

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 750 238**

51 Int. Cl.:

A01N 65/20 (2009.01)

A01N 65/44 (2009.01)

C05F 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.01.2017 E 17382027 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.07.2019 EP 3351107**

54 Título: **Método para reducir el estrés hídrico en plantas**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.03.2020

73 Titular/es:

AGROTECNOLOGIAS NATURALES, S.L. (100.0%)
Ctra. T-214, s/n Km 4,125
43762 La Riera de Gaia, Tarragona, ES

72 Inventor/es:

BONINI, PAOLO y
CIRINO, VERONICA CRISTINA

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 750 238 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

Método para reducir el estrés hídrico en plantas

5 La presente invención se refiere a un método para reducir el estrés hídrico en plantas basado en el uso de fibras de guisante molidas secas, que es capaz de aumentar el agua disponible para la planta, y reducir también las pérdidas de nutrientes de la tierra durante eventos de lixiviación inducidos por la lluvia.

10 **Antecedentes de la invención**

El estrés por sequía o el estrés hídrico están habitualmente relacionados con la ausencia de lluvia o riego durante un periodo de tiempo significativo, en el que tal ausencia produce un dramático efecto sobre la capacidad de campo debido a la absorción de agua gravemente alterada. Bajo estas circunstancias, las funciones fisiológicas de las células vegetales pueden deteriorarse, y así pueden surgir diversos trastornos; por tanto, con el fin de sobrevivir, las plantas deben activar mecanismos protectores que normalmente conducen a efectos perjudiciales sobre el crecimiento, el desarrollo y la productividad.

20 A modo de ilustración, Farooq *et al* (*Agron. Sustain. Dev.* 2009, 29 (1), 185-212) desvelan cómo el estrés por sequía reduce el tamaño de la hoja, extensión del tallo y proliferación de raíces, altera las relaciones de agua en la planta y disminuye la eficiencia del uso de agua (WUE). Se describe además allí que la asimilación de dióxido de carbono por las hojas es significativamente reducida bajo condiciones de sequía por el cierre de poros estomatales, daño a la membrana y alteraciones enzimáticas, causando así una mejora en el flujo de metabolitos, que conduce a su vez a un aumento en la carga oxidativa en los tejidos. Se conoce que la excesiva concentración resultante de especies reactivas de oxígeno es uno de los principales disuasorios para el crecimiento de la planta.

30 Se han desarrollado numerosas estrategias a lo largo de los años para enfrentarse a este problema y tanto favorecer la tolerancia a la sequía como reducir el estrés hídrico en plantas. Por ejemplo, el documento US20130210633 describe la aplicación de una cantidad eficaz de uno o más compuestos seleccionados de un grupo que consiste en un compuesto representado por la fórmula $[R_1-X-NHCO-Y-CO-R_2]$ en la que R_1 representa un grupo fenilo opcionalmente sustituido, grupo naftilo o grupo heterocíclico aromático, R_2 representa un grupo hidroxilo, un grupo amino o un grupo alcoxi C_1-C_6 , X representa un grupo alquileo C_1-C_6 lineal o ramificado, e Y representa un grupo alquileo C_1-C_6 lineal o ramificado o un grupo alquilenilo C_2-C_6 lineal o ramificado, para reducir el estrés hídrico en una planta.

35 El documento WO-A-2015/180781 describe un método para producir pellets y/o material fibroso superabsorbentes a partir de residuos agrícolas de cultivos de plantas florales monocotiledoneas (preferentemente maíz).

40 El documento GB-A-2269378 describe un medio de crecimiento fibroso que tiene una retención de agua incrementada que consiste esencialmente en una mezcla uniforme de un material fibroso y un polímero soluble en agua.

45 El documento GB-A-2252553 describe un medio de crecimiento para plantas caracterizado por el hecho de que comprende un material vegetal fibroso vinculado con lignina, siendo el material vegetal uno que se descompone lentamente cuando se expone a bacterias.

50 Francis J. Larney *et. Al*, *Canadial Journal of Soil Science*, volumen 22, nº 6 (2012), pp 883-891 describe los efectos residuales de profundidades de reposición de capa vegetal y una aplicación temporal de modificaciones orgánicas [compuesto, estiércol, alfalfa, (*Medicago sativa* L.), heno, paja de trigo (*Triticum aestivum* L.) revisiones] en la reclamación de localizaciones de gas natural.

55 El documento US20150052640 describe otra solución que pretende mejorar la tolerancia a la sequía de las plantas, que se basa en la aplicación de al menos un tratamiento con una cantidad eficaz de N-óxido de trimetilamina dihidratado (TMAO) a la planta, parte de planta, organismo fotosintético o semilla.

60 Se han propuesto otros enfoques diferentes durante los años con el fin de resolver estas cuestiones de eficiencia del uso de agua, varios de ellos basados en modificaciones genéticas específicas que pretende crear plantas más resistentes bajo condiciones de estrés por sequía. A modo de ilustración, en el documento WOO177161, una célula de planta transgénica se transforma por una proteína relacionada con el estrés de unión a GTP (GBSRP) que codifica ácido nucleico, dando así una planta nueva con tolerancia mejorada a condiciones de estrés medioambientales que incluyen sequía, temperatura, metal, productos químicos, estrés por patógenos, estrés oxidativo o combinaciones de los mismos.

65 Sin embargo, la mayoría de estos enfoques demandan el uso de productos químicos posiblemente peligrosos o tóxicos, o alternativamente requieren manipulación genética compleja y cara para obtener plantas mejoradas o partes de planta capaces de resistir a las condiciones de estrés hídrico en plantas.

