

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 551 658**

21 Número de solicitud: 201531523

51 Int. Cl.:

C09J 103/00 (2006.01)

C09J 105/00 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

22.10.2015

43 Fecha de publicación de la solicitud:

20.11.2015

71 Solicitantes:

**AGROTECNOLOGIAS NATURALES, S.L. (100.0%)
CTRA. T-214, S/N KM 4,125
43762 TARRAGONA ES**

72 Inventor/es:

**BONINI, Paolo y
CIRINO, Veronica Cristina**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

54 Título: **Composición adhesiva para unir de forma estable esporas de hongos a la superficie de semillas de vegetales y método para la cuantificación de la capacidad de adhesión.**

57 Resumen:

La presente invención se refiere a una composición adhesiva para unir de forma estable esporas de hongos a la superficie de semillas de vegetales caracterizada porque comprende una disolución acuosa de licor de maíz fermentado y/o hidrolizados de proteína de soja. La presente invención también se refiere a un método y al uso del mismo para la cuantificación de la capacidad de adhesión mediante una medida indirecta en la que se cuantifican microesferas fluorescentes unidas a la superficie de semillas mediante la técnica de microscopia de fluorescencia. Este método permite de una manera sencilla, una valoración indirecta de la adhesión de esporas de hongos a la superficie de semillas y por ende valorar la calidad de la composición adhesiva de la presente invención.

DESCRIPCION

Composición adhesiva para unir de forma estable esporas de hongos a la superficie de semillas de vegetales y método para la cuantificación de la capacidad de adhesión.

5

OBJETO DE LA INVENCION

La presente invención pertenece a la rama de las ciencias agrícolas y concretamente se refiere a una composición adhesiva para unir de forma estable esporas de hongos a la superficie de semillas de vegetales así como al método para la cuantificación de la capacidad de adhesión mediante una medida indirecta en la que se cuantifican microesferas fluorescentes unidas a la superficie de semillas mediante la técnica de microscopia de fluorescencia. Este método permite de una manera sencilla, una valoración indirecta de la adhesión de esporas de hongos a la superficie de semillas y por ende valorar la calidad de la composición adhesiva de la presente invención. Es otro objeto de la presente invención, el uso de la composición adhesiva de la presente invención para catalizar la adhesión de esporas de hongos a la superficie de semillas vegetales.

20 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La asociación micorrícica es una estrategia nutricional que han desarrollado muchas plantas y algunos hongos que les asegura un beneficio mutuo. Las micorrizas son órganos formados por la raíz de una planta y el micelio de un hongo. Funcionan como un sistema de absorción que se extiende por el suelo, proporcionando como resultado de una relación simbiótica, beneficios tanto para la planta como para el hongo. En cuanto a la planta, se favorece su crecimiento, (pues el hongo permite absorber mejor el agua y los minerales necesarios, estimulando el crecimiento de la raíz), mejora de la absorción de fosfato y otros nutrientes, está más protegida de los efectos tóxicos provocados por elevadas concentraciones de determinados minerales, resiste mejor la falta de agua, está más protegida frente al ataque de patógenos, se estimula el enraizamiento y crecimiento de plántulas, ayuda a superar situaciones de stress ambiental. Por otra parte el hongo recibe de la planta azúcares provenientes de la fotosíntesis, básicamente almidón.

Aproximadamente el 90% de todas las especies vegetales viven en simbiosis con una gran cantidad de hongos del suelo. Esta forma de vida en comunidad o simbiosis (que simboliza el beneficio mutuo entre las especies vegetales y los hongos) es denominada micorriza. Al ser un fenómeno tan extendido el término “micorrizas” se ha convertido en el nombre con el que se designan a los hongos implicados en su formación, aunque tal denominación no sea muy ortodoxa. La extensión de término y las rutinas coloquiales han llevado a acuñar términos como “micorrizar”, es decir, poner en contacto los hongos micorrícicos con plantas o el término “micorrización”, para indicar el establecimiento de la simbiosis.

5 Por ello, es conocido por el estado de la técnica el empleo de hongos micorrizas para proveer a las plantas de los beneficios antes mencionados, así como el empleo de composiciones pesticidas y que favorecen la actividad de los microorganismos.

