of the molybdenum cofactor. *J. Exp. Bot.* 58: 2289-2296.

Mendel, R.R. y R. Hänsch. 2002. Molybdoenzymes and molybdenum cofactor in plants. *J. Exp. Bot.* 53: 1689-1698.

20

REIVINDICACIONES

- 5 1. Proceso para la vectorización de oligoelementos cerca de los residuos de cultivos pajizos *en los suelos*, usando semillas forrajeras de Cipan no *Fabaceae* revestidas con película o revestidas con preparaciones que contienen sales solubles de molibdeno y, opcionalmente, otros oligoelementos elegidos entre un grupo que comprende las sales de cinc (Zn), cobre (Cu), manganeso (Mn), hierro (Fe) y/o boro (B), poniendo dichas semillas en contacto directamente con dichos residuos de cultivos pajizos en el momento de su soterramiento en otoño, **caracterizado por que** la dosis equivalente por hectárea de Mo proporcionada a dichos residuos de cultivos pajizos está comprendida entre 1 y 100 g, de forma más particular entre 10 y 40 g, y de forma ventajosa aproximadamente 25 g.
- 10 2. Proceso para la vectorización de oligoelementos de acuerdo con la reivindicación precedente **caracterizado por que** los residuos de cultivos pajizos en el suelo se soterran a aproximadamente 5 cm de profundidad en la superficie de un suelo que se puede cultivar, incluso de forma más ventajosa como máximo a aproximadamente 2 cm de profundidad.
- 15 3. Proceso para la vectorización de oligoelementos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes **caracterizado por que** la superficie del suelo recubierta inicialmente de residuos de cultivos pajizos y que recibe por puesta en contacto con estos residuos de cultivo al menos una semilla individual está comprendida entre 1 y 10 cm² de forma más particular entre 2 y 8 cm², y de forma ventajosa de aproximadamente 4 a 5 cm².
- 20 4. Proceso para la vectorización de oligoelementos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes **caracterizado por que** las semillas de Cipan no *Fabaceae* tienen un peso de mil granos (PMG) comprendido entre 500 y 3000 mg, y de forma ventajosa como máximo 1000 mg.
- 25 5. Proceso para la vectorización de oligoelementos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes **caracterizado por que** las semillas de Cipan no *Fabaceae* se proporcionan en dosis por hectárea ponderalmente equivalentes a entre 15 y 40 kg, y de forma ventajosa del orden de 25 kg.
- 30 6. Proceso para la vectorización de oligoelementos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes **caracterizado por que** las semillas de Cipan no *Fabaceae* se proporcionan a dosis por hectárea que permiten proporcionar entre 8 y 25 millones de semillas individuales (propágulos) por hectárea, es decir como media una semilla por unidad de superficie de aproximadamente 8 a 10 cm² para los PMG más importantes (*es decir*, de 2 a 3 g ; *por ejemplo*, *Lolium multiflorum* y *L. perenne*), y como máximo algunos - 2 a 4, cm² para los PMG más bajos (*es decir*, como máximo 1 g ; *por ejemplo*, *Festuca*, *Dactylis*, incluso *Agrastis*).
- 35