De este modo, aun cuando se ha hecho en la materia una mejora considerable hacia resolver este problema, todavía existe la necesidad de un nuevo método que sea altamente accesible, rentable, respetuoso con el medioambiente, y que preferentemente no requiera ninguna manipulación genética.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona un método para reducir el estrés hídrico en plantas aumentando el agua disponible para la planta, particularmente durante la germinación y después del trasplante, basado en el uso de fibra de guisante molida seca. Además, este método también reduce ventajosamente las pérdidas de nutrientes de la tierra durante eventos de lixiviación inducidos por la lluvia.

Según la ACCI (*American Association of Cereal Chemists*), la fibra, también conocida como fibra alimenticia, es la parte comestible de las plantas o hidratos de carbono análogos que es resistente a la digestión y absorción en el intestino delgado humano con fermentación completa o parcial en el intestino grueso. En el campo agrícola, la fibra debe entenderse como la parte indigerible de las plantas, semillas y granos, que requiere una etapa de fermentación antes de su absorción por la planta, y también puede incluir componentes de planta o de grano que han sido mínimamente procesados. La fibra dietética habitualmente incluye compuestos tales como polisacáridos, oligosacáridos, ligninas, y sustancias de planta asociadas.

La fibra puede ser tanto soluble como insoluble, y algunas plantas de hecho contienen cantidades significativas de ambos tipos de fibra. Cada tipo de fibra soluble se disuelve en agua con una velocidad de disolución diferente según sus propiedades fisicoquímicas específicas, así estas fibras solubles se clasifican normalmente como materiales hidrófilos, y pueden subclasificarse adicionalmente como fibra soluble de alta viscosidad o de baja viscosidad. La fibra soluble de alta viscosidad normalmente presenta propiedades de gelificación, mientras que la fibra soluble de baja viscosidad presenta una alta tasa de disolución en agua que no afecta la viscosidad del líquido.

Ejemplos de fibra conocidos en la técnica incluyen, pero no se limitan a, fibra de trigo, lenteja, semilla de lino, nabo, guisante, soja, avena, centeno, chía, arroz, cebada, maíz y grano. De entre éstas, la presente invención se centra preferentemente en la fibra de guisante y de trigo, que se caracterizan por sus propiedades de alta retención de agua. Adicionalmente, tanto la fibra de guisante como de trigo son conocidas por contener 0,5-2,0 % en peso de nitrógeno, que representa una fuente de nitrógeno adicional para el crecimiento de la planta, y también puede favorecer el crecimiento de simbiontes microbianos beneficiosos.

Con respecto a la obtención de tales tipos de fibra de materiales fuente, es decir, verduras, legumbres, frutos, granos enteros y frutos secos, normalmente se requiere un cierto número de etapas de procesamiento con el fin de aislar la fibra deseada, tales como limpieza, secado, clasificación, división, molienda, fraccionamiento, e incluso descascarillado (decorticado), soplado, tostado y trituración. Tales etapas de procesamiento son ampliamente conocidas en la técnica y fácilmente accesibles para un experto en la materia.

La fibra de la presente invención es fibra de guisante.

También es conocimiento común que la reducción del tamaño de partícula es una etapa importante en la fabricación del material fuente de fibra, ya que conduce a un producto resultante con elevada disponibilidad debido a su mayor área superficial, eficiencia de secado mejorado y funcionalidad del producto final. Por lo tanto, la molienda se considera una de las etapas más relevantes en la obtención de fibra a partir de materiales fuente.

Las técnicas de molienda más conocidas en la materia incluyen molienda por impacto, molienda por erosión, molienda por cuchillas y molienda por presión directa. La molienda por impacto implica el uso de un objeto duro para golpear un área significativa de la partícula para fracturarla, tal como aspas romas o tipo martillo como molinos de martillos, molinos de púas, molinos universales, molinos turbo y molinos de jaula. La molienda por erosión, por otra parte, se basa principalmente en el uso de un recipiente giratorio horizontal lleno de una solución de reducción de tamaño en la que, después del tratamiento con un medio de trituración, se obtienen partículas fluidas y esféricas. En la técnica de molienda por cuchillas, un aspa o un conjunto de aspas o cuchillas aplica una alta fuerza de cizallamiento frontal a las partículas, cortándolas hasta un tamaño predeterminado. Finalmente, la molienda por presión directa se produce cuando una partícula se machaca o aprieta entre dos superficies endurecidas, por ejemplo dos barras giratorias o una barra giratoria y una placa estacionaria.

Ejemplos de las últimas incluyen, pero no se limitan a, molinos de rodillos, molinos de agrietamiento y molinos oscilantes.

El término "estrés hídrico" o "estrés por sequía" debe entenderse como una situación en la que el agua disponible en la tierra se reduce significativamente, tanto debido a que el suministro de agua a sus raíces llega a ser limitante como cuando hay una pérdida continua de agua por transpiración o evaporación.

Por "capacidad de campo" debe entenderse el contenido de agua de la tierra, normalmente dos a tres días después

de que haya ocurrido un evento de lluvia o riego, cuando el resto del agua se ha eliminado por las fuerzas descendentes de la gravedad y el contenido de agua alcanza un valor casi constante. Según la FAO (por ejemplo, publicación de la FAO "*Irrigation water management: training manual No. 1 – Introduction to irrigation*", 1985), la capacidad de campo también puede definirse como el punto, después de haber cesado el drenaje, en el que grandes poros de tierra están todavía llenos de tanto aire como agua, y poros más pequeños están todavía llenos de agua.

