

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 659 385**

51 Int. Cl.:

C05F 11/10 (2006.01)
C05C 5/00 (2006.01)
C05F 11/00 (2006.01)
A01N 47/44 (2006.01)
C05C 1/00 (2006.01)
A01N 37/44 (2006.01)
C05C 11/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.12.2008 PCT/SE2008/051537**
87 Fecha y número de publicación internacional: **04.07.2017 WO09082351**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.12.2008 E 08864797 (9)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.12.2017 EP 2229054**

54 Título: **Empleo de un fertilizante que contiene L-amino ácido para mejorar el crecimiento de las raíces y el crecimiento de micorriza**

30 Prioridad:

20.12.2007 SE 0702843
20.12.2007 US 15204

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
15.03.2018

73 Titular/es:

AREVO AB (100.0%)
Box 4095
904 03 Umeå, SE

72 Inventor/es:

NÅSHOLM, TORGNY y
SVENNERSTAM, HENRIK

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 659 385 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

Empleo de un fertilizante que contiene L-amino ácido para mejorar el crecimiento de las raíces y el crecimiento de micorriza

5 La presente invención se refiere al empleo de un fertilizante que afecta la distribución de biomasa vegetal. Más específicamente, el fertilizante puede estimular el crecimiento de las raíces, el desarrollo de raíces finas, aumentar el número de puntas de las raíces y el desarrollo de la micorriza. Por lo tanto, la invención proporciona métodos para utilizar el fertilizante con el fin de estimular el crecimiento de las raíces, el desarrollo de raíces finas, aumentar el número de puntas de las raíces y el desarrollo de la micorriza. Además, la invención proporciona un método para utilizar el fertilizante para la modulación de la fracción de raíz de la biomasa.

10 **Técnica anterior**

15 La distribución de crecimiento entre brotes y raíces es un proceso importante por el cual la planta se aclimata a diversas condiciones medioambientales. Es bien sabido que el suministro de nitrógeno es un determinante principal de este proceso. Con un alto suministro de nitrógeno, el crecimiento de las partes por encima del suelo se estimula en relación con el de las estructuras subterráneas, mientras que, con un suministro bajo de nitrógeno, se potencia el crecimiento de la raíz (Figura 1). Esta fuerte dependencia de la distribución en el suministro de nitrógeno se ha demostrado para varias especies de plantas y para un intervalo de diferentes tasas de adición de nitrógeno. El suministro de nitrógeno alterará, por lo tanto, la estructura de las plantas y, de ese modo, la resistencia de la planta a diversas tensiones, como el viento y la sequía.

20 La idea general de los efectos del nitrógeno sobre la distribución de biomasa vegetal es que, a mayores tasas de suministro de N, las plantas perciben una menor necesidad de captación de nitrógeno y, por lo tanto, de crecimiento de raíces, pero una mayor necesidad de absorción de carbono y, por lo tanto, de crecimiento de brotes. Esta simple relación entre el acceso a nitrógeno y carbono y la distribución de biomasa puede regularse a través de señales externas y mediante la detección de los niveles de metabolitos críticos tales como la sacarosa y la glutamina en la planta.

25 Durante el cultivo de plantas, un amplio suministro de nutrientes y, en particular, de nitrógeno, es un requisito previo para un buen crecimiento. Como se describió anteriormente, elevadas cantidades de nutrientes generalmente estimulan el crecimiento de las partes por encima del suelo más que de las partes bajo tierra y por lo tanto de las plantas cultivadas comercialmente, debido al amplio suministro de nutrientes; a menudo tienen una fracción de masa de brotes alta y desequilibrada. Sin embargo, hay una serie de situaciones en las que las plantas con una fracción de masa de raíz alta son superiores a las que tienen una fracción de masa de raíz baja. Típicamente, las plantas precultivadas para plantación al aire libre o las plantas cultivadas a partir de esquejes deben tener una fracción de masa de raíz alta para permitir un establecimiento eficaz después de la plantación. Por lo tanto, en todas las situaciones en las que las plantas o plántulas son precultivadas para una plantación posterior, una alta fracción de masa de raíz será un factor positivo para el crecimiento y el establecimiento.

35 De lo que se describió anteriormente, se puede concluir que el cultivo eficaz de plantas es incompatible con un patrón óptimo de distribución de plantas. La necesidad de elevadas tasas de crecimiento durante el cultivo solo puede lograrse mediante la aplicación de altas cantidades de N, que a su vez estimula el crecimiento de los brotes más que el crecimiento de las raíces y, por lo tanto, conduce a una distribución desequilibrada. Idealmente, las condiciones de cultivo de las plantas deberían permitir un crecimiento eficaz pero aun así tener una fracción de masa de raíz alta. Esto no se puede lograr con los métodos de cultivo actuales.

40 Durante la última década, varios estudios han demostrado que los compuestos orgánicos de nitrógeno y en particular los aminoácidos son importantes fuentes de nitrógeno para las plantas. Estos estudios han demostrado la existencia de captación de aminoácidos tanto en el campo como en el laboratorio y para una gama de diferentes especies de plantas, incluyendo plantas micorrizales y no micorrizales, y también para varias plantas de cultivo, p. ej., trigo, maíz, cebada (Lipson y Näsholm 2001). Varios estudios han demostrado cómo los compuestos de nitrógeno orgánico absorbidos se metabolizan después de la captación por la raíz y también muestran cómo el nitrógeno de tales fuentes se incorpora a las proteínas. Por otra parte, varios estudios han demostrado que las plantas pueden utilizar compuestos de nitrógeno orgánico para el crecimiento. Por lo tanto, actualmente se acepta ampliamente que los compuestos de nitrógeno orgánico, tales como los aminoácidos, pueden funcionar como fuentes de nitrógeno para las plantas.

45 En general, se sostiene que todas las formas de nitrógeno después de la absorción (es decir, formas de nitrógeno tanto inorgánico como orgánico) se metabolizan y, por lo tanto, forman una reserva de nitrógeno común dentro de la planta, que está disponible para el crecimiento de la planta. Por lo tanto, de acuerdo con este conocimiento general, todas las formas de nitrógeno absorbidas por la raíz de una planta serían parte de una reserva de nitrógeno común y, por lo tanto, todas las formas de nitrógeno absorbidas por la raíz de una planta deberían distribuirse uniformemente dentro de la planta.

55 Se conoce a partir de estudios in vitro en el documento RU2016510 que el producto hidrolizado de proteína que contiene una mezcla de aminoácidos se ha utilizado para estimular el enraizamiento del callo y el crecimiento de la

planta en procedimientos hidropónicos. En esta patente no se ilustra nada sobre el empleo de un L-aminoácido natural puro para estimular el crecimiento radicular de las plantas.

5 El documento AU659115 describe un procedimiento para fabricar y el empleo de un fertilizante que contiene L-aminoácidos naturales, que se producen por digestión enzimática de al menos dos enzimas proteolíticas. El documento AU659115 solo comenta la ventaja de utilizar moléculas pequeñas (aminoácidos) como nutrientes para mejorar la captación. No se ilustra nada sobre el empleo de un L-aminoácido natural puro para estimular el crecimiento de las raíces de las plantas. Además, no se ilustra nada acerca del desarrollo simultáneo de micorriza al mismo tiempo que se estimula el crecimiento de la totalidad de la planta en estas dos patentes.

10 El documento EP 1,284,945 describe un fertilizante adecuado para plantas, en particular coníferas. Una característica ventajosa del fertilizante es que es sustancialmente estacionario, minimizando así la pérdida indeseable de nitrógeno al medio ambiente. La principal fuente de nitrógeno del fertilizante es la forma L de un aminoácido básico o su sal, en particular L-arginina. Este documento no menciona absolutamente nada con respecto a la estimulación del crecimiento de la raíz y el desarrollo de la micorriza.

15 El documento DD-279 165 describe composiciones fertilizantes que comprenden arginina y/o glutamina combinadas con vainillina y ácido cumárico que influyen en el crecimiento del brote y las raíces de abeto y alerce.

El documento WO 98/19533 se refiere a un fertilizante que comprende ácido glutámico y ácido aminobutírico y su efecto sobre el crecimiento del follaje y las raíces.

20 Por lo tanto, todavía existe la necesidad de un fertilizante que contenga nitrógeno que tenga la capacidad de estimular el crecimiento de la raíz y el desarrollo de la micorriza al mismo tiempo que estimula el crecimiento de la planta completa.