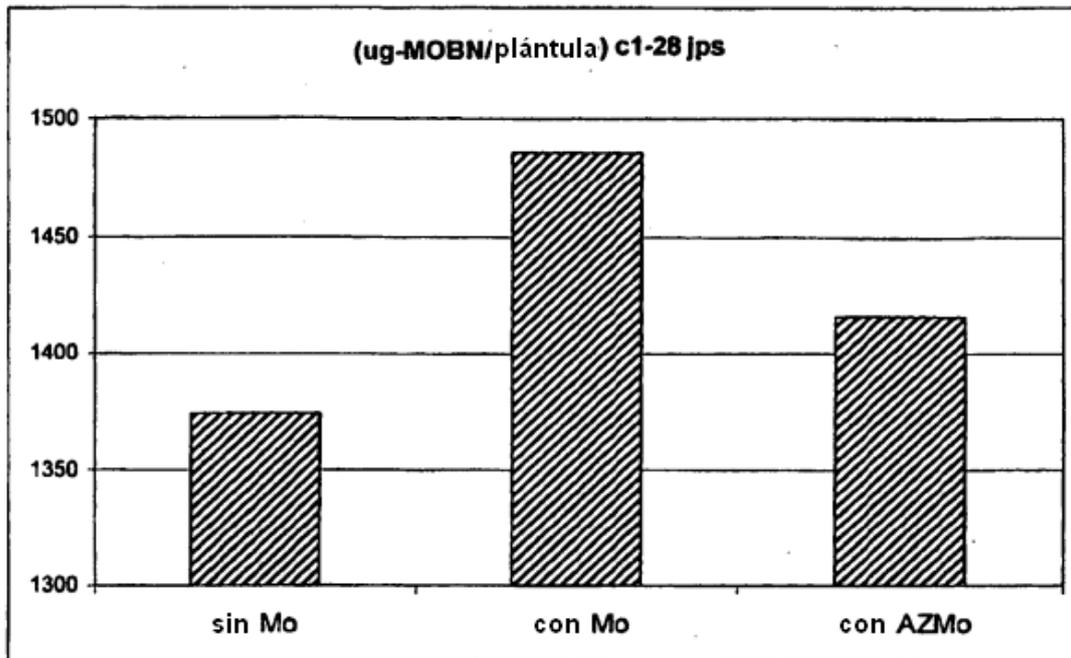


FIGURA 1

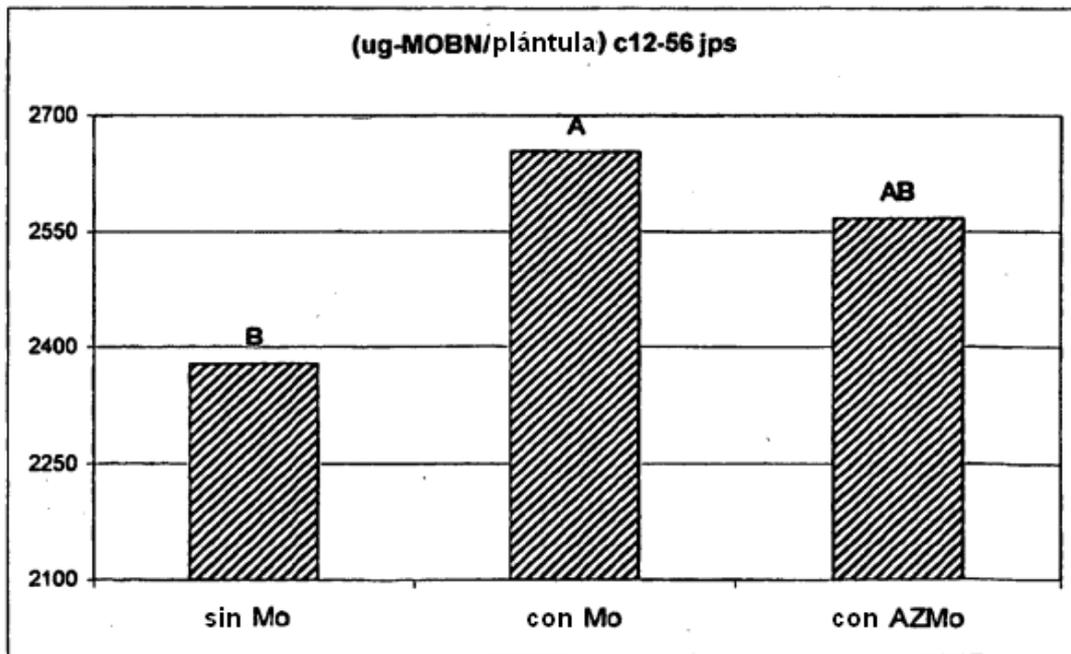