Por "punto de marchitamiento" o "punto de marchitamiento permanente" debe entenderse el punto mínimo de humedad de la tierra que requiere la planta para no marchitar, es decir, el punto más allá del cual el contenido volumétrico de agua en la tierra es demasiado bajo como para que las raíces de la planta extraigan agua, de manera que la planta ya no sería capaz de recuperar su turgencia y así moriría con el tiempo.

Por "agua disponible para la planta" debe entenderse la diferencia entre el contenido de agua de la capacidad de campo y el punto de marchitamiento en una tierra o medio de crecimiento.

La presente invención proporciona un método de reducción del estrés hídrico en plantas que comprende poner en contacto plantas con fibra molida seca, en el que dicha fibra molida seca está seleccionada del grupo que consiste en fibra de guisante.

De acuerdo con el método de la presente invención, la relación de fibra molida seca con respecto a las plantas es de 0,5 g de fibra molida seca por planta a 5,0 g de fibra molida seca por planta.

Tal contacto de la fibra molida seca y las plantas se lleva a cabo después de mezclar previamente dicha fibra molida seca con tierra para las plantas. Preferentemente, la relación de fibras molidas secas con respecto a la tierra es de 5 g:1 kg a 50 g:1 kg, más preferentemente 10g:1 kg a 30g:1 kg, todavía más preferentemente 15g:1 kg a 25g:1 kg, y todavía incluso más preferentemente 20g:1 kg. Es muy conocido en el estado de la técnica que 1 kg de tierra se entiende normalmente como equivalente a 1 m³ de tierra.

Dicho contacto de fibra molida seca con plantas puede llevarse a cabo de varias formas diferentes, pero preferentemente, de un modo seleccionado del grupo que consiste en:

- El recubrimiento de semillas con una mezcla que comprende fibra molida seca;
- La peletización de semillas con una mezcla que comprende fibra molida seca,
- La aplicación de una mezcla que comprende fibra molida seca en forma de gránulos; y
- La aplicación de una mezcla que comprende fibra molida seca en forma de tabletas.

En una primera realización, dicho contacto de fibra molida seca con plantas puede llevarse a cabo al recubrir semillas con una mezcla que comprende fibra molida seca. Preferentemente, tal recubrimiento puede llevarse a cabo poniendo semillas en una mezcladora o amasadora, a continuación añadiendo una cantidad adecuada de fibra molida seca y agitando la mezcla para recubrir homogéneamente dichas semillas con dicha cantidad adecuada de fibra molida seca. Tal etapa de recubrimiento en la mezcladora o amasadora se lleva a cabo preferentemente a temperatura ambiente.

La relación de semillas con respecto a fibra molida seca puede ser 1 kg de semillas por 0,2 g de fibra molida seca a 1 kg de semillas por 15 g de fibra molida seca; preferentemente, dicha relación de semillas con respecto a fibra molida seca puede ser 1 kg de semillas por 0,5 g de fibra molida seca a 1 kg de semillas por 10 g de fibra molida seca; más preferentemente, dicha relación de semillas con respecto a fibra molida seca puede ser 1 kg de semillas por 0,5 g de fibra molida seca.

En una segunda realización, dicho contacto de fibra molida seca con plantas puede llevarse a cabo por peletización de semillas con una mezcla que comprende fibra molida seca.

Preferentemente, tal mezcla comprende además un polvo inerte. Más preferentemente, tal mezcla que comprende fibra molida seca y polvo inerte comprende una relación de fibra molida seca con respecto a polvo inerte de 1:1 % en peso a 1:20 % en peso; todavía más preferentemente, 1:1 % en peso a 1:15 % en peso; todavía incluso más preferentemente, 1:10 % en peso.

Ejemplos de polvo inerte adecuado incluyen, pero no se limitan a, carbonato cálcico, tierra de diatomeas, hidróxido de aluminio, hidróxido de calcio, hidróxido de magnesio, hidróxido de bario, sulfato de calcio, sulfato de calcio, carbonato de magnesio básico, caolín-arcilla, dolomita, talco, zeolita, illita, haloisita, bentonita, vermiculita, microlita, turba y mezclas de los mismos. Preferentemente, los polvos inertes son carbonato cálcico, talco y mezclas de los mismos. Más preferentemente, el polvo inerte es talco.

En particular, la presente invención proporciona un proceso de producción de semillas peletizadas con una mezcla que comprende fibra molida seca. El proceso comprende las siguientes etapas:

- a) mezclar fibra molida seca y polvo inerte en una relación de 1:1 a 1:30 (peso/peso),
- b) cargar una máquina de recubrimiento o peletización con semillas,
- c) añadir gradualmente agua y la mezcla obtenida en la etapa a) a las semillas, y
- d) secar las semillas peletizadas obtenidas en la etapa c) a una temperatura de 30 °C a 40 °C durante 1 hora a 2 horas.

La relación de fibra molida seca con respecto a polvo inerte de la etapa a) puede ser preferentemente 1:1 a 1:30 (peso/peso), y más preferentemente, dicha relación puede ser 1:1 a 1:20 (peso/peso).

Con respecto a las etapas b)-c) del proceso anteriormente descrito, puede emplearse cualquier máquina de recubrimiento o peletización conocida en la técnica que pueda ser adecuada para estas etapas de recubrimiento, como será obvio para aquellos expertos en la materia. Ejemplos de esta máquina de recubrimiento o mezcla incluyen una máquina de recubrimiento giratoria.

También en referencia a las etapas b)-c), puede ser posible añadir componentes adicionales tales como agentes adhesivos y colorantes, con el fin de potenciar la adhesión de fibra molida seca y polvo inerte a las semillas, asegurando así el recubrimiento completo. Ejemplos particulares de agentes adhesivos pueden incluir, pero no se limitan a, agentes adhesivos solubles en agua, más particularmente, polímeros orgánicos tales como metilcelulosa y polímeros derivados de goma arábica.