Se ha observado que las plantas de diferentes especies crecen lentamente o tienen un inicio lento cuando se plantan al aire libre en la regeneración del bosque.

25 También se ha especulado adicionalmente que una alta fracción de masa de raíz y un alto número de puntas de la raíz o raíces finas ayudaría a estas plantas pequeñas a establecerse eficazmente en el nuevo entorno de crecimiento.

En resumen, existe la necesidad de un fertilizante que pueda utilizarse para aumentar la fracción de la masa de raíz, el número de raíces, las puntas de las raíces y el número de raíces finas en las plantas, pero sin comprometer el crecimiento de la planta completa.

Compendio de la invención

30 Sorprendentemente, se ha demostrado ahora que es posible proporcionar un fertilizante capaz de inducir y estimular el crecimiento de las raíces, así como el desarrollo de micorrizas al mismo tiempo que estimula el crecimiento de toda la planta.

La presente invención proporciona un método para utilizar un fertilizante caracterizado porque comprende un L-aminoácido de origen natural como fuente de nitrógeno para estimular el crecimiento de la raíz.

35 Adicionalmente, esta invención proporciona un método para utilizar un fertilizante caracterizado porque comprende un L-aminoácido de origen natural como fuente de nitrógeno para estimular el desarrollo de la micorriza.

40 La presente invención proporciona adicionalmente un método para utilizar un fertilizante, que comprende un aminoácido seleccionado del grupo de L-glutamina, L-asparagina y L-arginina como principal fuente de nitrógeno, opcionalmente junto con un conservante adecuado, para estimular el crecimiento de la raíz y/o para estimular el desarrollo de la micorriza.

Adicionalmente, se describe el empleo de un fertilizante que comprende un L-aminoácido de origen natural como fuente de nitrógeno principal para estimular el crecimiento de la raíz y para estimular el desarrollo de la micorriza.

45 Adicionalmente, se describe el empleo de un fertilizante que comprende un L-aminoácido de origen natural, elegido del grupo de L-arginina, L-asparagina y L-glutamina como fuente de nitrógeno, para estimular el crecimiento de la raíz y para estimular el desarrollo de la micorriza.

Adicionalmente, se describe el empleo de un fertilizante en donde el fertilizante también comprende nitrógeno inorgánico.

Adicionalmente, el L-aminoácido se selecciona del grupo de L-arginina, L-asparagina y L-glutamina.

50 Adicionalmente, se describe el empleo de un fertilizante en donde al menos 30% (en peso) de la fuente de nitrógeno en el mismo, preferiblemente al menos 70% (en peso) de la fuente de nitrógeno en el mismo, preferiblemente al menos 85% (en peso), y lo más preferible al menos 90% (en peso), es un L-aminoácido y la otra fuente de nitrógeno

es un compuesto de nitrógeno inorgánico, de manera que la estimulación del crecimiento de la raíz y el brote está relacionada con la razón entre el L-aminoácido y el compuesto de nitrógeno inorgánico. En algunos ejemplos, el L-aminoácido es L-arginina y/o L-glutamina.

También se describe un método para utilizar el fertilizante para la modulación de la fracción de raíz de la biomasa.

- 5 Además, se describe que cuanto más alta sea la fracción de la fuente de nitrógeno que es un L-aminoácido, mayor es la fracción de raíz de la biomasa, es decir, más L-aminoácido en el fertilizante utilizado proporcionará más raíces, más raíces finas y muchas más puntas de raíz que pueden ayudar a las plantas cuando se plantan al aire libre.

Adicionalmente, se describe el empleo de un fertilizante que comprende un L-aminoácido de origen natural en donde el fertilizante también contiene un conservante adecuado.

- 10 Adicionalmente, se describe el empleo de un fertilizante que comprende un L-aminoácido de origen natural en donde el conservante se selecciona del grupo de conservantes tales como ácido benzoico, ácido acético, ácido salicílico, ácido propiónico, ácido sórbico, ácido cítrico o sus sales y alexin plus.

Adicionalmente, se describe el empleo de un fertilizante que comprende un L-aminoácido de origen natural en donde el fertilizante es sólido o es una solución.

- 15 La presente invención también proporciona un método para utilizar un fertilizante, que comprende un aminoácido seleccionado del grupo de L-glutamina, L-asparagina y L-arginina como principal fuente de nitrógeno, opcionalmente junto con un conservante adecuado, para estimular el crecimiento de la raíz.

- 20 La presente invención también proporciona un fertilizante que comprende un aminoácido de origen natural. Los aminoácidos de origen natural que se pueden utilizar en el fertilizante de la presente invención son L-glutamina, L-asparagina y L-arginina. El fertilizante también contiene un conservante adecuado.

Preferiblemente al menos 30% (en peso) de la fuente de nitrógeno en el mismo, preferiblemente al menos 70% (en peso), preferiblemente al menos 85% (en peso) y lo más preferiblemente al menos 90% (en peso) es un aminoácido natural, tal como L-arginina y/o L-glutamina.

- 25 Adicionalmente, el empleo de un fertilizante podría caracterizarse porque el fertilizante también comprende un compuesto de nitrógeno inorgánico tal como nitrato o amonio para estimular simultáneamente el crecimiento de raíces y brotes.

Adicionalmente, los ejemplos de compuestos de nitrógeno inorgánicos son nitrato y amonio.

- 30 Preferiblemente, el conservante se selecciona del grupo de un benzoato tal como benzoato de potasio, ácido acético, ácido salicílico, ácido propiónico, ácido sórbico, ácido cítrico y alexin plus. Una concentración típica de benzoato de potasio asciende a 400-3000 ppm, preferiblemente 600-2000 ppm y lo más preferiblemente 800-1200 ppm. Una concentración típica de ácido acético asciende a 2000-10000 ppm, preferiblemente 4000-8000 ppm, y lo más preferiblemente 5000-7000 ppm. Una concentración típica de ácido salicílico asciende a 250-2000 ppm, preferiblemente 500-1500 ppm, y lo más preferiblemente 800-1200 ppm. Una concentración típica de ácido propiónico asciende a 2000-10000 ppm, preferiblemente 4000-8000 ppm, y lo más preferiblemente 5000-7000 ppm.
- 35 Una concentración típica de ácido sórbico asciende a 2500-20000 ppm, preferiblemente 5000-15000 ppm, y lo más preferiblemente 7500-12500 ppm. Una concentración típica de Alexin plus (Citrox Ltd, Reino Unido) asciende a 10000-50000 ppm, preferiblemente 20000-40000 ppm, y lo más preferiblemente 25000-35000 ppm.

- 40 Preferiblemente, el fertilizante contiene un componente adicional seleccionado del grupo de sulfato de magnesio, sulfato de potasio, dihidrogenofosfato de potasio, cloruro de potasio y elementos vestigiales, en donde los elementos vestigiales se seleccionan del grupo de Fe, Mn, Cu, Zn, B y Mo. Típicamente, el fertilizante puede comprender 2-5% (en peso), preferiblemente 3-4% (en peso) de sulfato de magnesio, 1-3% (en peso), preferiblemente 2-3% (en peso) de sulfato de potasio, preferiblemente 4-5 % (en peso) de dihidrogenofosfato de potasio, 2-5% (en peso), preferiblemente 3-4% (en peso) de cloruro de potasio. Preferiblemente, los elementos vestigiales se añaden como una composición especial de elementos vestigiales. Un ejemplo de tal composición es Micro+, disponible en LMI AB, Suecia. Típicamente, la cantidad de Micro+ en el fertilizante es 4-5% (en peso).
- 45

Descripción detallada de la invención

La presente invención se describirá a continuación adicionalmente con referencia a las figuras adjuntas, en las que:

- 50 La Figura 1 muestra el efecto del estado de nitrógeno de la planta (% de concentración de N óptima para el crecimiento) sobre la distribución de biomasa vegetal expresada como fracción de biomasa de brotes de biomasa total. A, B y C se refieren a datos de experimentos con *Picea abies*, *Pinus contorta* y *Pinus sylvestris* respectivamente (de Ingestad y Ågren 1986);

La Figura 2 revela el contenido de nitrógeno derivado de la captación de L-Glutamina y nitrato encontrado en toda la planta y en las raíces de las plántulas de *Arabidopsis thaliana*. El gráfico muestra que la L-Glutamina absorbida se

utiliza preferentemente para el crecimiento de la raíz.

