(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 797 723**

(51) Int. Cl.:

A01C 1/08 (2006.01)
A01G 7/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.02.2015 PCT/US2015/015329**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **27.08.2015 WO15126688**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.02.2015 E 15752569 (2)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.03.2020 EP 3110241**

(54) Título: **Método de desinfección interna de semillas mediante combinación de acondicionamiento de semillas con infiltración al vacío**

(30) Prioridad:

24.02.2014 US 201414188030

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.12.2020

(73) Titular/es:

ADVENT SEED PROCESSING LTD. (100.0%)
13/6 Hatzvoni St.
77572 Ashdod, IL

(72) Inventor/es:

ZUCKERBRAUN, ELIEZER y
LANDAU, SIMCHA BUNIM

(74) Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 797 723 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 de desinfección interna de semillas mediante combinación de acondicionamiento de semillas con infiltración al vacío

Campo de la tecnología divulgada

La tecnología divulgada se refiere en general a la agricultura, y, más en particular, a un proceso de tratar semillas usado en agricultura para la siembra.

Antecedentes de la tecnología divulgada

Las enfermedades transmitidas por semillas tienen un efecto económico devastador en la agricultura mundial en una base anual. La información fiable sobre pérdidas de cultivos es difícil de obtener debido a la falta de un esfuerzo organizado a nivel mundial para asimilar tales datos. Sin embargo, se localizó una publicación que manifestaba que las pérdidas de cultivos mundiales anuales totales debido a enfermedades transmitidas por semillas suman los cultivos totales que se producen en América del Sur en un año (Farm Economy,1978, Volumen 1, Número 1, Bangladesh Agricultural Economists' Association). Un ejemplo más específico para mostrar a una escala pequeña el ámbito del problema de las enfermedades transmitidas por semillas se puede encontrar en un único cultivo en un país relativamente pequeño como Israel. En el año 2013 debido a una enfermedad transmitida por semillas en forma del virus CGMMV en sandías produjo una pérdida de cultivo estimada en 20 millones de US$. Además, se producirán pérdidas indirectas en los próximos años debido a la amplia propagación de contaminación de tierra de cultivo que no se puede usar para cultivar sandías en un país ya severamente limitado debido a la falta de espacio.

Además del daño económico en la agricultura, los patógenos transmitidos por semillas, tal como E. coli se han implicado en enfermedades de la salud humana (Instituto Nacional de Alergia y Enfermedades Infecciosas página web accedida el 2 de enero, 2014). Las enfermedades transmitidas por semillas vienen en una variedad de formas que incluyen hongos, bacterias, virus y viroides. Las enfermedades transmitidas por semillas afectan a casi todos los cultivos de semillas agrícolas incluyendo hortalizas, flores, cereales, legumbres y cultivos extensivos. El inóculo de las enfermedades transmitidas por semillas se puede encontrar en la superficie de la semilla. Además, el inóculo se puede encontrar internamente en la testa/pericarpio, endospermo/cotiledones, y en el eje embrionario (Roberts, SJ, 2009, Tropical Plant Pathology).

Recientemente, debido a la globalización de la industria de las semillas, las semillas se producen en muchas partes del mundo y después se venden a una amplia gama de países. Por tanto, el potencial para propagar enfermedades a través de las semillas es grande. Hasta la fecha, se han desarrollado muchos métodos para desinfectar las semillas, pero todos están lejos de ser ideales. La mayoría son solo eficaces para infecciones externas. Los pocos disponibles que son eficaces para infecciones internas comúnmente producen problemas de germinación. Por tanto, las enfermedades transmitidas por semillas se han vuelto un problema extendido.

Los varios tipos de tratamientos disponibles se pueden categorizar como químicos, físicos y biológicos. El tratamiento químico implica introducir varias sustancias químicas incluyendo inductores de resistencia, sustancias químicas sintéticas, naturales, orgánicas, inorgánicas, sistémicas y no sistémicas por varios medios. El tratamiento físico incluye el uso de agua caliente, aire caliente, vapor, calor seco, ultrasonido, y radiación. Los tratamientos biológicos implican la introducción de agentes biológicos que o bien erradican la enfermedad o inducen resistencia natural.