En referencia a la etapa d), condiciones de secado preferidas incluyen una temperatura de aproximadamente 35 °C y un periodo de secado de aproximadamente 1 hora.

Las semillas peletizadas obtenidas después de la etapa d) estarán listas para ser usadas para siembra, o alternativamente pueden guardarse hasta 2 años en condiciones secas.

En una tercera realización, dicho contacto de fibra molida seca con las plantas puede llevarse a cabo aplicando una mezcla que comprende fibra molida seca en forma de gránulos. Por ello, la fibra molida seca correspondiente de la invención puede mezclarse con agua, y la mezcla de fibra molida seca resultante se somete entonces a trituración en un homogeneizador o una máquina de trituración con el fin de obtener un producto de fibra molida seca granulado, que puede convertirse en granos del tamaño deseado, por ejemplo, con un granulador de lecho fluidizado.

En una cuarta realización, dicho contacto de fibra molida seca con las plantas puede llevarse a cabo aplicando una mezcla que comprende fibra molida seca en forma de pastillas. Actualmente existen numerosos métodos conocidos en la técnica para producir pastillas; a modo de ilustración, las pastillas pueden formarse comprimiendo una mezcla de fibra molida seca, que puede opcionalmente comprender un aglutinante, en una pastilla cilíndrica; otras variaciones adicionales de este proceso resultarán obvias para el experto en la materia. Particularmente, las pastillas de la invención se ponen en orificios de siembra en macetas o directamente en los campos de crecimiento justo antes de la siembra del cultivo. Normalmente, se emplea una pastilla por orificio de siembra, aunque puede usarse más de una pastilla si fuera necesario. "Siembra" debe entenderse en el presente documento como tanto la colocación de nuevas semillas como un evento de trasplante, implicando el último el uso de plántulas. Una vez se completa la siembra, se realiza el riego para promover la disolución de al menos una pastilla, liberando así la fibra molida seca y cualquier componente adicional presente en la pastilla, en el soporte, de manera que todos estos compuestos pueden expresar sus efectos beneficiosos sobre las semillas o plántulas, tanto durante la germinación como el trasplante, tal como se ha mencionado con anterioridad.

Todas estas cuatro realizaciones de la invención pueden comprender opcionalmente la adición de al menos un aditivo que puede incorporarse en la mezcla de fibra molida seca, seleccionado del grupo que consiste en cargas, aglutinantes, polvos inertes, agentes colorantes, fertilizantes, fungicidas, hormonas de crecimiento, microorganismos para inoculación, tales como propágulas de *Trichoderma*, que adicionalmente pueden promover el crecimiento de simbiontes microbianos, y cualquier mezcla de los mismos. Preferentemente, dicho al menos un aditivo son microorganismos para inoculación.

Más preferentemente, la mezcla de fibra molida seca presente en cualquiera de los cuatro métodos anteriormente descritos para poner en contacto plantas con fibras molidas secas de la invención comprende además al menos un aditivo que es un fertilizante seleccionado del grupo que consiste en nitrato de amonio, sulfato de amonio, sulfato de potasio, nitrato de potasio, nitrato de calcio y amonio, nitrato de magnesio, sulfato de magnesio, fosfato de urea, fosfato de monoamonio, fosfato de diamonio, fosfato de monopotasio, fosfato de monocalcio, fosfato de dicalcio y mezclas de los mismos.

Más preferentemente, la relación de fibra molida seca con respecto a fertilizante en la mezcla de recubrimiento es 1:1 (peso/peso) a 9:1 (peso/peso).

Los siguientes ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no deben interpretarse como limitantes de la presente invención. Adicionalmente, la presente invención engloba todas las posibles combinaciones de

realizaciones particulares y preferidas descritas en el presente documento.

Ejemplos

5 Ejemplo 1: Efecto de fibra de guisante molida seca como mejora de la tierra

El objetivo de este ensayo experimental era evaluar el aumento de la disponibilidad de agua para el crecimiento de plantas en una tierra previamente mejorada con fibra de guisante molida seca.

10 Antes del uso, tierra arenosa con diámetro de partícula inferior a 2 mm y densidad aparente de la tierra de 1,14 mg/m³ se secó a 40 °C en una estufa ventilada hasta peso constante. Después, se prepararon 10 duplicados que contenían tierra sola y se prepararon 10 duplicados adicionales que contenían una mezcla de fibra de guisante molida seca y dicha tierra arenosa secada a una relación de fibra de guisante molida seca con respecto a tierra de 20 g:1 kg. Cada duplicado se preparó poniendo tanto la tierra sola como la mezcla de fibra de guisante molida seca-tierra en un cilindro metálico de 5 cm de altura.

15 Dichos 20 cilindros que contienen tanto la tierra sola como la mezcla de fibra de guisante molida seca-tierra se dispusieron en dos placas cerámicas porosas, conteniendo cada una de ellas 5 duplicados de tierra sola y 5 duplicados de la mezcla de fibra de guisante molida seca-tierra, durante 24 h en una bandeja poco profunda de agua para permitir el humedecimiento uniforme por capilaridad.

20 Después, se puso una placa cerámica porosa en un recipiente presurizado a 33 kPa, mientras que la otra placa se puso en otro recipiente presurizado a 1500 kPa. En ambos casos, la presión conduce al drenaje de la mayoría del agua presente en las muestras a través de la placa cerámica porosa. Una vez se alcanzó el equilibrio, es decir, se detuvo el drenaje, se quitaron los cilindros y las muestras que contenían tanto la tierra sola como la mezcla de fibra de guisante molida seca y la tierra arenosa se pesaron y se secaron en estufa durante 24 h a 105 °C.