La Figura 3 describe la distribución de nitrógeno derivado de la absorción de L-arginina. Las plantas cultivadas en nitrato 3 mM se suministraron con pequeñas cantidades (30 μ M) de L-Arginina marcada con N-15. Después de 21 días de cultivo, las plantas se cosecharon, las raíces y los brotes se separaron y posteriormente se analizaron por su contenido de N-15. La cantidad de N-15, expresada como exceso de porcentaje en átomos, en las dos partes de la planta muestra que el nitrógeno de la L-Arginina se utiliza preferentemente para el crecimiento de la raíz;

Las Figuras 4A y 4B muestran la biomasa de plantas de *Arabidopsis thaliana* y la distribución de biomasa a raíces y brotes de plantas cultivadas con nitrato de amonio o L-Glutamina y nitrato (4A) y la fracción de la masa de raíz de la planta cultivada con nitrato de amonio o L-Glutamina y nitrato (4B);

Las Figuras 5A y 5B revelan la biomasa de plantas de *Populus* y la distribución de biomasa a raíces y brotes de plantas cultivadas con nitrato de amonio o L-Glutamina y nitrato (5A) y la fracción de la masa de raíz de la planta cultivada con nitrato de amonio o L-Glutamina y nitrato (5B).

La Figura 6 describe el contenido de quitina de las raíces de pino Escocés. Las plantas se cultivaron con una mezcla de amonio y nitrato como fuentes de nitrógeno (referencia), se cultivaron con amonio y nitrato, pero se les suministró arginina después del último evento de fertilización en otoño (arginina cargada) o se cultivaron con arginina como única fuente de nitrógeno en toda la estación de crecimiento (arginina cultivada). La quitina es parte de la pared celular de los hongos y, por lo tanto, indica la fracción de micorriza en el sistema de raíces total.

La Figura 7 describe el efecto de diversas proporciones de L-Glutamina (Gln) sobre la producción total de biomasa (Figura 7A) y la producción de raíces (Figura 7B).

La Figura 8 describe el efecto de L-Asparagina (Asn) sobre la producción total de biomasa (Figura 8A) y la producción de raíces (Figura 8B).

Mediante una serie de experimentos, los autores de la presente invención han descubierto que las plantas a las que se ha suministrado una mezcla de formas de nitrógeno orgánico e inorgánico distribuirán el nitrógeno derivado de estas formas diferentes de forma desigual, de manera que se encuentra en las raíces una aportación más grande de nitrógeno de la planta derivado de formas de nitrógeno orgánico en que en otras partes de la planta. En la figura 2 se muestran los resultados de un experimento en el que se suministraron a pequeñas plantas de *Arabidopsis thaliana* una mezcla de amonio y nitrato o una mezcla de L-glutamina y nitrato. La figura 2 muestra que, para toda la planta, aprox. 50% de nitrógeno deriva de la captación de L-Glutamina mientras que aprox. 75% del nitrógeno de la raíz deriva de esta forma de nitrógeno. Por el contrario, aprox. 45% del nitrógeno de la planta entera deriva de la captación de nitrato, mientras que solo aprox. 25% del nitrógeno de la raíz deriva de la captación de esta forma de nitrógeno. Del mismo modo, cuando las plantas de *A. thaliana* se cultivaron en nitrato y solo se añadieron pequeñas cantidades de L-Arginina a los medios de crecimiento (Figura 3), se encontró una mayor fracción de nitrógeno derivado de L-Arginina en las raíces en comparación con los brotes. Estos experimentos muestran de ese modo que las plantas a las que se ha suministrado una mezcla de formas de nitrógeno utilizan nitrógeno orgánico principalmente para el crecimiento de las raíces.

Para la sorpresa de los autores de la presente invención, también descubrieron que el crecimiento de la raíz de plantas *A. thaliana* a las que se ha suministrado una mezcla de nitrógeno orgánico e inorgánico (en este caso, L-Glutamina y nitrato) se estimulaba fácilmente en comparación con la obtenida en una mezcla de amonio y nitrato (Figuras 4A y 4B). En un segundo experimento, se probó el efecto de diferentes mezclas de fuentes de nitrógeno en plántulas de *Populus* (Figura 5A y 5B). Como para *A. thaliana*, se descubrió un aumento significativo en la fracción de la masa de raíces para las plantas a las que se había suministrado L-glutamina y nitrato en comparación con aquellas a las que se había suministrado amonio y nitrato. De acuerdo con estos datos, el crecimiento de las plantas fue similar o mejor para las plantas a las que se había suministrado una mezcla de formas de nitrógeno orgánico e inorgánico en comparación con aquellas a las que solo se administraron formas inorgánicas. Al mismo tiempo, la fracción de masa de raíz fue significativamente mayor para las plantas que recibieron una mezcla de nitrógeno orgánico e inorgánico. Esto muestra que, a igual o mejor crecimiento, se puede lograr una mayor fracción de la masa de raíces cultivando plantas sobre nitrógeno orgánico o mezclas entre nitrógeno inorgánico y orgánico en comparación con las plantas a las que se suministra únicamente nitrógeno inorgánico.

La presente invención se refiere a la posibilidad de ajustar la distribución de biomasa vegetal a las raíces mediante el empleo de aminoácidos específicos como fertilizantes durante el cultivo de las plantas. Las mezclas en las que los aminoácidos específicos forman una parte dominante del nitrógeno en los fertilizantes se pueden utilizar de ese modo para aumentar específicamente el crecimiento de las raíces de las plantas y así aumentar la fracción de masa de raíces de la planta producida. Las mezclas con un predominio de formas de nitrógeno inorgánico pueden, en consecuencia, utilizarse para aumentar específicamente la fracción de masa de brotes de la planta.

Muchas plantas forman simbiosis con hongos, llamadas micorrizas. Es bien sabido que las micorrizas se desarrollan poco en plantas que reciben grandes cantidades de nutrientes (Smith, S. E. y D. J. Read. 1997. Mycorrhizal symbiosis, 2ª edición. Academic Press, Nueva York, Nueva York, EE. UU.). Se sabe que las micorrizas son beneficiosas para las plantas y promueven la captación de nutrientes minerales y del agua por las plantas, así como

protegen las plantas de diversos patógenos. Por lo tanto, el cultivo de plantas que, en condiciones naturales forman micorrizas, debe permitir que se formen tales simbiosis. Como se indicó anteriormente, sin embargo, elevadas tasas de adición de nutrientes pueden obstaculizar gravemente o no permitir el desarrollo de micorrizas en plantas cultivadas.

- 5 Varias de las especies de hongos que forman micorrizas también son conocidas por formar cuerpos fructíferos comestibles (setas). Sin embargo, la producción de cuerpos fructíferos también se verá obstaculizada por elevadas tasas de adiciones de nutrientes, es decir, las condiciones que se utilizan para estimular el crecimiento de las plantas.

- 10 La evidente contradicción antes mencionada entre el cultivo eficaz de plantas y el desarrollo simultáneo de micorrizas y de setas comestibles depende en gran medida de la adición de grandes cantidades de nitrógeno en el fertilizante.

Además, fue muy inesperado que el número de puntas de las raíces y el número de raíces finas aumentara a niveles tan altos que ayudaron a las plántulas a sobrevivir el primer período después de la plantación.

- 15 Los ejemplos se relacionan con el empleo de un aminoácido y no dos o más. El fertilizante no está destinado para uso in vitro ni para flores cortadas.

- 20 Un fertilizante ideal debería estimular, por lo tanto, no solo el crecimiento de las plantas, sino también el crecimiento de hongos simbióticos que forman micorrizas. Además, un fertilizante ideal también debería permitir la producción de cuerpos fructíferos de hongos. Para sorpresa de los autores de la presente invención, éstos descubrieron que las plantas cultivadas sobre aminoácidos mostraron tanto una alta tasa de crecimiento como un desarrollo vigoroso de la micorriza. La estimulación de la formación de la micorriza se descubrió tanto en plantas obtenidas sobre aminoácidos como sobre plantas obtenidas sobre fuentes de nitrógeno inorgánico (amonio más nitrato), pero a las que posteriormente se les suministraron aminoácidos.

- 25 El fertilizante puede contener al menos 5% (en peso), al menos 10% (en peso), al menos 15% (en peso), al menos 20% (en peso), al menos 25% (en peso), al menos 30% (en peso), al menos 35% (en peso), al menos 40% (en peso), al menos 45% (en peso), al menos 50% (en peso), al menos 55% (en peso), al menos 60% (en peso) al menos 65% (en peso), al menos 70% (en peso), al menos 75% (en peso), al menos 80% (en peso), al menos 85% (en peso), al menos 90% (en peso), o al menos el 95% (en peso) de la fuente de nitrógeno en el mismo, como un L-aminoácido, preferiblemente L-arginina y/o L-glutamina.