Dentro de los documentos que se han localizado en el estado del arte más cercano, se encuentra la patente de invención rusa [RU2113794C1](#), describe un método de preparación de un pesticida microbiano con cubierta bipolar. El método descrito comprende mezclar un biopolímero con agua, calentando la mezcla de 80 a 121 °C hasta la formación de un gel o pasta, enfriar a la temperatura desde el punto ambiente hasta 60 °C. La mezcla comprende una de las siguientes cepa de microorganismos: *Bacillus subtilis krietiensis* ATCC 55078 o 55079, *Pseudomonas fluorescens* ATCC 27663, *Gliocladium virens* ATCC 52045, *Trichoderma reesei* ATCC28217, *Trichoderma harzianum* ATCC 52445, *Trichoderma hamatum* ATCC 52198, *Trichoderma viride* ATCC 52440, *Streptomyces cacaoi asoensis* ATCC 19093, *Bacillus thuringiensis* ATCC 13367, *Beauveria bassiana* ATCC 26851, 48585 o 48023 , *Hirsutella thomsonii* ATCC 24874, *Metarhizium flavoviride* ATCC 32969, *Verticillium lencanii* ATCC 46578, *Collectotrichum gloeosporioides f. sp. jussiaeas* ATCC 52634. La mezcla obtenida se forma y se seca y se prepara pesticida. Antes de mezclar el gel (biopolímero) o pasta enfriada con los microorganismos o en el proceso de estabilización de la mezcla, se añaden los nutrientes convenientemente. Las siguientes sustancias pueden usarse como biopolímeros (un componente): granos, tubérculos, cultivos de raíces, almidón, cera y resinas naturales y sus derivados. Los agentes estabilizantes: glicerol, leche, leche.

Por otro lado, la solicitud de patente internacional [WO9107869A1](#) describe un revestimiento continuo para semillas, que comprende una formulación líquida en combinación un microorganismo para el control biológico de patógenos de plantas y una materia sólida en

forma de partículas carbonosas que incluye hulla, pizarras, musgo, barro del suelo, carbón activado o mezclas que protegen la semilla y la planta patógenos del suelo incluyendo *Pythium spp.*. Las composiciones comprenden la cepa bioprotectora *Trichoderma 22* (ATCC nº 20847) que es particularmente eficaz en la protección de una variedad de cultivos como

5 tomate, pepino, repollo, remolacha azucarera, remolacha de mesa, campo de maíz, maíz dulce, algodón, frijol, habichuela y soya. La composición comprende un adhesivo que está dentro del grupo comprendido por alcohol polivinílico, óxido de polialquileno, acetato de polivinilo, almidón, ésteres de celulosa tales como metilcelulosa e hidroxipropil celulosa, silicatos orgánicos, incluyendo ésteres orgánicos de silicio, gomas, alginato, y similares.

10

Para correcta interacción entre los hongos y las plantas, en particular, para lograr el efecto positivo de los mismos en la estimulación y germinación de las semillas se requiere una adhesión efectiva de las esporas a la superficie de las mismas, que puede variar en función de las especies de plantas y hongos. Por ello, es de suma importancia desarrollar una

15 estrategia que permita obtener la unión de esporas a semillas de una forma efectiva y estable, así como poder valorar cuantitativamente la efectividad de dicha estrategia para realizar un seguimiento de efecto esperado.

20

Dentro de los diferentes métodos conocidos para realizar un seguimiento de un efecto esperado, uno de los más importantes es la cuantificación por microscopía electrónica empleando marcadores moleculares fluorescentes fácilmente rastreables.

25

Por ello, son conocidos, en el estado de la técnica diversos métodos de cuantificación por microscopía mediante el uso de una gama amplia de marcadores moleculares fluorescentes. Por ejemplo, el DsRed y GFP (proteína fluorescente verde) se han empleado en el marcaje de *Rhizophagus intraradices* utilizando un enfoque biolístico.

30

Otro ejemplo, es la transformación de *Agrobacterium tumefaciens* que se ha propuesto recientemente para la vigilancia "in vivo" de los hongos micorrizas arbusculares durante el desarrollo simbiótico (Helber y Requena, 2.008, New Phytologist, 177: 537 hasta 548). Sin embargo, los autores de esta publicación informaron de que la expresión de fluorescencia en esporas transformadas fue transitoria y desapareció muy rápidamente. Por otra parte, la eficiencia de la transformación mediada por *Agrobacterium* de esporas de la especie *micorriza arbuscular* era muy baja.

Sin embargo, hasta la fecha, no se ha descrito ninguna composición adhesiva que catalice la unión de esporas de hongos a la superficie de semillas de vegetales para conseguir una unión estable y efectiva lo que garantiza el fenómeno de simbiosis.