FIGURA 2

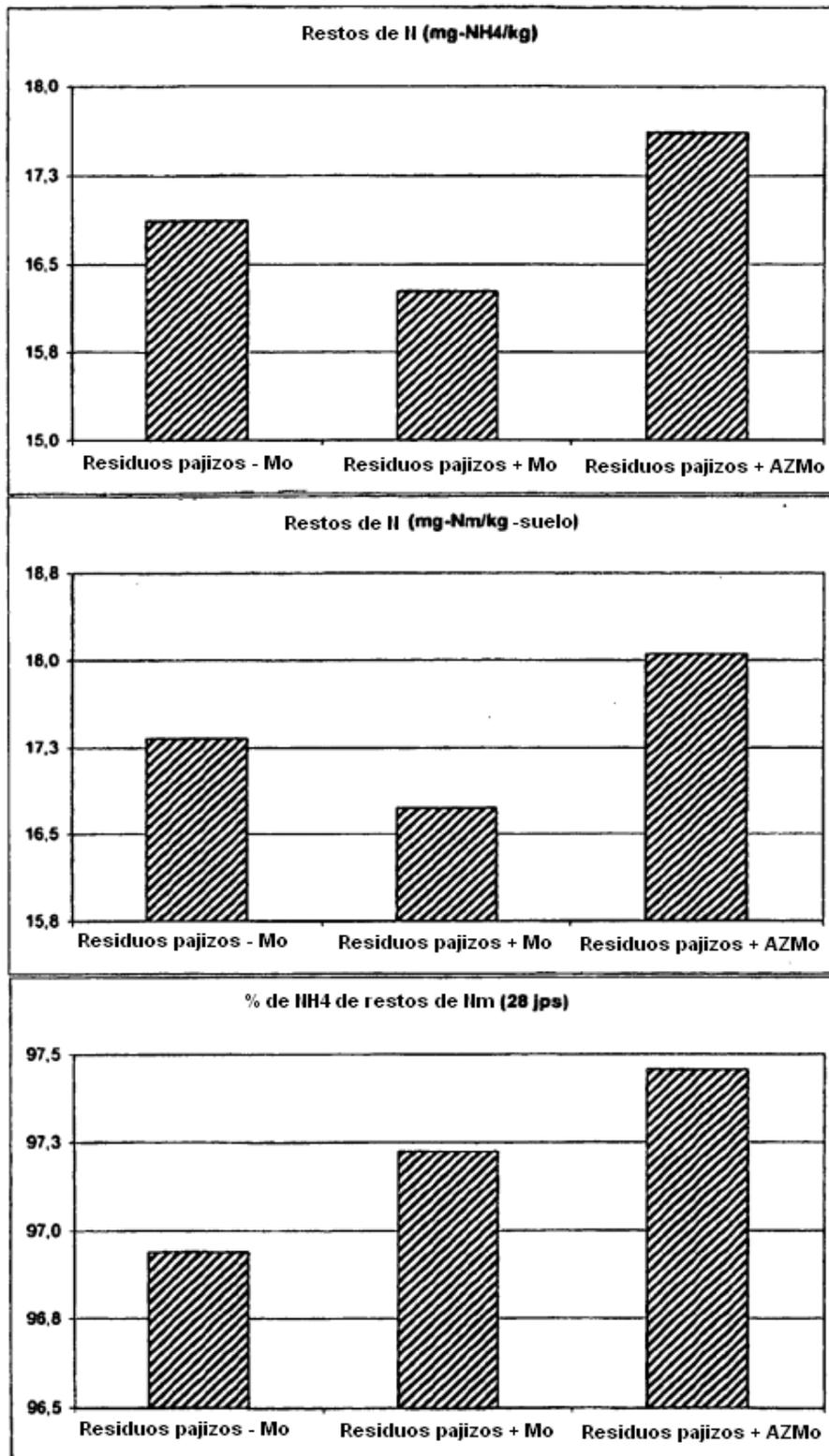


FIGURA 3