Procedimientos experimentales

- 30 Ejemplo 1. Distribución de arginina-nitrógeno en Arabidopsis

- 35 El experimento se realizó con *Arabidopsis* de tipo salvaje en placas de agar estériles que contienen medio de Murashige y Skoog (MS) de fuerza media (Murashige y Skoog, 1962), con agar al 0,65% p/v (agar de planta, Duchefa Biochemie), sacarosa al 0,5% p/v modificada con nitrato 3 mM y L-Arg $U-^{15}N$ 30 μM (>98% ^{15}N) y tamponado a pH 5,8 con MES (ácido 2N-morfolinoetanosulfónico) 3,6 mM. Las plantas se cultivaron durante 19 días, se cosecharon 20 plantas, y se dividieron en 4 réplicas (es decir, cada replica consistió en 5 plantas). Los brotes y las raíces se separaron; las raíces se enjuagaron y se limpiaron minuciosamente tres veces en una solución de $CaCl_2$ 0,5 mM para eliminar compuestos adheridos de las superficies. Los brotes y las raíces se secaron a 60°C durante la noche, se pesaron y se homogeneizaron. Finalmente, las muestras se analizaron utilizando un espectrómetro de masas de proporción de isótopos de Europe Scientific para determinar los contenidos de N y ^{15}N totales. Los resultados se describen en la Figura 3.
- 40

Ejemplo 2. Distribución de biomasa y glutamina-N en Arabidopsis y Álamo

- 45 Se realizaron experimentos de distribución con *Arabidopsis* de tipo salvaje en placas de agar estéril y en el caso del álamo, en cajas de plástico, que contenían el equivalente de medio de Murashige y Skoog (MS) libre de nitrógeno y de fuerza media (Murashige y Skoog, 1962), con agar al 0,8 % p/v (agar de planta, Duchefa Biochemie), sacarosa al 0,5% p/v y el pH se ajustó a 5,8 utilizando tampón MES. El nitrógeno se añadió al agar como una mezcla equimolar de NH_4^+ y NO_3^- o como una mezcla equimolar, que corresponde a 50% de cada uno de L-Gln y NO_3^- , ambas mezclas a una tasa total correspondiente a N 3 mM. Se llevaron a cabo cuatro tratamientos de marcaje, es decir, dos para cada mezcla de N. Por lo tanto, la mitad de las placas con la mezcla NH_4^+ contenían NH_4^+ marcado, la otra mitad contenía NO_3^- marcado. Del mismo modo, la mitad de las placas con mezcla L-Gln: NO_3^- contenían L-Gln marcada, la otra mitad contenía NO_3^- marcado. Para cada tratamiento de marcaje, el 1% de la fuente de N se administró en forma de ^{15}N . La L-Gln marcada estéril se añadió a la mezcla de agar después de introducirla en el autoclave. Las plantas de *Arabidopsis* se cosecharon después de 21 días y las plantas de álamo después de 28 días de crecimiento. Los brotes y las raíces se secaron a 60°C durante la noche, se pesaron y se homogeneizaron. Finalmente, las muestras se analizaron utilizando un espectrómetro de masas de proporción de isótopos de Europe Scientific para determinar los contenidos de N y ^{15}N totales. La cantidad de N derivada de cualquiera de las dos fuentes de N en diferentes partes de la planta (es decir, brotes y raíces) se calculó a partir de los valores del exceso de % en átomos de ^{15}N y el contenido de N total de la parte de la planta respectiva. Las fracciones de raíz de las
- 55

plantas de las dos mezclas de N diferentes se calcularon como el porcentaje de la biomasa total de la planta presente en las raíces. Los resultados con respecto *Arabidopsis* se describen en la Figura 4 y los resultados con respecto a *Populus* se describe en la Figura 5.

5 Tabla 1. La fracción de masa de raíz, es decir, la fracción de biomasa de planta entera presente en las raíces, de plantas *Arabidopsis thaliana* y *Populus deltoides* cultivadas sobre una mezcla de NH₄⁺ y NO₃⁻ o una mezcla de NO₃⁻ y L-Gln

Especies	Mezcla NH ₄ + NO ₃ ⁻	Mezcla NO ₃ -L-Gln
Arabidopsis	14,1±0,6%	19,2±0,3%
Populus	20,2 ±0,4%	26,2±1,7%

Ejemplo 3: Evaluación de la micorriza de raíces de pino escocés.

10 Las plantas se cultivaron al aire libre durante una temporada de crecimiento en el norte de Suecia. A las plantas se les suministró una solución de nutrientes compleja con nitrato de amonio o arginina como fuentes de nitrógeno. Las plántulas cultivadas con arginina se fertilizaron una vez por semana durante la temporada de crecimiento (en total 50 mg de N por plántula) mientras que las plantas de referencia se fertilizaron 2-3 veces por semana (en total 71,5 mg de N por plántula). Las plántulas cargadas con arginina recibieron el mismo tratamiento que la referencia con la excepción de que también recibieron un pulso de arginina después del último evento de fertilización a principios de otoño. La cantidad de arginina suministrada en este pulso correspondió a 5 mg de nitrógeno por plántula. El contenido promedio de quitina de las raíces se puede encontrar en la Figura 6 y en la Tabla 2. Los valores se muestran como valor promedio ± evaluación típica, n = 6.

15 Tabla 2: Contenido de quitina de las raíces de pino Escocés

Fertilizante	Contenido de quitina (mg de quitina/g de raíz) Valores promedio ± ET, n = 6
Referencia	1,35 ± 0,39
Carga de arginina	3,90 ± 1,05
Cultivo de arginina	2,72 ± 1,81

20 Los resultados muestran claramente que la fertilización con arginina da como resultado un contenido sustancialmente mayor de quitina en las raíces que indica la formación de la micorriza.

Ejemplo 4: Composiciones de fertilización típicas

Composición A:

Componente	Cantidad
L-Arginina	233.140 g
HCl (solución acuosa al 37%)	138.990 g
Benzoato (conservante)	1.000 ppm
Agua	700.000 g
Datos físicos:	

ES 2 659 385 T3

Componente	Cantidad
ξ	1,08
pH	3,20
Peso total (kg)	1.080
Volumen total (l)	1.000

La arginina y el conservante se añadieron y se disolvieron en agua y posteriormente, el pH se ajustó mediante titulación con HCl concentrado. El pH final se determinó antes de diluir con agua hasta el volumen final de 1000 l.

Composición B:

Componente	Cantidad
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	40.900 g
K ₂ SO ₄	27.270 g
KH ₂ PO ₄	54.530 g
KCl	40.900 g
Arginina	23.3140 g
Micro+	55.820 g
HCl (solución acuosa al 37%)	147.560 g
Benzoato (conservante)	1.000 ppm
Agua	640.000 g
Datos físicos	
ξ	1,20
pH	3,20
Peso total (kg)	1.200
Volumen total (l)	1.000

5

Las sales y el conservante se disolvieron primero en agua y luego se añadió Micro+ (composición de elementos vestigiales disponible de LMI AB, Suecia). Posteriormente, se disolvió la arginina y se ajustó el pH a 3,2 con HCl acuoso (37%). Finalmente, se añadió agua hasta 1000 l.

Ejemplo 5. Crecimiento y distribución de biomasa afectados por la forma de nitrógeno en *Arabidopsis*

- 10 Las plantas de *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*) se cultivaron en cultivo estéril durante 21 días sobre medios modificados con diferentes fuentes de nitrógeno. Todos los medios tuvieron una concentración de nitrógeno total de 6 mM y todos los otros macro y micro nutrientes suministrados en las mismas cantidades en cada tratamiento.

5 Del experimento con el L-aminoácido L-glutamina se puede observar que existe una correlación clara e inesperada entre la biomasa de la raíz y la cantidad de L-glutamina añadida como fuente de nitrógeno, Figuras 7A, 7B y Tabla 3. Además, se puede observar que la fracción de raíz (Figura 7B) es mayor cuando se agrega un L-aminoácido en comparación con cuando solo se agrega nitrógeno inorgánico. Esto es muy claro cuando se agrega L-aminoácido L-asparagina como se observa en la Figura 8B y en la Tabla 4.