5

Consecuentemente, tampoco se ha descrito en el estado del arte un método que permita cuantificar sistemáticamente y monitorizar la unión de dichas esporas de hongos a la superficie de semillas mediante un microscopía de fluorescencia para evidenciar la eficacia de dicha unión. Por ello, es necesario proveer de un método sencillo y eficaz que permita
10 evaluar cuantitativamente la adhesión de las esporas de los hongos a las semillas a fin de determinar la efectividad del método de adhesión.

La presente invención por ello, se refiere a una composición adhesiva para unir de forma estable esporas de hongos a la superficie de semillas de vegetales que comprende una
15 disolución acuosa de licor de maíz fermentado y/o hidrolizados de proteína de soja.

La presente invención también se refiere al método para obtener dicha composición adhesiva así como al uso de la composición objeto de la presente invención para la adhesión de esporas de hongos a la superficie de semillas de vegetales.

20

La presente invención también se refiere a un método indirecto que permite valorar cuantitativamente la eficacia de la composición adhesiva caracterizado porque se emplean microesferas de sílice o polietileno fluorescentes cuando se exponen a luz ultravioleta (UV), con características similares a las esporas en cuanto a la distribución de tamaño, la forma
25 esférica, densidad, superficie específica y afinidad por el agua superficial, gracias al cual se puede determinar la efectividad de una composición adhesiva destinada para adherir esporas de hongos a semillas de vegetales.

Por consiguiente la presente invención proporciona una composición adhesiva de esporas
30 de hongos a semillas de vegetales para fomentar o catalizar el fenómeno de simbiosis y al método de verificación o de cuantificación de dicha adhesión, lo que permite valorar la calidad de la composición adhesiva.

El método es muy ventajoso ya que permite obtener una medida indirecta del fenómeno de adhesión de esporas de hongos, en particular de *micorrizas arbusculares* a semillas de vegetales que de forma preferida son semillas de cereales.

5 Otra de las ventajas de la presente invención además de evitar el uso de organismos, en particular de organismos transformados genéticamente, es que las microesferas fluorescentes presentan una fluorescencia en el espectro ultravioleta (UV), que es una fluorescencia mucho más estable que si se emplearan esporas de *micorrizas arbusculares* que expresan marcadores fluorescentes.

10

La presente invención tiene una aplicación práctica trascendental, ya que proporciona una composición adhesiva para unir de forma estable esporas de hongos a la superficie de semillas de vegetales que comprende una disolución acuosa de licor de maíz fermentado y/o hidrolizados de proteína de soja así como aporta un método cuantitativo sencillo y fiable,
15 para determinar la efectividad de dicha composición adhesiva en la adhesión de microesferas fluorescentes a las semillas de vegetales y a partir del resultado obtenido poder inferir la efectividad de dicha composición para la adhesión de esporas de hongos, con características similares a las microesferas fluorescentes.

20 DESCRIPCION DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a una composición adhesiva para unir de forma estable esporas de hongos a la superficie de semillas de vegetales que comprende una disolución acuosa de licor de maíz fermentado y/o hidrolizados de proteína de soja.

25

Para el objeto de la presente invención se entiende por "unir de forma estable" a cualquier acción o puesta en práctica de un método que permite una unión de materia (esporas de hongos) a la superficie de un soporte (semillas de vegetales) seleccionado del grupo formado por: método de adsorción, método de enlace covalente, método de enlaces
30 cruzados y autoinmovilización, método de unión mediante puentes de hidrógeno y método de unión fuerzas de van der Waals.

La presente invención también se refiere al método para obtener dicha composición adhesiva así como al uso de la composición objeto de la presente invención para la adhesión de esporas de hongos a la superficie de semillas de vegetales.

5 La presente invención también se refiere a un método indirecto que permite valorar cuantitativamente la eficacia o capacidad de adhesión de la composición adhesiva caracterizado porque se emplean microesferas de sílice o polietileno fluorescentes cuando se exponen a luz ultravioleta (UV), con características similares a las esporas en cuanto a la distribución de tamaño, la forma esférica, densidad, superficie específica y afinidad por el
10 agua superficial, gracias al cual se puede determinar la efectividad de una composición adhesiva destinada para adherir esporas de hongos a semillas de vegetales.

Por consiguiente la presente invención proporciona una composición adhesiva de esporas de hongos a semillas de vegetales para fomentar o catalizar el fenómeno de simbiosis y al
15 método de verificación o de cuantificación de dicha adhesión, lo que permite valorar la calidad de la composición adhesiva.

El método es muy ventajoso ya que permite obtener una medida indirecta del fenómeno de adhesión de esporas de hongos, en particular de *micorrizas arbusculares* a semillas de
20 vegetales que de forma preferida son semillas de cereales.