25 Se usó el peso de las muestras secas previamente sometidas a 33 kPa para estimar el contenido de agua de la capacidad de campo para tanto las muestras de tierra sola como de mezclas de fibra de guisante molida seca-tierra, mientras que se usó el peso de muestras secas previamente sometidas a 1500 kPa para estimar el contenido de agua del punto de marchitamiento para tanto las muestras de tierra sola como de mezclas de fibra de guisante molida seca-tierra.

30 Posteriormente, se estimó el agua disponible para la planta, tanto para las muestras de tierra solo como las muestras de mezclas de tierra-fibra de guisante molida seca, al calcular la diferencia entre el contenido de agua de la capacidad de campo y el contenido de agua del punto de marchitamiento. Los resultados de esta prueba experimental se proporcionan en la Tabla I a continuación.

35 *Tabla I. Contenido de agua de la capacidad de campo, contenido de agua del punto de marchitamiento y agua disponible para la planta de tierra arenosa y mezcla de tierra arenosa/fibra de guisante molida seca (expresados como valores medios ± desviación estándar).*

Tratamiento	Contenido de agua de la capacidad de campo	Contenido de agua del punto de marchitamiento	Agua disponible para la planta
Muestras de tierra	35,2 ± 0,49	17,1 ± 0,04	18,1 ± 0,54
Muestras de mezcla de tierra/fibra de guisante molida seca	38,9 ± 0,79	18,3 ± 0,07	20,6 ± 0,81

40 Los resultados experimentales demostraron que la mejora de la tierra con fibra de guisante molida seca aumenta el contenido de agua de la capacidad de campo, conduciendo así a un aumento en el agua disponible para la planta.

Ejemplo 2: Uso de fibra de guisante como agente de recubrimiento para semillas peletizadas

45 Se mezcló fibra de guisante molida seca (P) con 8 % en peso de talco (T) para obtener la mezcla de recubrimiento P/T. Se cargaron 300 g de semillas de tomate en una máquina de recubrimiento giratoria, seguidamente se añadieron 25 ml de agua, y gradualmente se aplicó la mezcla P/T, junto con el agua. Después de fijarse el agente de recubrimiento sobre la superficie de la semilla, las semillas se secaron a 35 °C durante 1 hora, dando así las semillas de tomate peletizadas resultantes.

50 Se sembraron semillas de tomate peletizadas y sin peletizar en bandejas de poliestireno (228 orificios por bandeja) llenas de un sustrato hecho con turba y arena (relación 1:1 v/v). Las semillas se pusieron a 0,5 cm de profundidad. Se proporcionó riego después de sembrar con un sistema de rociado. Se aplicaron dos litros de agua para cada bandeja. Las bandejas se pusieron en una cámara de crecimiento que tenía una humedad relativa del 70 % y temperatura del aire de 25 °C. La evaporación continua de agua de la superficie del sustrato conduce a condiciones

de sequía que afectaron la germinación de la semilla. La germinación se determinó por el recuento de cotiledones que emergen del sustrato durante un periodo de 2 semanas. Al final del ensayo, las semillas peletizadas dieron una tasa de germinación total que era del 85 %, mientras que la germinación de semillas sin peletizar, y semillas peletizadas con polvo inerte solo fue del 55 % y el 56 %, respectivamente.

Ejemplo 3: Uso de fibra de guisante y de trigo en forma de pastilla, sola o en combinación con fertilizante de NH_4NO_3 frente a fertilizante de NH_4NO_3 solo

Se prepararon diferentes pastillas para esta prueba según las diferentes características de cada tratamiento a evaluarse:

Pastilla A: 4 g de fibra de guisante molida seca.

Pastilla B: se mezclaron 4 g de fibra de guisante molida seca con 2 g de NH_4NO_3 .

Pastilla C (no de acuerdo con la invención): se mezclaron 4 g de fibra de trigo molida seca con 2 g de fertilizante de NH_4NO_3 .

Pastilla D: 2 g de fertilizante de NH_4NO_3 .

Los componentes se comprimieron separados 2,5 cm, dando así 5 pastillas diferentes por tipo, que posteriormente se insertaron en orificios de 2 cm de profundidad encima en la parte superior de macetas de plástico de 12 cm de diámetro llenas de arena cuarcífera (0,5 kg de arena por maceta). Los componentes de cada pastilla se humedecieron entonces con 10 ml de agua destilada por pastilla. La cantidad de agua añadida no provocó ningún lixiviado de sales, ya que fue completamente absorbida por la fibra molida seca.

Se aplicó agua destilada en la parte superior de cada maceta con un gotero (caudal 2 l/h). El riego se detuvo después de recogerse 300 ml de agua de drenaje de la base de cada maceta. La conductividad eléctrica de la solución de drenaje se midió inmediatamente después de la recogida en los cuatro tratamientos más el control. Se tomaron cinco duplicados para cada maceta para garantizar la fiabilidad de los resultados.

Tabla II. Conductividad eléctrica de 300 ml de agua de drenaje recogida del fondo de cada maceta después del riego con un gotero (expresada como valores medios \pm desviación estándar).