Los tratamientos físicos son difíciles de usar ya que existe una fina línea entre erradicar de forma eficaz la enfermedad transmitida por semillas y dañar las semillas. No todos los lotes de semillas reaccionan igual a todos los tratamientos y, por tanto, es difícil predecir cómo afectarán los tratamientos físicos a la germinación y vigor de las semillas. Están disponibles tratamientos químicos que no tienen efectos fitotóxicos en semillas, pero no se han identificado métodos para conseguir penetración interna completa.

Se examinó el uso de ultrasonido, irradiación, y un remojo de hasta 60 minutos con agua electrolizada ácida para la erradicación de la bacteria Escherichia coli O157:H7 en semillas de alfalfa y brócoli (*Kim, HY et al, 2006, Journal of Food Science Vol. 71, Nr.* 6,). El estudio determinó que ninguno de estos métodos era capaz de dar resultados satisfactorios. Ultrasonido e irradiación son tratamientos físicos, mientras que un remojo de 60 minutos con agua electrolizada es un tratamiento químico.

Se ha enseñado un método de erradicar Acidovorax avenae subsp. citrulli de semillas de melón y sandía por remojo de las semillas en varias sustancias químicas (Feng, J. et al, 2009, Canadian Journal of Plant Pathology, volumen 31, páginas 180-185). El estudio reivindica éxito en erradicar Acidovorax avenae subsp. citrulli de semillas triploides de sandía usando un remojo de 30 minutos con agua electrolizada. Sin embargo, el diseño del estudio tenía fallos en que las semillas infectadas usadas en el estudio eran semillas diploides de sandía, y no semillas triploides. Las semillas triploides de sandía usadas estaban sanas, y simplemente estaban mezcladas con semillas diploides infectadas. Esto solo demuestra que el método es eficaz en semillas diploides de sandía. Además, las semillas infectadas se enjuagaron con una solución de hipoclorito de sodio al 0,5% y por tanto se asumió que estaban libres de inóculo

externo. Mientras que una solución de hipoclorito de sodio al 0,5% es eficaz en superficies lisas tal como un plástico, en semillas no se ha demostrado que sea eficaz. Se demostró que una solución de hipoclorito de calcio al 1% usada como un remojo durante 15 minutos no era eficaz en eliminar Acidovorax avenae subsp. citrulli de semillas de sandía (Hopkins, D.L. y Cuccuuza J.D., 1996, Wet Seed Treatments for the Control of Bacterial Fruit Blotch of Watermelon, The American Phytopathological Society, publicación no. D-1996-0223-05R). El hipoclorito de calcio tiene mayor cloro disponible que el hipoclorito de sodio y por tanto es un desinfectante más fuerte. Por tanto, la capacidad para desinfectar semillas internamente y la capacidad para desinfectar semillas triploides de sandía permanece sin demostrar.

Acondicionamiento de semillas es un término usado en la industria de las semillas para describir un tratamiento de hidratación presiembra desarrollado para mejorar el establecimiento de la plántula. El acondicionamiento de semillas tiene una larga historia de uso para aumentar la germinación de la semilla en vigor. Por ejemplo, hay investigaciones en registro desde tan pronto como 1943 en el campo del acondicionamiento de semillas (Levitt, J. y Harem, P.C., 1943, A method of increasing the rate of seed germination of Taraxacum kok-saghyz. Plant Physiology 18(2): 288-293). Las técnicas de acondicionamiento de semillas se pueden dividir en tres categorías principales que son acondicionamiento osmótico (osmoacondicionamiento), hidroacondicionamiento (acondicionamiento en tambor), y acondicionamiento de matriz (matriacondicionamiento).