La presente invención tiene una aplicación práctica trascendental, ya que proporciona una composición adhesiva para unir de forma estable esporas de hongos a la superficie de semillas de vegetales que comprende una disolución acuosa de licor de maíz fermentado y/o hidrolizados de proteína de soja; así como aporta un método cuantitativo sencillo y fiable,
25 para determinar la efectividad de dicha composición adhesiva en la adhesión de microesferas fluorescentes a las semillas de cereales y a partir del resultado obtenido poder inferir la efectividad de dicha composición para la adhesión de esporas de hongos, con características similares a las microesferas fluorescentes.

30 La presente invención también propone un método novedoso para la cuantificación indirecta de la capacidad de adhesión de esporas de hongos a la superficie de semillas, particularmente *micorrizas arbusculares* y se basa en el uso de una composición adhesiva

que comprende carbohidratos y/o hidrolizados de proteínas a la que se le añaden microesferas fluorescentes.

5 La peculiaridad de las microesferas fluorescentes que se emplean en la presente invención, es que son fabricadas de sílice, siendo transparentes cuando están expuestas a la luz del día, en cambio emiten fluorescencia de color amarillo-verde cuando se exponen a la luz ultravioleta (UV) correspondiente a una longitud de onda de 365 nm. Dichas esferas fluorescentes no son objeto de la presente invención, sino que se obtienen del mercado y son consideradas conocidas por un experto en la materia.

10

El método se fundamenta en que las microesferas fluorescentes a la luz UV presentan características similares a las esporas de las micorrizas, en cuanto a la distribución de tamaño, la forma esférica, densidad, superficie específica y su afinidad por el agua superficial. En concreto las microesferas empleadas en la presente invención tienen una
15 densidad de 0,98 g / cm³ y un tamaño de partícula de rango 1 - 120 micras.

De forma preferida las micorrizas son *micorrizas arbusculares Rhizophagus intraradices* y *Funneliformis mosseae*.

20 La composición adhesiva comprende entre 1 y 10 g de licor de maíz fermentado y/o de 3 a 30 ml de hidrolizado de proteína de soja, en un volumen comprendido entre 50 y 100 ml de agua.

De forma preferida la composición adhesiva es una composición líquida que se prepara
25 mediante un procedimiento de mezclado simple y agitación continua de 1 y 10 g de licor de maíz fermentado y/o 3 a 30 ml de hidrolizado de proteína de soja en un volumen comprendido entre 50 y 100 ml de agua hasta disolución.

De forma preferente, pero no limitativa de la invención, el método para preparar la
30 composición adhesiva comprende las siguientes etapas:

a.-) tomar entre 1 y 10 g de licor de maíz fermentado y/o de 5 a 30 ml de hidrolizado de proteína de soja,

b.-) mezclar con un volumen de 50 ml de agua,

- c.-) Agitar hasta la completa homogenización, y
- d.-) Añadir agua estéril en agitación hasta un volumen final de 100 ml de composición adhesiva final, obteniendo la composición adhesiva objeto de la presente invención.

5 El método para la cuantificación indirecta de la capacidad de adhesión de esporas de hongos a la superficie de semillas de vegetales mediante una composición adhesiva y microesferas fluorescentes de la presente invención comprende de las siguientes etapas:

- a.-) Tomar la composición adhesiva de la presente invención,
- 10 b.-) Mezclar la composición adhesiva de la etapa a) con microesferas fluorescentes de sílice o polietileno con un tamaño de partícula comprendido entre 1 - 120 micras y mantener en agitación,
- c.-) Poner en contacto las semillas de vegetales con la mezcla de la etapa b),
- d.-) Secar las semillas a temperatura ambiente,
- 15 e.-) Obtener imágenes de las microesferas fluorescentes adheridas a las semillas por microscopia de fluorescencia exponiéndolas a luz ultravioleta (UV) correspondiente a una longitud de onda de 365 nm, y
- f.-) Hacer un recuento de las microesferas fluorescentes adheridas a las semillas a partir de las imágenes obtenidas en la etapa e).

20

Según un aspecto preferido, la etapa c) se realiza sumergiendo las semillas de vegetales en la mezcla de la etapa b) en un recipiente en una relación volumétrica (semillas: volumen final) de 1:3, manteniendo en agitación la mezcla durante al menos 1 minuto entre 50 y 100 rpm, finalizando con una decantación y retirada del exceso de líquido de las semillas.