Tratamiento	Conductividad eléctrica (dS/m)
Control (sin aplicación de pastilla)	67,2 \pm 2,2
Pastilla A (fibra de guisante molida seca sola)	103,8 \pm 12,8
Pastilla B (fibra de guisante molida seca + fertilizante de NH_4NO_3)	1894,8 \pm 55,0
Pastilla C (fibra de trigo molida seca + fertilizante de NH_4NO_3)	1924,3 \pm 54,0
Pastilla D (fertilizante de NH_4NO_3)	6078,4 \pm 227,5

Los resultados en la Tabla II demostraron que la combinación de tanto la fibra de guisante como de trigo molida seca con fertilizante de NH_4NO_3 fue capaz de reducir eficazmente la lixiviación de nutrientes y de agua a través del sustrato arenoso en comparación con el fertilizante de NH_4NO_3 solo.

Ejemplo 3: Uso de fibra de guisante molida seca en forma granulada para reducir el estrés del trasplante en cultivos hortícolas

Se trasplantaron plantas de lechuga romana (*Lactuca sativa* L.) en el estadio de 2 hojas verdaderas en tierra arenosa. Las macetas se regaron antes del trasplante hasta la capacidad del recipiente. Durante el trasplante, se aplicó fibra de guisante molida seca granulada en el fondo del orificio de siembra a una tasa de 1,5 a 3,0 g/planta.

Después del trasplante, cada planta se regó con 100 ml de agua por planta, y el riego se detuvo hasta que aparecieron los signos de estrés hídrico, tales como el marchitamiento de las hojas. En ese momento, se midieron los valores de SPAD (desarrollo de análisis de plantas en tierra) y de fluorescencia. Se obtuvo el índice medidor de clorofila por SPAD tomando 3 valores por planta, de las hojas más viejas, y además se usó una planta para el análisis de fluorescencia. Se realizó la evaluación visual del grado de marchitamiento de la planta usando una puntuación subjetiva (es decir, puntuación de marchitamiento) como se define en la Tabla III:

Tabla III. Puntuación de marchitamiento para la evaluación del grado de marchitamiento de hojas en plantas de lechuga

Puntuación de marchitamiento (W)	Síntomas
1	Las hojas se expandieron bien sin síntomas de marchitamiento
2	Las hojas se plegaron ligeramente mostrando síntomas de marchitamiento
3	Hojas que muestran síntomas de marchitamiento grave

Después de un ciclo de estrés hídrico, las plantas se regaron otra vez con 200 ml de agua y se impuso un nuevo ciclo de estrés. En global, se realizaron cuatro ciclos de estrés, y posteriormente, las plantas se recogieron durante 35 días después de trasplantar bajo condiciones de invernadero, es decir, 25 °C por el día, 18 °C por la noche y 60 % de humedad relativa.

Todos los datos se analizaron estadísticamente por ANOVA, y la prueba de diferencia mínima significativa (LSD) se aplica a P = 0,05 en cada una de las variables significativas medidas.

La Tabla IV muestra el contenido de clorofila de las hojas (índice de SPAD), la puntuación de marchitamiento (W) y el rendimiento cuántico óptimo (Fv/Fm) medidos después de 11, 14 y 22 días del trasplante en plantas de lechuga (*Lactuca sativa* L.).

Con respecto a las mediciones de fluorescencia de clorofila, la relación Fv/Fm o el rendimiento cuántico óptimo representa la máxima eficiencia cuántica posible del fotosistema II de las plantas (PSII), y se sabe que es indicativo del daño por estrés a la planta. Según la bibliografía (por ejemplo “*Chlorophyll Fluorescence: What Is It and What Do the Numbers Mean?*” - USDA Forest Service Proceedings RMRS-P-43, 2006, páginas 34-43), el intervalo normal de Fv/Fm es aproximadamente 0,7-0,8, así cuando este valor se encuentra por debajo de aproximadamente 0,6, la supervivencia de la planta se considera que está significativamente en riesgo.

Fv se define como la altura de fluorescencia variable del pico de fluorescencia por encima de F0 tras la exposición a pulso de luz actínico, en la que F0 es el valor de fluorescencia original que emana de los pigmentos recolectores de luz de la hoja. Fm se define como el máximo valor de fluorescencia, es decir, Fv + F0.

Tabla IV. Contenido de clorofila de la hoja (índice de SPAD), puntuación de marchitamiento (W) y rendimiento cuántico óptimo (Fv/Fm) medidos después de 11, 14 y 22 días desde el trasplante en plantas de lechuga (*Lactuca sativa* L.).

Fibra de guisante molida seca (g/maceta)	11 días desde el trasplante			14 días desde el trasplante			22 días desde el trasplante		
	SPAD	W	Fv/Fm	SPAD	W	Fv/Fm	SPAD	W	Fv/Fm
0	15,8 b	2,0	0,81	13,8 b	2,5 a	0,62 b	20,4 b	2,5 a	0,82
1,5	19,5 a	1,9	0,80	20,0 a	2,1 ab	0,81 a	22,0 ab	2,1 a	0,81
3,0	20,09 a	1,5	0,82	23,0 a	2,0 b	0,82 a	25,3 a	1,4 b	0,82

Valores medios en la misma columna con las mismas letras no se considera que sean significativamente diferentes según la prueba de diferencia mínima significativa (LSD) a P ≤ 0,05.

Los resultados de la Tabla IV prueban el significativo aumento en el índice de clorofila de SPAD y el rendimiento cuántico óptimo (Fv/Fm), junto con una disminución significativa en la puntuación de marchitamiento (W) con cantidades crecientes de fibra de guisante molida seca por maceta. Estos resultados experimentales demostraron que la fotosíntesis se promueve incorporando fibra de guisante molida seca en la maceta, además de una reducción significativa del marchitamiento, es decir, una reducción significativa del estrés hídrico.

Al final del ensayo, se realizaron el análisis de crecimiento y de calidad. La Tabla V refleja en realidad el aumento en

el peso fresco del tallo y raíz derivado de cantidades crecientes de fibra de guisante molida seca.