Se pudo observar que a pesar de que la biomasa total es igual con las diferentes fuentes de nitrógeno como se observa en la Figura 7A y 8A, la fracción de la raíz es más alta de lo esperado, como se observa en la Figura 7B y 8B.

Tabla 3 Fracción de raíz y biomasa total con L-glutamina

Fuente de N	Fracción de raíz	patrón	error típico	Biomasa total	patrón	error típico
NH4NO3	0,12	0,02	0,01	6,14	1,12	0,42
NO 3	0,12	0,01	0,01	4,63	0,98	0,35
33% Gln 67% NO3	0,15	0,01	0,00	6,59	0,99	0,35
50% Gln 50% NO3	0,16	0,01	0,00	6,16	1,06	0,37
67% Gln 33% NO3	0,17	0,01	0,00	6,13	1,37	0,52

10

Tabla 4 Fracción de raíz y biomasa total con L-asparagina

Fuente de N	Fracción de raíz	patrón	error típico	Biomasa total	patrón	error típico
NH4NO3	0,12	0,02	0,01	6,14	1,12	0,42
NO 3	0,12	0,01	0,01	4,63	0,98	0,35
33% Asn 67% NO3	0,17	0,01	0,00	6,23	0,76	0,27

REIVINDICACIONES

1. El empleo de un fertilizante que comprende un L-aminoácido de origen natural como fuente de nitrógeno para aumentar la fracción de masa de raíz de una planta, en donde el aminoácido se selecciona del grupo que consiste en L-glutamina, L-asparagina y L-arginina.
- 5 2. El empleo de un fertilizante de acuerdo la reivindicación 1, en donde el empleo es adicionalmente para estimular el desarrollo de la micorriza.
3. El empleo de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde el empleo es adicionalmente para aumentar el número de puntas de raíz o el número de raíces finas.
- 10 4. El empleo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde al menos 10% en peso de la fuente de nitrógeno es un L-aminoácido de origen natural.
5. El empleo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde al menos 20% en peso de la fuente de nitrógeno es un L-aminoácido de origen natural.
6. El empleo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde al menos 40% en peso de la fuente de nitrógeno es un L-aminoácido de origen natural.
- 15 7. El empleo de un fertilizante de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que el fertilizante también comprende un compuesto de nitrógeno inorgánico.
8. El empleo de acuerdo cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el compuesto de nitrógeno inorgánico es nitrato o amonio.
- 20 9. El empleo de un fertilizante de acuerdo cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que al menos 30% (en peso) de la fuente de nitrógeno en el mismo es un L-aminoácido y el resto es un compuesto que comprende nitrógeno inorgánico.
10. El empleo de un fertilizante que comprende un L-aminoácido de origen natural de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que el fertilizante también contiene un conservante adecuado.
- 25 11. El empleo de un fertilizante que comprende un L-aminoácido de origen natural de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que el conservante se selecciona del grupo de un benzoato tal como benzoato de potasio, ácido acético, ácido salicílico, ácido propiónico, ácido sórbico, ácido cítrico y alexin plus.
12. El empleo de un fertilizante que comprende un L-aminoácido de origen natural de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que el fertilizante es sólido
- 30 13. El empleo de un fertilizante que comprende un L-aminoácido de origen natural de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que el fertilizante es una solución.