El fin con los tres tipos mencionados de acondicionamiento es permitir una imbibición e inducción controladas del metabolismo pregerminativo ("activación"), pero se previene la aparición de la radícula. El tratamiento de hidratación se para antes de que se pierda la tolerancia a la desecación. Una parte importante del proceso de acondicionamiento es parar el proceso en el momento adecuado, que varía dependiendo de la especie y el lote de semillas. Con el acondicionamiento osmótico, las semillas se incuban en soluciones bien aireadas con un bajo potencial hídrico, y después de ello se lavan y secan. El bajo potencial hídrico de las soluciones se puede lograr añadiendo agentes osmóticos como manitol, polietilenglicol (PEG) o sales como KCl. El hidroacondicionamiento se logra por adición continua y sucesiva de una cantidad limitada de agua a las semillas. Se usa un tambor para este fin y el agua también se puede aplicar por aire húmedo. El remojo en la finca es una forma sencilla y útil de hidroacondicionamiento que se practica al incubar las semillas durante un tiempo limitado en agua. El acondicionamiento en matriz es la incubación de las semillas en un matriz sólida insoluble (vermiculita, tierra de diatomeas, arcilla calcinada, y polímeros que absorben agua) con una cantidad limitada de agua. Este método confiere imbibición lenta.

Se sugirió un método de combinar acondicionamiento en matriz con tratamiento químico o biológico (Eastin, J.A., 2000, Patente en EE UU 6.076.301). Este método sugiere que se pueden mezclar sustancias químicas o microbios con el agua usada para el acondicionamiento, mediante lo cual las semillas embeben la sustancia química o microbios. Este método se puede usar como una técnica tanto para desinfectar semillas con sustancias químicas, o impregnar semillas con agentes biológicos.

Se ha probado la eficacia de usar una solución de antibióticos combinada con acondicionamiento en matriz para desinfectar semillas triploides de sandía infectadas internamente con Acidovorax avenae subsp. citrulli. Con el fin de cribar antibióticos eficaces, se obtuvieron semillas diploides de sandía que estaban externamente infectadas con Acidovorax avenae subsp. citrulli. Se ensayaron varios antibióticos incluyendo kasugamicina, oxitetraciclina, cloranfenicol, ácido oxalínico, ciprofloxacina, ceftriaxona sódica, trimetoprima-sulfametoxazol, sulfato de colistina, y piperacilina/tazobactam. Se remojaron las semillas infectadas durante 10 minutos en soluciones de antibiótico de 100 ppm, 250 ppm, y 500 ppm de los antibióticos anteriores. Se eligió la dosis en base a información descrita por Layne Wade (21er Annual Tomato Disease Workshop, Asheville, NC, Noviembre 2006) que afirmaba que la CIM (concentración inhibidora mínima) de kasugamicina en Acidovorax avenae subsp. citrulli es mayor de 100 ppm. Los resultados fueron como se esperaba en que 100 ppm no era suficiente para eliminar las bacterias en las semillas para ninguno de los antibióticos anteriores. Kasugamicina, oxitetraciclina, cloranfenicol, ácido oxalínico, trimetoprima-sulfametoxazol, sulfato de colistina, y piperacilina/tazobactam fueron todos eficaces tanto a 250 ppm como a 500 ppm. Ciprofloxacina, ceftriaxona sódica no fueron eficaces a ninguna dosis. Se eligió uno de los antibióticos eficaces que era oxitetraciclina a 500 ppm y las semillas triploides de sandía se acondicionaron en matriz con esta solución durante 6 días. Las bacterias en las semillas no fueron eliminadas usando este método.

Se enseñó un método de infiltración al vacío de semillas para el fin de impregnar semillas con bacterias beneficiosas (Porter, F.E. y McAlpine, V.W., 1960, patente en EE UU 2.932.128). La infiltración al vacío es el proceso de poner semillas mezcladas con un medio líquido tal como agua mezclada con sustancias químicas u otras sustancias, en un estado de presión reducida en una cámara de vacío. Este método se desarrolló con el fin de eliminar la necesidad de remojar las semillas en una solución que contiene bacterias u otros microorganismos durante periodos de tiempo prolongados. El remojo prolongado puede iniciar el proceso de germinación en tan poco como 24 horas, y por tanto las semillas se tendrían que plantar a las 24 horas, y no hay oportunidad de volver a secar las semillas para almacenamiento y uso futuro. Este método permitía suficiente penetración con solo 10 minutos de remojo debido al estado de presión reducida. Este método de usar infiltración al vacío se usó para obtener penetración profunda de antibióticos, así como otras sustancias químicas para el tratamiento de semillas melón infectadas con Acidovorax avenae subsp. citrulli (Frare, V.C.,2010, Melon (Cucumis melo L.) seeds treatment to control Acidovorax avenae subsp. citrulli, Luiz de Queiroz College of Agriculture). Sin embargo, ningún tratamiento químico tuvo éxito en erradicar la enfermedad de semillas infectadas usando infiltración al vacío.