25

Según otro aspecto preferido, la etapa c) se realiza pulverizando la mezcla de la etapa b) sobre las semillas de vegetales de una forma homogénea utilizando una proporción de 1 L de mezcla por 100 kg de semillas.

30 La composición adhesiva de la presente invención es de forma preferente, pero no limitativa, una solución acuosa que comprende hidrolizado de proteína de soja y/o licor de maíz fermentado.

Las cantidades de los componentes de la presente composición adhesiva de acuerdo la realización preferente, son las siguientes: hidrolizado de proteína de soja entre 5 a 30 ml y agua hasta completar un volumen final de 100 mL; licor de maíz fermentado entre 1 a 10 g y agua hasta completar un volumen final de 100 mL o hidrolizado de proteína de soja entre 3 a 30 ml, licor de maíz fermentado entre 1 a 10 g y agua hasta completar un volumen final de 100 mL.

Es un objeto de la invención una composición adhesiva para unir de forma estable esporas de hongos a la superficie de semillas de vegetales que comprende una disolución acuosa de licor de maíz fermentado y/o hidrolizados de proteína de soja.

Según un aspecto importante, la composición adhesiva comprende de 3 a 30 ml de hidrolizado de proteína de soja y/o de 1 a 10 gr de licor de maíz fermentado en agua hasta completar un volumen final de 100 mL.

Es otro objeto de la presente invención, un método para preparar la composición adhesiva anteriormente citada que comprende las siguientes etapas:

- a.-) tomar entre 1 y 10 g de licor de maíz fermentado y/o de 3 a 30 ml de hidrolizado de proteína de soja,
- b.-) mezclar con un volumen de 50 ml de agua,
- c.-) agitar hasta la completa homogenización, y
- d.-) añadir agua estéril en agitación hasta un volumen final de 100 ml de composición adhesiva final.

Es otro objeto de la presente invención, un método de cuantificación de la capacidad de adhesión a la superficie de semillas de vegetales de microesferas fluorescentes mediante la composición adhesiva de la invención donde las microesferas representan las esporas de hongos que comprende las siguientes etapas:

- a.-) Tomar la composición adhesiva de la presente invención,
- b.-) Mezclar la composición adhesiva de la etapa a) con microesferas fluorescentes de sílice o polietileno con un tamaño de partícula comprendido entre 1 - 120 micras y mantener en agitación,
- c.-) Poner en contacto las semillas de vegetales con la mezcla de la etapa b),

d.-) Secar las semillas a temperatura ambiente,

e.-) Obtener imágenes de las microesferas fluorescentes adheridas a las semillas por microscopia de fluorescencia exponiéndolas a luz ultravioleta (UV) correspondiente a una longitud de onda de 365 nm, y

5 f.-) Hacer un recuento de las microesferas fluorescentes adheridas a las semillas a partir de las imágenes obtenidas en la etapa e).

Según un aspecto preferido, la etapa c) se realiza sumergiendo las semillas de vegetales en la mezcla de la etapa b) en un recipiente en una relación volumétrica (semillas: volumen
10 final) de 1:3, manteniendo en agitación la mezcla durante al menos 1 minuto entre 50 y 100 rpm, finalizando con una decantación y retirada del exceso de líquido de las semillas.

Según otro aspecto preferido, la etapa c) se realiza pulverizando la mezcla de la etapa b) sobre las semillas de vegetales de una forma homogénea utilizando una proporción de 1 L
15 de mezcla por 100 kg de semillas.

Según un aspecto preferido, las microesferas tienen una densidad de $0,98 \text{ g / cm}^3$ y un tamaño de partícula de rango 1 - 120 micras.

20 Según un aspecto preferido, el método de cuantificación es apto para semillas de cereales.

Según un aspecto preferido, el método de cuantificación es apto para esporas de micorrizas arbusculares de los géneros *Rhizophagus intraradices* y *Funneliformis mosseae*.

25 Es otro objeto de la presente invención, el uso de la composición adhesiva de la presente invención para catalizar la adhesión de esporas de hongos a la superficie de semillas vegetales.

Es otro objeto de la presente invención, el uso de la composición adhesiva de la presente
30 invención para catalizar la adhesión de esporas de micorrizas arbusculares de los géneros *Rhizophagus intraradices* y *Funneliformis mosseae*.

EJEMPLOS DE REALIZACIÓN

Los siguientes ejemplos son formas de realización de la presente invención pero no son limitativos de la misma.