Tabla V. Consumo medio de agua por maceta, y peso fresco del tallo y raíz al final del ensayo.

Fibra de guisante molida seca (g/maceta)	Consumo medio de agua (g/día por maceta)	Peso fresco del tallo (g/planta)	Peso fresco de la raíz (g/planta)
0	11,8 b	0,61 c	0,57 b
1,5	12,0 b	1,19 b	0,76 a
3,0	12,4 a	1,49 a	0,82 a

5 Valores medios en la misma columna con las mismas letras no se considera que sean significativamente diferentes según la prueba de diferencia mínima significativa (LSD) a $P \leq 0,05$.

10 **Ejemplo 4: Estudio comparativo de fibra de guisante molida seca frente a efectos de polímeros basados en acrilamida sobre la reducción del estrés hídrico**

Se trasplantaron plántulas de lechuga y tomate previamente cultivadas en bandejas de siembra en el estadio de 3-4 hojas verdaderas en macetas de 14 cm de diámetro llenas de arena, y luego se cultivaron bajo condiciones de invernadero (es decir, 25 °C por el día y 16 °C por la noche) con 60 % de humedad relativa. Se evaluaron tres tratamientos diferentes, en los que se prepararon 10 duplicados para cada uno de ellos:

- 20 Tratamiento A (control): macetas de 14 cm de diámetro llenas de arena solo.
- Tratamiento B: macetas de 14 cm de diámetro en las que la fibra de guisante molida seca se puso en el orificio de trasplante por debajo de las raíces a una tasa de 3,0 g de fibra de guisante molida seca por planta.
- 20 Tratamiento C: macetas de 14 cm de diámetro en las que el polímero basado en acrilamida se puso en el orificio de trasplante por debajo de las raíces a una tasa de 0,3 g de fibra de guisante molida seca por planta.

25 Se introdujo la diferencia de 10 veces entre la cantidad de fibra de guisante molida seca y el polímero basado en acrilamida empleado en los tratamientos B y C con el fin de compensar la capacidad de retención de agua de tal polímero, que es 10 veces superior a la de la fibra de guisante molida seca, de modo que se garantizó la capacidad de retención de agua equivalente en ambos tratamientos durante la prueba por motivos de comparación.

30 Después del trasplante, todas las macetas se regaron hasta que drenó un mínimo del 30 % de la cantidad de agua total aplicada, con el fin de garantizar que todas las macetas alcanzaran la máxima capacidad de retención de agua al principio del ensayo. Una vez se alcanzó este punto, se detuvo el riego y el contenido de agua en las macetas empezó a disminuir debido a la evaporación de la superficie de la arena y la transpiración de las hojas. Los síntomas de marchitamiento aparecieron en las hojas de las plantas después de algunos días y entonces se determinó la gravedad del marchitamiento de las hojas con una puntuación subjetiva (es decir, puntuación de marchitamiento) como se define en la Tabla III.

35 Se midió el contenido de agua relativo (RWC) basándose en la segunda y tercera hoja de la parte superior de la planta, para 10 plantas por tratamiento. RWC es un indicador de estrés hídrico en plantas, según la fórmula definida por Jones y Turner (*Plant Physiol.* 1978, 25, 591-597), ampliamente conocida en el estado de la técnica:

40
$$RWC (\%) = [(FW-DW) / (TW-DW)] \times 100$$

45 Específicamente, se suprimieron dos discos de hoja de 10 mm de diámetro de las hojas de cada planta, para cada tratamiento, se reunieron 20 discos y se determinó su peso fresco de muestra (FW). Se suspendieron en agua destilada en placas de Petri durante 4 h para recuperar la turgencia, y entonces se descongelaron y se volvieron a pesar, obteniéndose así el peso túrgido de muestra (TW). Posteriormente, las muestras se secaron a 80 °C durante 24 h para determinar el peso seco de muestra (DW).

50 Adicionalmente, también se realizaron mediciones del índice de SPAD. Tal índice se correlaciona directamente con el contenido de clorofila de la hoja, que es otro marcado de agua importante. Tales mediciones se hicieron en un punto central en el foliolo entre el nervio medio y el margen de la hoja, mientras que al mismo tiempo el operario protegió el medidor de la luz solar directa. En cada duplicado, se midieron diez hojas por tratamiento y se promediaron a un único valor del índice de SPAD por tratamiento.

55 Todos los datos fueron analizados estadísticamente por ANOVA y se aplica la prueba de diferencia mínima significativa (LSD) a $P = 0,05$ en cada una de las variables significativas medidas.

Los valores mostrados en las Tablas VI y VII, que reflejan los resultados obtenidos con esta prueba para hojas de lechuga y de tomate, respectivamente, son valores medios correspondientes a tres muestras duplicadas. Adicionalmente, las medias dentro de las columnas se separan usando la prueba del intervalo de LSD, y los valores

medios en la misma columna con la misma letra (a, b o c) se considera que no son significativamente diferentes según la prueba del intervalo de LDS a $P \leq 0,05$.