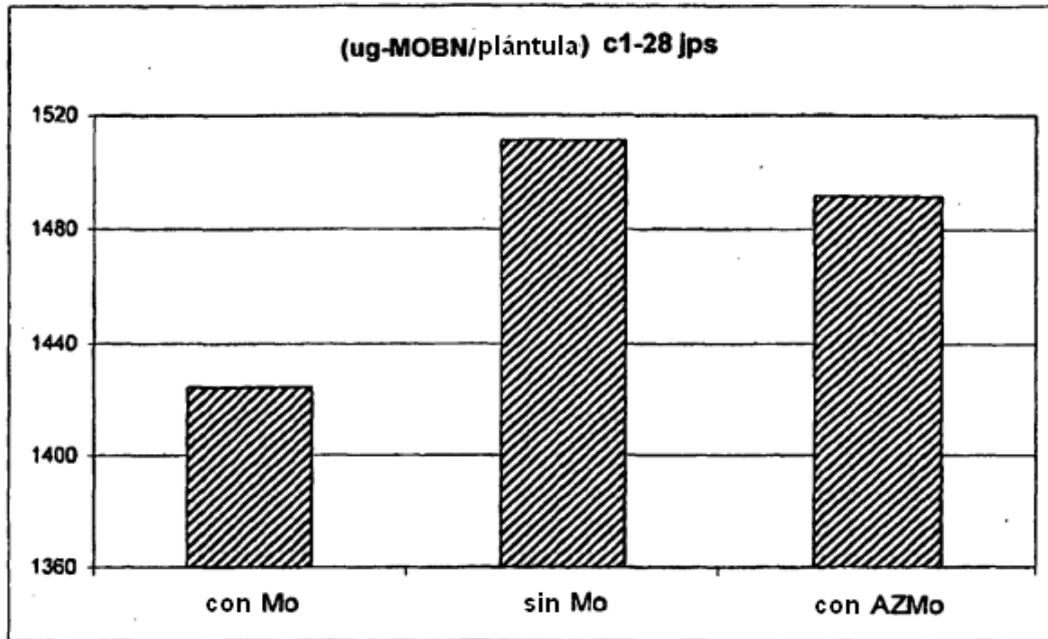


FIGURA 4

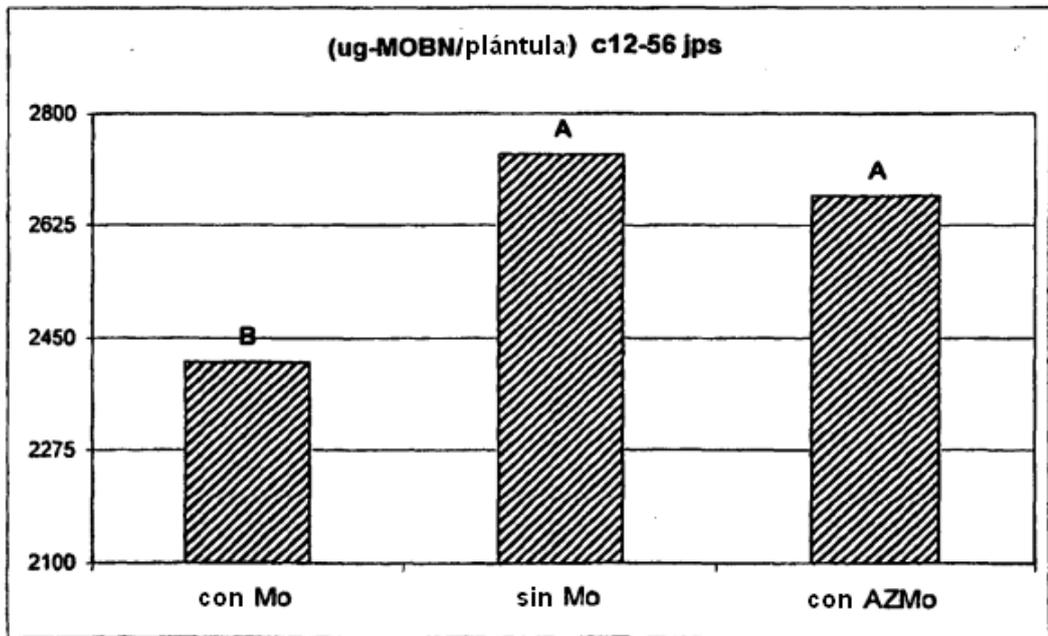


FIGURA 5