Ejemplo 1. Obtención de la composición adhesiva de la presente invención

5

Para el siguiente ejemplo se han hecho tres lotes de 3 composiciones adhesivas:

- Muestra 1: 15 ml de hidrolizado de proteína de soja y agua hasta completar un volumen final de 100 mL de composición.
- 10 - Muestra 2: 4 gramos de licor de maíz fermentado y agua hasta completar un volumen final de 100 mL.
- Muestra 3: Muestra control (A) consistente en agua estéril.

Todas las muestras se obtuvieron por el siguiente procedimiento:

- 15 a.-) tomar la cantidad adecuada de licor de maíz fermentado y/o de hidrolizado de proteína de soja,
- b.-) mezclar con un volumen de 50 ml de agua,
- c.-) Agitar hasta la completa homogenización, y
- d.-) Añadir agua estéril en agitación hasta un volumen final de 100 ml de composición
- 20 adhesiva final.

Ejemplo 2. Método para la cuantificación de microesferas fluorescentes superficie de las semillas mediante una composición adhesiva a base de hidrolizado de proteínas de soja.

- 25 El siguiente ejemplo representa una prueba de concepto de la eficacia de la composición adhesiva correspondiente a la Muestra 1 del ejemplo 1.

Las etapas llevadas a cabo para la cuantificación por fluorescencia fueron las siguientes:

- a.-) tomar la Muestra 1,
- 30 b.-) añadir 36 mg de microesferas fluorescentes y agitar hasta la completa homogenización,
- c.-) sumergir las semillas a tratar en la mezcla de la etapa anterior, en un frasco con tapa en una proporción volumétrica 1:3 (volumen semillas: volumen final), mantener en agitación durante al menos 1 minuto entre 50 y 100 rpm y decantar el líquido y retirar el exceso y reservar las semillas,

d.-) secar las semillas a temperatura ambiente,

e.-) obtener imágenes por microscopia de fluorescencia, exponiendo las semillas secas a luz UV, y

f.-) hacer un recuento de las microesferas adheridas a las semillas a partir de las imágenes obtenidas en la etapa anterior.

5

En este punto para poder valorar la capacidad de adhesión se ponen las semillas en un contenedor con tapa de una capacidad igual 300 mL y se mantiene en agitación durante 15 minutos entre 50 y 100 rpm, a fin de evaluar la fuerza de adhesión de las microesferas en la superficie de la semilla. A continuación, se retiran las semillas desde el contenedor se secan a temperatura ambiente y se vuelven a obtener imágenes por microscopia de fluorescencia, exponiendo las semillas a luz UV para hacer un recuento de las microesferas adheridas a las semillas a partir de las imágenes obtenidas en la etapa anterior, y así poder calcular el porcentaje de microesferas unidas a la semilla después de agitar mediante la siguiente

10

15

fórmula matemática:

$$\frac{\text{microesferas de semillas después de agitar} \times 100}{\text{microesferas de semillas antes de la agitación}}$$

20

Así se obtiene el valor porcentual de las microesferas adheridas a la superficie de las semillas después de un proceso de agitación agresivo.

25

Ejemplo 3. Método para la cuantificación de microesferas fluorescentes a la superficie de las semillas mediante una composición adhesiva a base de licor de maíz fermentado.

El siguiente ejemplo representa una prueba de concepto de la eficacia de la composición adhesiva correspondiente a la Muestra 2 del ejemplo 1.

30

Las etapas llevadas a cabo para la cuantificación por fluorescencia fueron las siguientes:

a.-) tomar la Muestra 2,

b.-) añadir 36 mg de microesferas fluorescentes y agitar hasta la completa homogenización,

c.-) pulverizar por el método de espray la mezcla de la etapa b) sobre las semillas de vegetales de una forma homogénea utilizando una proporción de 1 L de mezcla por 100 kg de semillas,

d.-) secar las semillas a temperatura ambiente,

5 e.-) obtener imágenes por microscopia de fluorescencia, exponiendo las semillas secas a luz UV, y

f.-) hacer un recuento de las microesferas adheridas a las semillas a partir de las imágenes obtenidas en la etapa anterior.

10 En este punto para poder valorar la capacidad de adhesión se ponen las semillas en un contenedor con tapa de una capacidad igual 300 mL y se mantiene en agitación durante 15 minutos entre 50 y 100 rpm, a fin de evaluar la fuerza de adhesión de las microesferas en la superficie de la semilla. A continuación, se retiran las semillas desde el contenedor y se vuelven a obtener imágenes por microscopia de fluorescencia, exponiendo las semillas a luz
15 UV para hacer un recuento de las microesferas adheridas a las semillas a partir de las imágenes obtenidas en la etapa anterior, y así poder calcular el porcentaje de microesferas unidas a la semilla después de agitar mediante la siguiente fórmula matemática:

$$20 \quad \frac{\text{microesferas de semillas después de agitar} \times 100}{\text{microesferas de semillas antes de la agitación}}$$

Así se obtiene el valor porcentual de las microesferas adheridas a la superficie de las semillas después de un proceso de agitación agresivo.