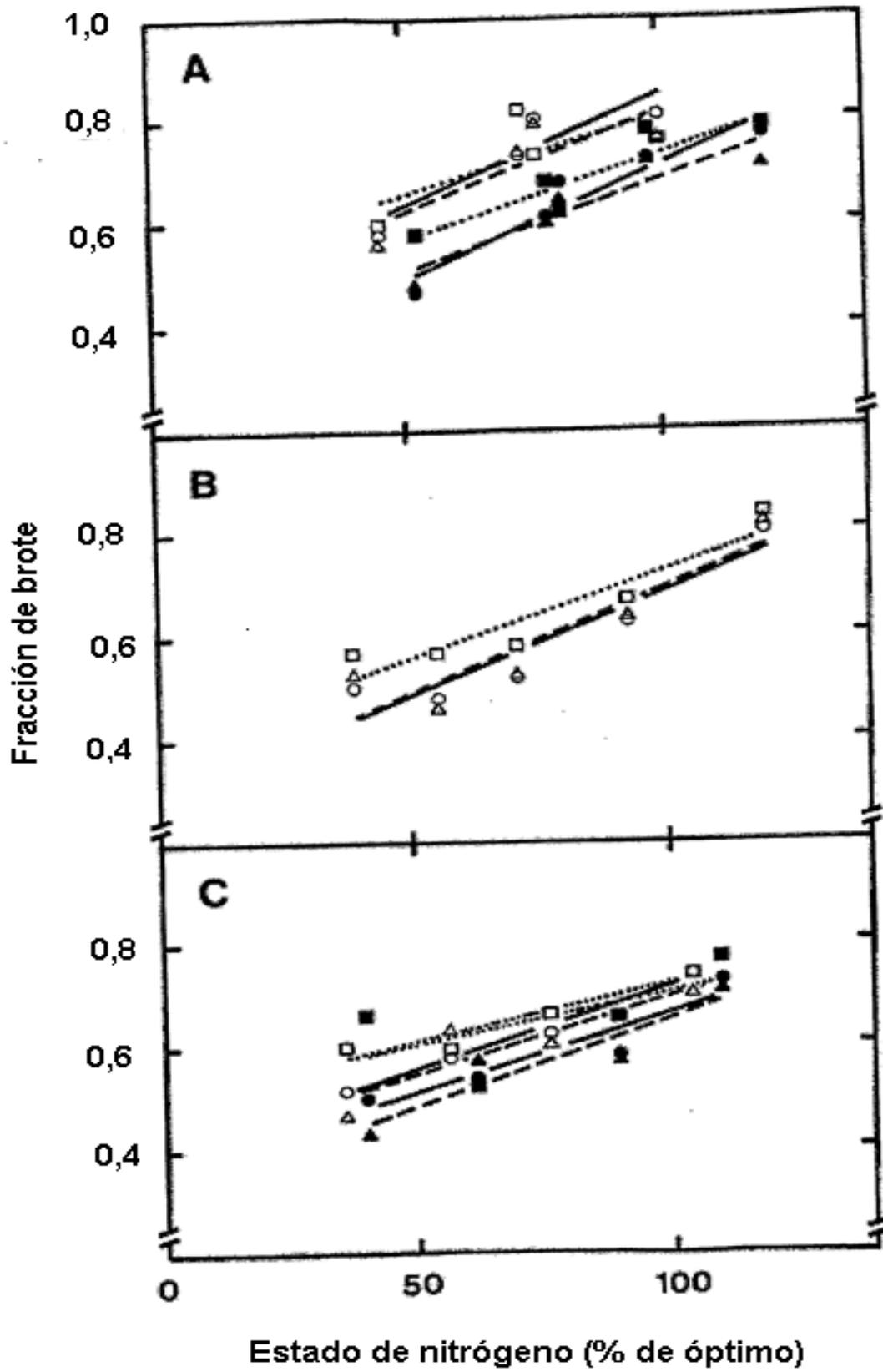


Figura 1

Figura 2

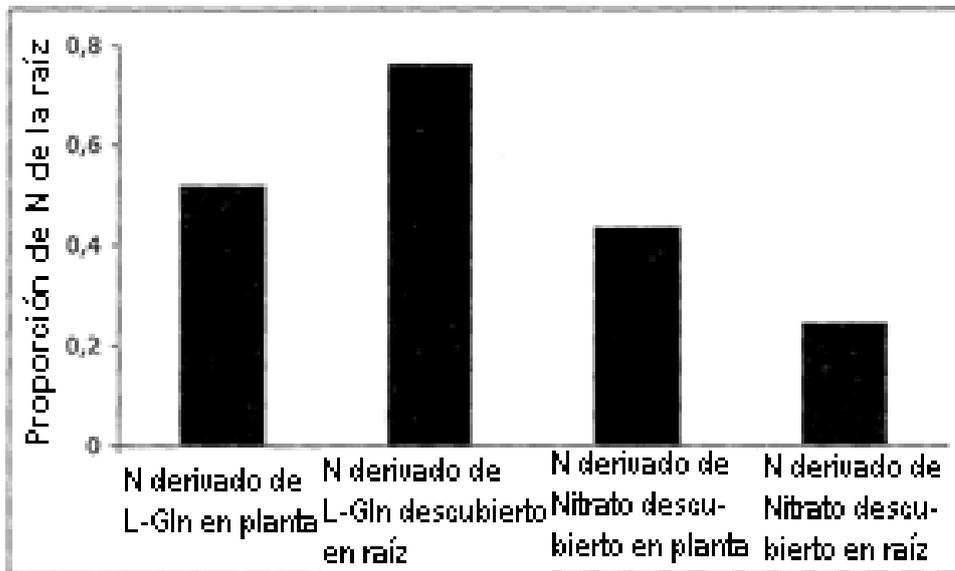


Figura 3

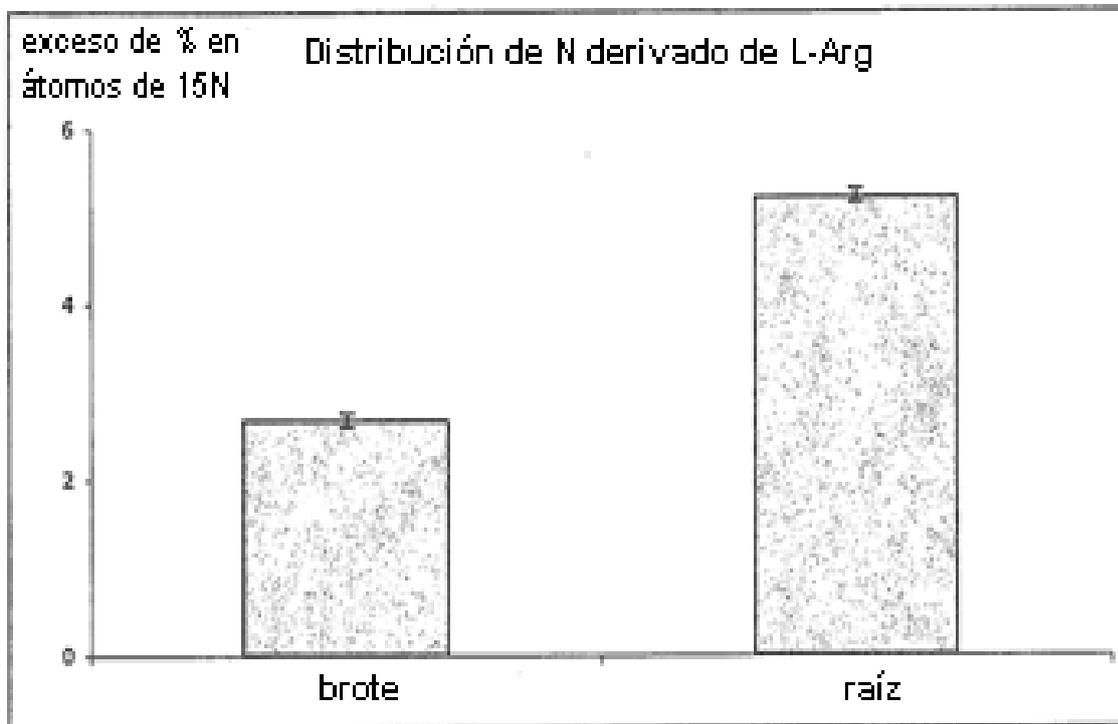


Figura 4A

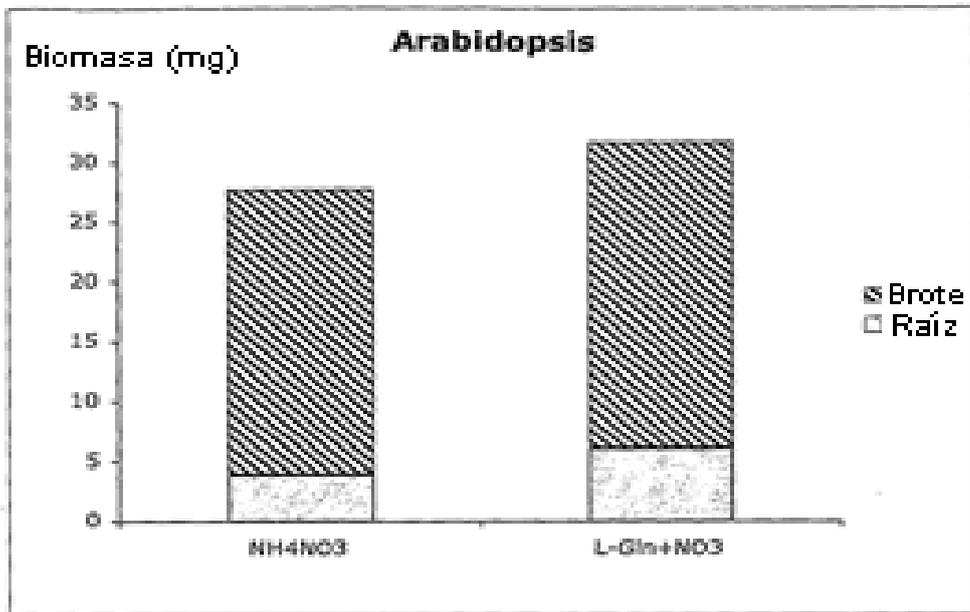