Las técnicas de infiltración al vacío se divulgan en los métodos de tratamiento de semillas de los documentos DE 12 04 881 B y DE 12 92 434 B donde el tratamiento al vacío se combina con tratamiento con calor de las semillas.

Tras la investigación, se determinó que el problema con que la infiltración al vacío no funcionara puede haber sido debido a que el tiempo de tratamiento de 10 minutos no haya sido suficientemente largo. Por tanto, se llevó a cabo el ensayo de infiltración al vacío con oxitetraciclina 500 ppm durante un periodo de tiempo prolongado más allá de 10 minutos. Se esperaba que al duplicar o triplicar el periodo de tratamiento de 10 minutos, la enfermedad se erradicaría de las semillas infectadas. Para cubrir el caso extremo, se hizo un periodo de tratamiento de 10 veces el periodo de 10 minutos además del doble y el triple. Sorprendentemente, ni siquiera el tratamiento de 100 minutos erradicó con éxito la enfermedad transmitida por las semillas.

Después de este intento sin éxito con infiltración al vacío, se presumió además que la concentración de antibiótico necesitaba aumentarse, y que la duración del tratamiento no era el problema. Por tanto, se hizo un intento más para erradicar la enfermedad transmitida por semillas usando infiltración al vacío con tanto un periodo de tratamiento prologando, como altas concentraciones de antibiótico. Mientras que previamente se esperaba que 500 ppm de oxitetraciclina sería suficiente, esta concentración se duplicó, triplicó, y para un caso extremo a 10 veces la concentración original igual a 5000 ppm. Las semillas infectadas se trataron con estas concentraciones de antibiótico durante 10 minutos, 20 minutos, 30 minutos, y para el caso extremo 100 minutos. Por accidente el tratamiento de 10 minutos se olvidó y se dejó durante más de 24 horas con infiltración al vacío. Los resultados después de análisis de laboratorio mostraron que solo el tratamiento de más de 24 horas era eficaz.

Después del éxito de la longitud extrema de la infiltración al vacío de 24 horas a una alta concentración de antibióticos, una baja concentración de antibióticos (500 ppm) se ensayó después para una duración extrema de infiltración al vacío de 24 horas. La enfermedad transmitida por semillas se eliminó mostrando que el tratamiento largo con infiltración al vacío y no la alta concentración de antibióticos era la clave para un tratamiento eficaz.

Experimentos en otros cultivos de hortalizas incluyendo brócoli, colinabo, sandía, melón, tomate, pimiento, y zanahorias, han concluido que el tiempo mínimo necesario de infiltración al vacío en una solución de antibiótico para reducir de forma eficaz una enfermedad transmitida por semillas era aproximadamente dos horas. Sin embargo, tratar una amplia gama de semillas agrícolas durante más de dos horas en una solución acuosa comúnmente produce una disminución en la calidad de la semilla. Esto hace el uso de un tratamiento de infiltración al vacío con una solución acuosa durante más de dos horas una solución no viable para eliminar enfermedades transmitidas por semillas en semillas agrícolas. Por tanto, una posible solución a este problema es combinar un método de acondicionamiento de semillas junto con la infiltración al vacío larga en soluciones acuosas.

Sin embargo, hasta la fecha, estos métodos no se han combinado con éxito para lograr resultados superiores.

Compendio de la tecnología divulgada

Por tanto, es un objeto de la tecnología divulgada proporcionar un método que emplea un tratamiento de infiltración al vacío largo con acondicionamiento de semillas, anulando de esta manera cualquier problema derivado del proceso de germinación.