25

Ejemplo 4: Ejemplo comparativo para valoración de la capacidad de adhesión de la composición adhesiva sobre semillas de cereales

En los experimentos de los ejemplos 2 y 3 se usaron un total de 300 semillas de trigo, maíz
30 y soja, en cada experimento y distribuidas en grupos de 100 semillas por cada clase. Adicionalmente se realizó un experimento control siguiendo los mismos pasos de los ejemplos 2 y 3, pero sustituyendo la composición adhesiva por agua estéril a modo de control, es decir empleando la Muestra 3 como muestra control. Cada experimento se realizó por triplicado.

La tabla 1 muestra el número de microesferas fluorescentes adheridas la superficie de las semillas (medias y desviaciones estándares) antes y después de lavar las semillas con agitación agresiva. Los porcentajes de microesferas unidas a la superficie de las semillas después de la agitación agresiva respecto al número de microesferas unidas a la superficie de las semillas después de la agitación normal se muestran en paréntesis; es decir, entre paréntesis se muestran los porcentajes de retención de microesferas fluorescentes después de la agitación agresiva.

10

Tabla 1

	trigo		maíz		soja	
	Antes agitación	Después agitación	Antes agitación	Después agitación	Antes agitación	Después agitación
A (control)	5,3 ± 0,1 ^a	2,0 ± 0,1 (38)	29,3 ± 1,0	18,9 ± 1,3 (64)	26,3 ± 1,2	20,7 ± 1,3 (78)
Muestra 1	13,0 ± 0,3	9,2 ± 0,2 (71)	66,0 ± 3,1	57,5 ± 2,8 (87)	67,4 ± 3,7	62,9 ± 3,5 (93)
Muestra 2	12,5 ± 0,4	9,7 ± 0,3 (78)	65,8 ± 4,4	57,6 ± 2,6 (87)	68,4 ± 2,9	64,8 ± 3,0 (95)

Tras realizar este experimento se observó que la capacidad de adhesión de la composición adhesiva permitió que el porcentaje de las semillas mantuvieran adheridas las microesferas fluorescentes tras el proceso de agitación agresiva fuera significativamente más alto que en las muestras control.

15

REIVINDICACIONES

- 5
1. Una composición adhesiva para unir de forma estable esporas de hongos a la superficie de semillas de vegetales caracterizada porque comprende una disolución acuosa de licor de maíz fermentado y/o hidrolizados de proteína de soja.
- 10
2. Composición adhesiva según la reivindicación 1 caracterizada porque comprende de 3 a 30 ml de hidrolizado de proteína de soja y/o de 1 a 10 gr de licor de maíz fermentado en agua hasta completar un volumen final de 100 mL.
- 15
3. Método para preparar la composición adhesiva de reivindicaciones 1 y 2 caracterizado porque comprende las siguientes etapas:
 - a.-) tomar entre 1 y 10 g de licor de maíz fermentado y/o de 3 a 30 ml de hidrolizado de proteína de soja,
 - b.-) mezclar con un volumen de 50 ml de agua,
 - c.-) agitar hasta la completa homogenización, y
 - d.-) añadir agua estéril en agitación hasta un volumen final de 100 ml de composición adhesiva final.
- 20
4. Método de cuantificación de la capacidad de adhesión a la superficie de semillas de vegetales de microesferas fluorescentes mediante la composición adhesiva de reivindicaciones 1 a 2 donde las microesferas representan las esporas de hongos caracterizado porque comprende las siguientes etapas:
 - a.-) Tomar la composición adhesiva de la presente invención,
 - b.-) Mezclar la composición adhesiva de la etapa a) con microesferas fluorescentes de sílice o polietileno con un tamaño de partícula comprendido entre 1 - 120 micras y mantener en agitación,
 - c.-) Poner en contacto las semillas de vegetales con la mezcla de la etapa b),
 - d.-) Secar las semillas a temperatura ambiente,
 - e.-) Obtener imágenes de las microesferas fluorescentes adheridas a las semillas por microscopia de fluorescencia exponiéndolas a luz ultravioleta (UV) correspondiente a una longitud de onda de 365 nm, y
- 25
- 30

f.-) Hacer un recuento de las microesferas fluorescentes adheridas a las semillas a partir de las imágenes obtenidas en la etapa e).