5 **Tabla VI.** *Síntomas de marchitamiento de las hojas, contenido de agua relativo de las hojas e índice de SPAD de lechugas para el tratamiento de control, tierra modificada con fibra de guisante molida seca y tierra modificada con polímero basado en acrilamida.*

Tratamiento	Síntomas de marchitamiento de las hojas	Contenido de agua relativo de las hojas (%)	Índice de SPAD
Tratamiento A (control)	2,6 a	68,0 b	17,7 b
Tratamiento B (fibra de guisante molida seca)	1,8 c	80,7 a	20,0 a
Tratamiento C (polímero basado en acrilamida)	2,2 b	78,8 a	17,7 b

10 *Valores medios en la misma columna con las mismas letras no se considera que sean significativamente diferentes según la prueba de diferencia mínima significativa (LSD) a $P \leq 0,05$.*

15 **Tabla VII.** *Síntomas de marchitamiento de las hojas, contenido de agua relativo de las hojas e índice de SPAD de tomates para el tratamiento de control, tierra modificada con fibra de guisante molida seca y tierra modificada con polímero basado en acrilamida.*

Tratamiento	Síntomas de marchitamiento de las hojas	Contenido de agua relativo de las hojas (%)	Índice de SPAD
Tratamiento A (control)	1,6 a	69,1 b	28,5 b
Tratamiento B (fibra de guisante molida seca)	1,1 c	81,5 a	34,1 a
Tratamiento C (polímero basado en acrilamida)	1,3 b	74,0 a	30,8 b

Valores medios en la misma columna con las mismas letras no se considera que sean significativamente diferentes según la prueba de diferencia mínima significativa (LSD) a $P \leq 0,05$.

20 Después de 5 días bajo condiciones de estrés hídrico, las plantas de lechuga y de tomate tratadas con fibra de guisante molida seca mostraron menos marchitamiento en comparación con las plantas de control y las plantas tratadas con el polímero basado en acrilamida. Se encontró que el índice de SPAD era significativamente más alto en las hojas de aquellas plantas tratadas con fibra de guisante molida seca.

25 De este modo, se llegó a la conclusión de que las plantas tratadas con fibra de guisante presentan estrés hídrico reducido, es decir, un menor marchitamiento de las hojas y un mayor contenido de agua relativo, y un elevado contenido de clorofila en la hoja de plantas cuando se compara con plantas tratadas con polímero basado en acrilamida. Estos efectos ventajosos son incluso más espectacularmente elevados en comparación con plantas de control no tratadas.

30

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para reducir el estrés hídrico en plantas caracterizado porque comprende poner en contacto plantas con fibra molida seca seleccionada del grupo que consiste en fibra de guisante.
2. El método según la reivindicación 1, en el que la relación de fibra molida seca con respecto a plantas es de 0,5 g de fibra de guisante molida seca por planta a 5,0 g de fibra de guisante molida seca por planta.
- 10 3. El método según la reivindicación 1 o 2, en el que dicho contacto se lleva a cabo después de mezclar previamente dicha fibra de guisante molida seca con tierra para plantas según una relación de fibra de guisante molida seca con respecto a tierra de 5 g:1 kg a 50 g:1 kg.
- 15 4. El método según la reivindicación 3, en el que la relación de fibra de guisante molida seca con respecto a tierra es de 10g:1 kg a 30g:1 kg.
- 20 5. El método según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 4, en el que dicho contacto se lleva a cabo de un modo seleccionado del grupo que consiste en:
- recubrimiento de semillas con una mezcla que comprende guisante molido seco;
 - peletización de semillas con una mezcla que comprende guisante molido seco;
 - aplicación de una mezcla que comprende guisante molido seco en forma de gránulos; y
 - aplicación de una mezcla que comprende guisante molido seco en forma de pastillas.
- 25 6. El método según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, en el que dicha mezcla que comprende guisante molido seco comprende además al menos un aditivo seleccionado del grupo que consiste en cargas, aglutinantes, polvos inertes, agentes colorantes, fertilizantes, fungicidas, hormonas de crecimiento, microorganismos para inoculación y cualquier mezcla de los mismos.
- 30 7. El método según la reivindicación 6, en el que dicho al menos un aditivo son microorganismos para inoculación.
- 35 8. El método según la reivindicación 6, en el que dicho al menos un aditivo es un fertilizante seleccionado del grupo que consiste en nitrato de amonio, sulfato de amonio, sulfato de potasio, nitrato de potasio, nitrato de calcio y amonio, fosfato de monoamonio, fosfato de diamonio, fosfato de monopotasio, fosfato de monocalcio, fosfato de dicalcio y mezclas de los mismos.
- 40 9. El método según la reivindicación 8, en el que la relación de fibra de guisante molidas secas con respecto a fertilizante es de 1:1 (peso/peso) a 9:1 (peso/peso).
- 45 10. El método según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9, en el que dicho contacto se lleva a cabo en forma de recubrimiento de semillas con una mezcla de recubrimiento que comprende fibra de guisante molida seca.
- 50 11. El método según la reivindicación 10, en el que la relación de semillas con respecto a fibra de guisante molida seca es 1 kg de semillas por 0,2 g de fibra de guisante molida seca a 1 kg de semillas por 15 g de fibra de guisante molida seca.
- 55 12. El método según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9, en el que dicho contacto se lleva a cabo por peletización de semillas con una mezcla que comprende fibra de guisante molida seca, en el que tal mezcla comprende además un polvo inerte seleccionado del grupo que consiste en carbonato cálcico, tierra de diatomeas, hidróxido de aluminio, hidróxido de calcio, hidróxido de magnesio, hidróxido de bario, sulfato de calcio, sulfato de calcio, carbonato de magnesio básico, caolín-arcilla, dolomita, talco, zeolita, illita, haloisita, bentonita, vermiculita, microlita, turba y mezclas de los mismos.
- 60 13. El método según la reivindicación 12, en el que la relación de fibra de guisante molida seca con respecto a polvo inerte es 1:1 % en peso a 1:20 % en peso.
14. El método según la reivindicación 12 o 13, en el que el polvo inerte es talco.
15. El método según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9, en el que dicho contacto se lleva a cabo aplicando una mezcla que comprende fibra de guisante molida seca en forma de pastillas.