Figura 4B

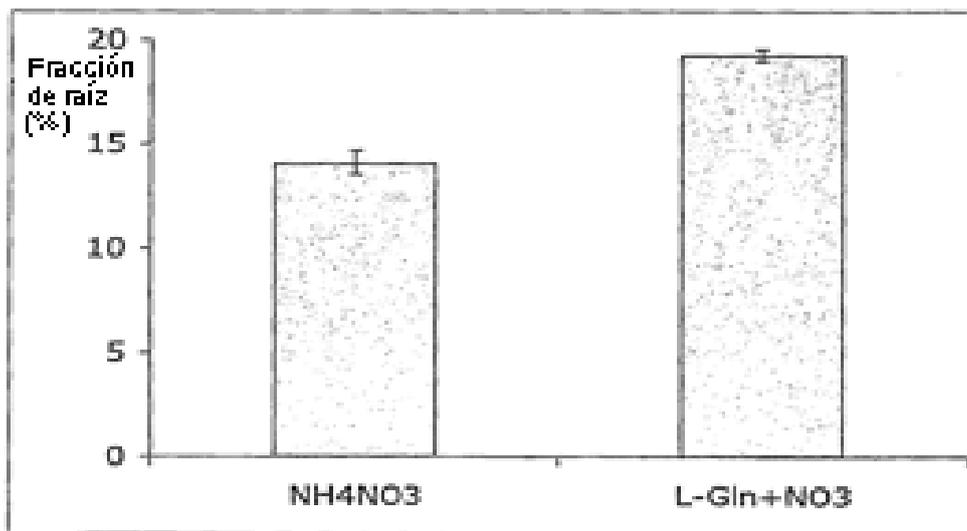


Figura 5A

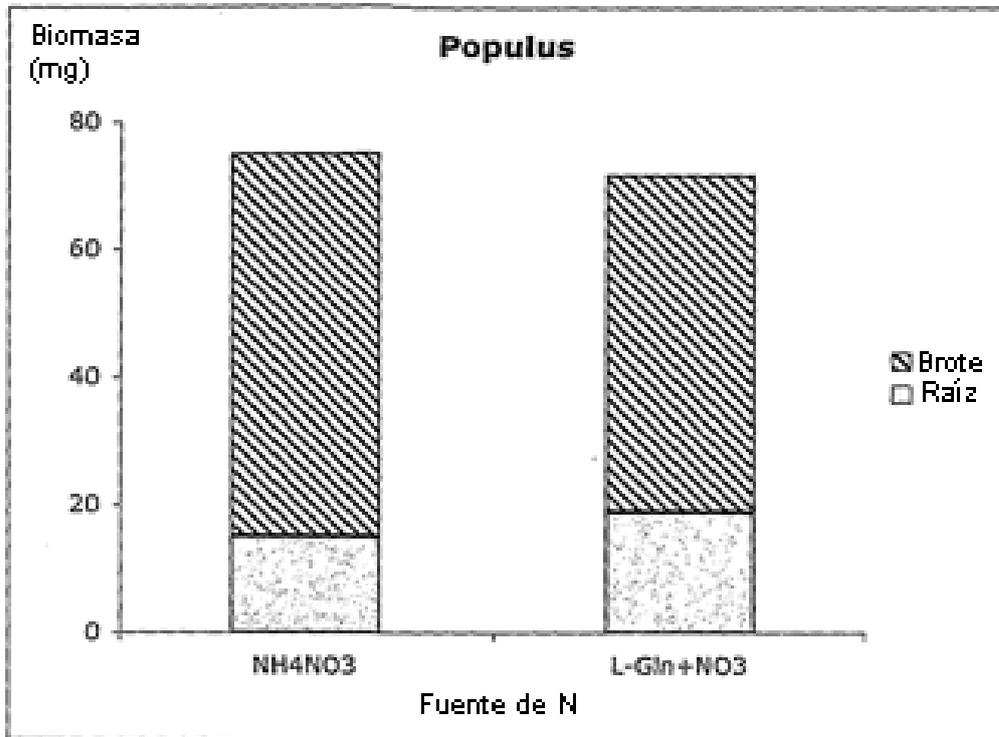


Figura 5B

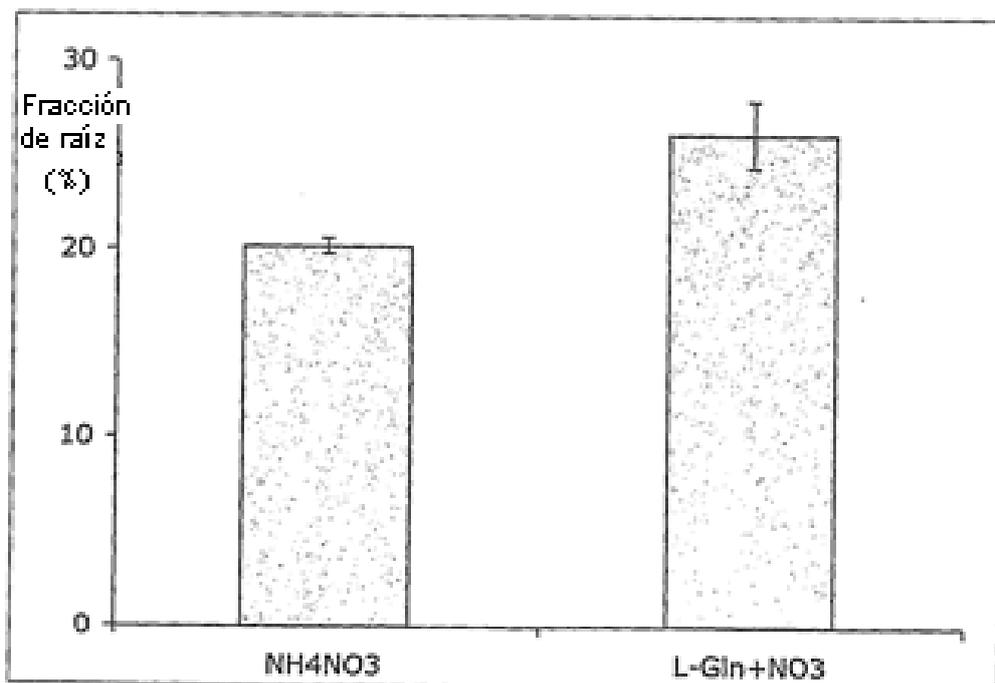


Figura 6