- 5
5. Método de cuantificación según la reivindicación 4 caracterizado porque la etapa c) se realiza sumergiendo las semillas de vegetales en la mezcla de la etapa b) en un recipiente en una relación volumétrica (semillas: volumen final) de 1:3, manteniendo en agitación la mezcla durante al menos 1 minuto entre 50 y 100 rpm, finalizando con una decantación y retirada del exceso de líquido de las semillas.
- 10
6. Método de cuantificación según la reivindicación 4 caracterizado porque la etapa c) se realiza pulverizando la mezcla de la etapa b) sobre las semillas de vegetales de forma homogénea utilizando una proporción de 1 L de mezcla por 100 kg de semillas.
- 15
7. Método de cuantificación según la reivindicación 4 caracterizado porque las microesferas tienen una densidad de 0,98 g / cm³ y un tamaño de partícula de rango 75 - 90 micras.
- 20
8. Método de cuantificación según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7 caracterizado porque es apto para semillas de cereales.
- 25
9. Método de cuantificación según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7 caracterizado porque es apto para esporas de micorrizas arbusculares de los géneros *Rhizophagus intraradices* y *Funneliformis mosseae*.
- 30
10. Uso de la composición adhesiva de las reivindicaciones 1 a 2 para catalizar la adhesión de esporas de hongos a la superficie de semillas vegetales.
11. Uso de la composición adhesiva según la reivindicación 10 para catalizar la adhesión de esporas de micorrizas arbusculares de los géneros *Rhizophagus intraradices* y *Funneliformis mosseae*.



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201531523

②② Fecha de presentación de la solicitud: 22.10.2015

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **C09J103/00** (2006.01)
C09J105/00 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	KR 100773298B B1 (UNIV SUNCHON NAT IND ACAD COOP) 05/11/2007, (resumen) World Patent Index [en línea]. Thompson Publications, Ltd. [recuperado el 12/11/2015]. Recuperado de EPOQUENET, Base de datos WPI.	1, 2, 3, 10
A	CN 101926259 A (UNIV SOUTHWEST FORESTRY) 29/12/2010, (resumen) World Patent Index [en línea]. Thompson Publications, Ltd. [recuperado el 12/11/2015]. Recuperado de EPOQUENET, Base de datos WPI.	1-11
A	WO 2009009805 A1 (BIOCULT PTY LTD et al.) 15/01/2009, reivindicaciones	1-11

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
12.11.2015

Examinador
I. Rueda Molíns

Página
1/4

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

C09J

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

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 12.11.2015

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-11	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 4-9, 11	SI
	Reivindicaciones 1, 2, 3, 10	NO

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

Base de la Opinión.-

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

1. Documentos considerados.-

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	KR 100773298B B1 (UNIV SUNCHON NAT IND ACAD COOP)	05.11.2007
D02	CN 101926259 A (UNIV SOUTHWEST FORESTRY)	29.12.2010
D03	WO 2009009805 A1 (BIOCULT PTY LTD et al.)	15.01.2009

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA (artículos 6 y 8 LP 11/86)**

En las reivindicaciones 1 y 2 de la solicitud de patente se reivindica una composición adhesiva para unir de forma estable esporas de hongos a la superficie de semillas de vegetales caracterizada porque comprende una disolución acuosa de licor de maíz fermentado y/o hidrolizados de proteína de soja.

En la reivindicación 3 de la solicitud de patente se reivindica un método para preparar la composición adhesiva anteriormente citada.

En las reivindicaciones 4-9 de la solicitud de patente se reivindica un método de cuantificación de la capacidad de adhesión a la superficie de semillas de vegetales mediante la composición adhesiva objeto de la invención, donde las microesferas representan las esporas de hongos.

En las reivindicaciones 10 y 11 de la solicitud de patente se reivindica el uso de la composición adhesiva para catalizar la adhesión de esporas de hongos a la superficie de semillas vegetales.

El documento D01, que es el que refleja el estado de la técnica más cercano, divulga un método para inocular micorrizas arbusculares con objeto de favorecer el desarrollo de una determinada especie vegetal. En una de las etapas que comprende dicho método se emplea un material adhesivo, como harina de trigo, o sirope de almidón para la preparación del inóculo de micorrizas arbusculares.

Por tanto, teniendo en cuenta la información divulgada en el documento D01 las reivindicaciones 1, 2, 3 y 10 de la solicitud de patente presentan novedad, pero no actividad inventiva. Según lo establecido en los artículos 6 y 8 de la LP 11/86.