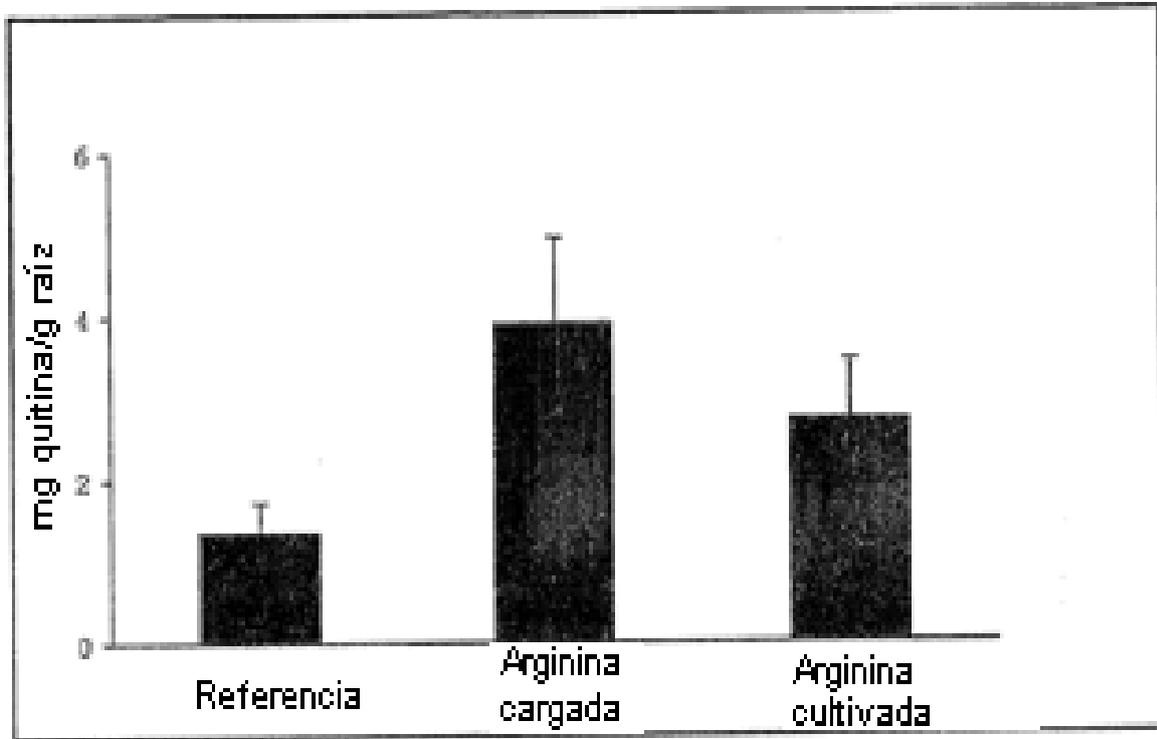


Figura 7A

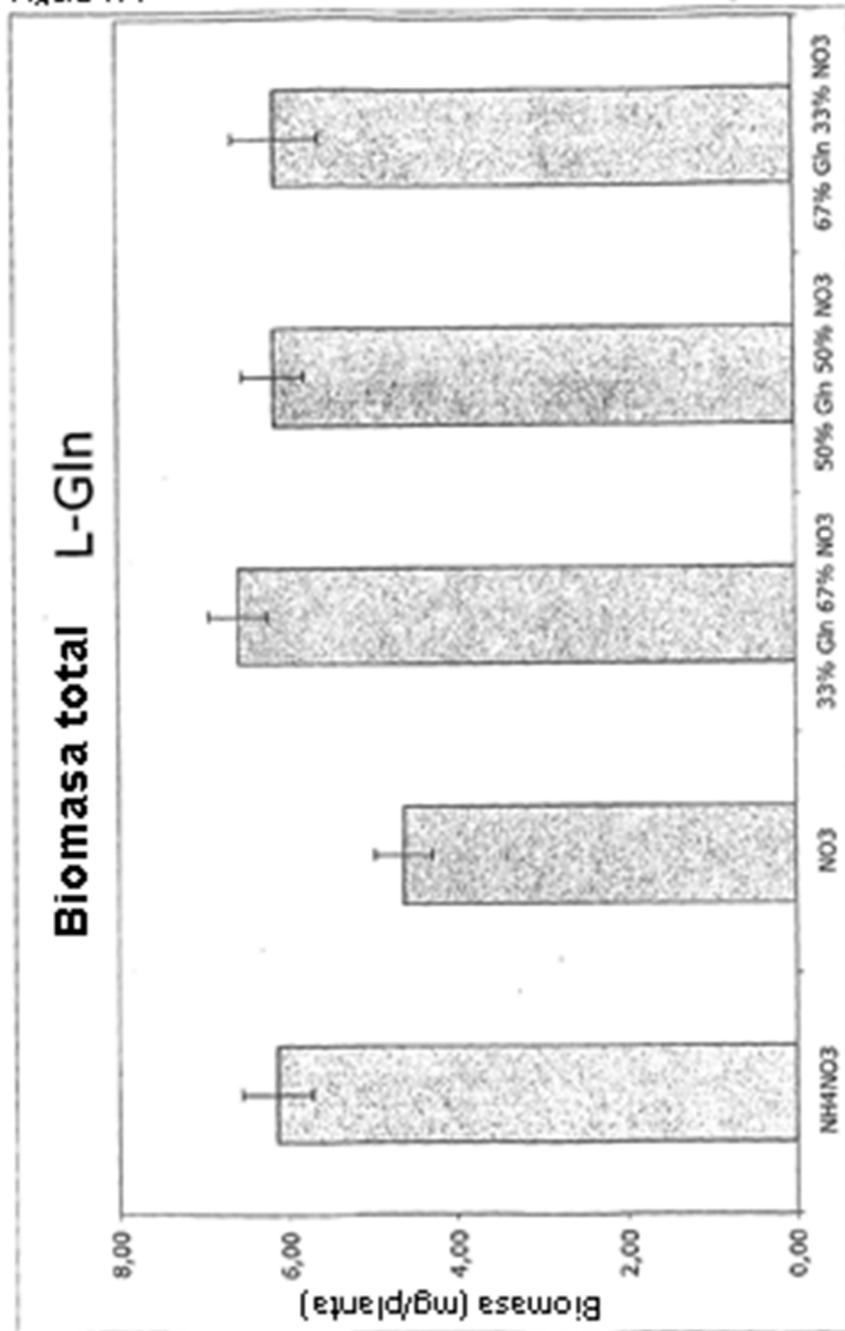


Figura 7B

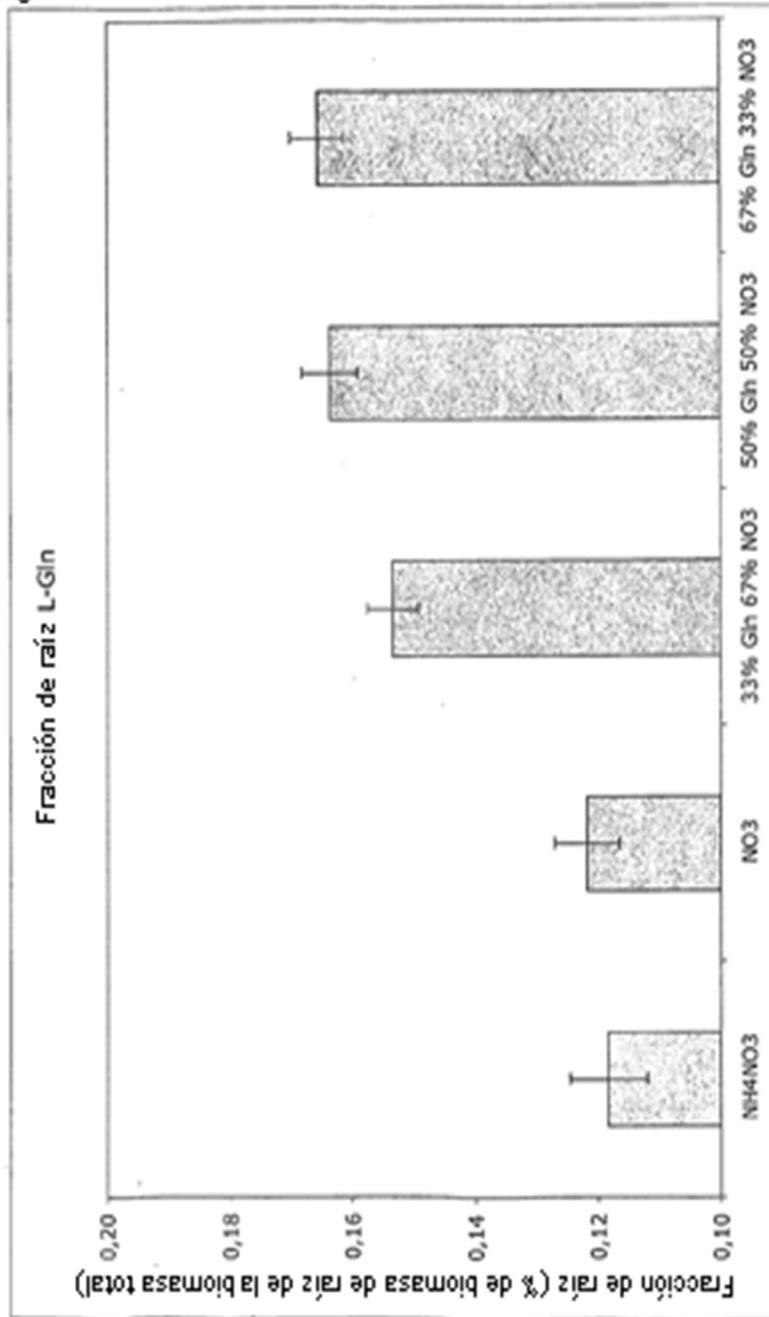


Figura 8A

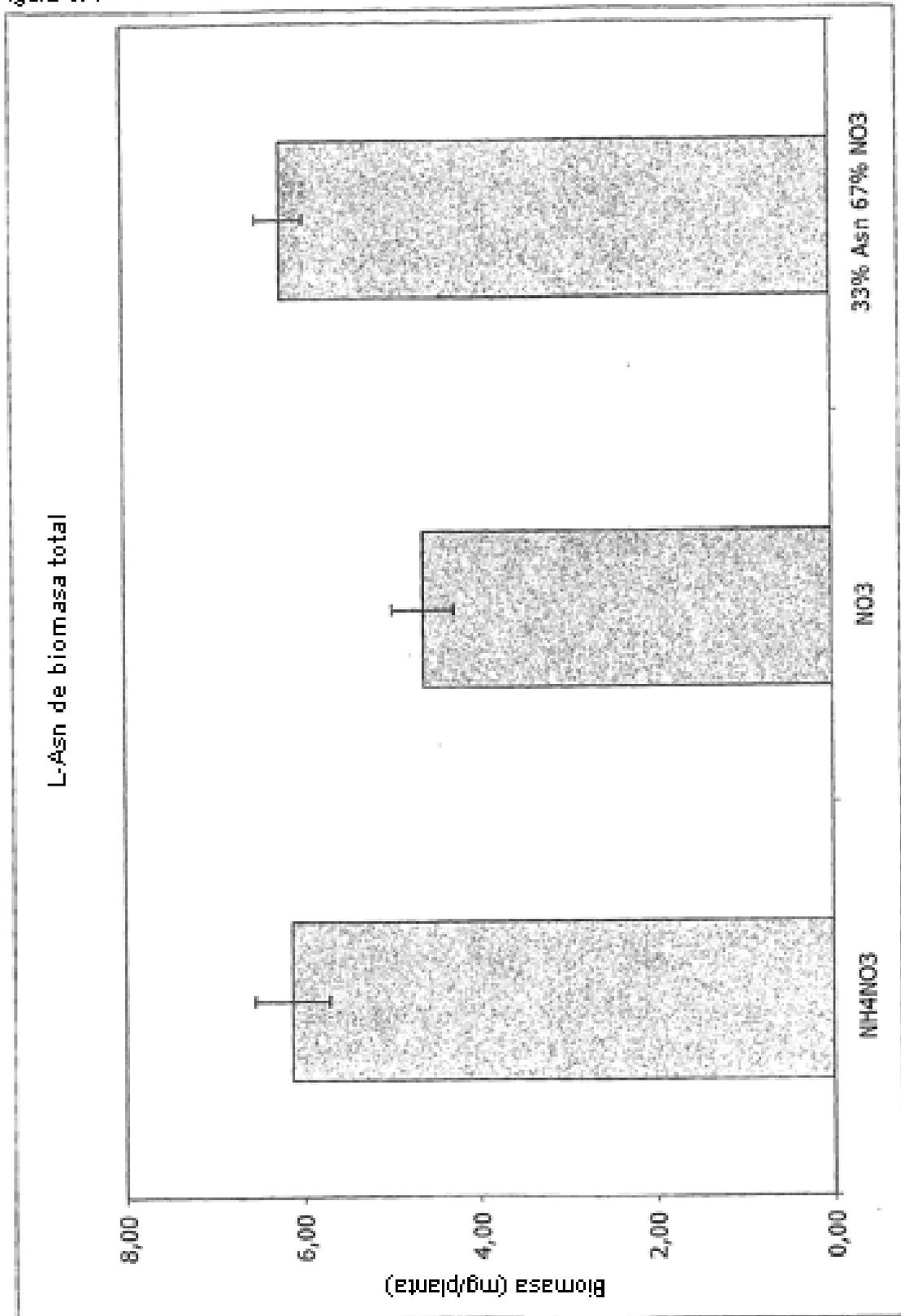


Figura 8B