Según esto, el método divulgado combina el acondicionamiento de semillas y la infiltración al vacío juntas con el fin de proporcionar un método de penetración profunda de semillas con sustancias químicas u otras sustancias en una solución acuosa. Al combinar los dos procesos, el proceso de germinación de las semillas se puede iniciar permitiendo un periodo de desinfección relativamente largo. El periodo de desinfección largo al vacío proporciona que la máxima penetración para enfermedades transmitidas por semillas se produzca muy dentro de la semilla.

Según la invención, se usa un método para tratar semillas. El método se lleva a cabo, no necesariamente en el siguiente orden, por acondicionamiento de las semillas usando una técnica de acondicionamiento durante una duración de acondicionamiento específica, y aplicación de una técnica de infiltración al vacío durante una duración específica de vacío a las semillas usando una solución desinfectante. Las etapas se llevan a cabo en cualquier orden. La técnica de acondicionamiento usada es o bien osmoacondicionamiento, acondicionamiento en matriz o hidroacondicionamiento. La solución desinfectante puede ser un antibiótico, tal como oxitetraciclina. La oxitetraciclina puede estar disuelta en la solución a aproximadamente 250 partes por millón (ppm). La técnica de acondicionamiento se lleva a cabo durante una duración entre uno y quince días. La duración del tratamiento de vacío es entre 2 horas y 72 horas.

Se debe entender que el uso de “y/o” se define de forma inclusiva de modo que el término “a y/o b” se debe leer para que incluya los conjuntos: “a y b”, “a o b”, “a”, “b”. Se muestran detalles adicionales en la descripción detallada a continuación.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra un diagrama de flujo que describe las etapas realizadas en un método ejemplar de llevar a cabo formas de realización de la tecnología divulgada.

La figura 2 muestra una tabla de los resultados del tratamiento de un experimento que implica oxitetraciclina que compara métodos del estado de la técnica con métodos de formas de realización de la tecnología divulgada.

La figura 3 muestra una tabla de los resultados del tratamiento de un experimento que implica diferentes duraciones de acondicionamiento usadas en de llevar a cabo formas de realización de la tecnología divulgada.

La figura 4 muestra una tabla de los resultados del tratamiento de un experimento que implica diferentes duraciones de acondicionamiento y cantidades de fluido usadas en métodos de llevar a cabo formas de realización de la tecnología divulgada.

Descripción detallada de formas de realización de la tecnología divulgada

Las formas de realización de la tecnología divulgada se dirigen a un método para combinar acondicionamiento de semillas e infiltración al vacío para facilitar la penetración profunda de sustancias químicas u otras sustancias en las semillas. Al combinar los dos procesos, el proceso de germinación de las semillas se puede iniciar dejando un periodo de desinfección relativamente largo. El periodo de desinfección largo al vacío proporciona la máxima penetración en la semilla con el fin de desenterrar enfermedades que se producen profundamente dentro de la semilla.

El tipo de acondicionamiento de semillas en el método divulgado es osmoacondicionamiento, acondicionamiento en matriz o hidroacondicionamiento. Además, se puede tratar cualquier tipo de semilla, incluyendo la mayoría de los cultivos de hortalizas, plantas ornamentales, y cultivos agronómicos. Virtualmente cualquier sustancia que sea soluble en agua, tal como fungicidas, antibióticos, agentes antivirales, y agentes biológicos se puede usar para tratar semillas con este método siempre que no sean fitotóxicos. Además, se puede usar agua con propiedades biocidas tal como agua electrolizada como la solución acuosa en el proceso de infiltración al vacío. Cuando se usa acondicionamiento en matriz o hidroacondicionamiento, ambos de cuales requieren una solución acuosa, se puede usar agua con propiedades biocidas tal como agua electrolizada o agua corriente como la solución acuosa. La combinación de infiltración al vacío y acondicionamiento de semillas se puede llevar a cabo en cualquier orden, ya sea infiltración al vacío primero seguido por acondicionamiento de semillas, acondicionamiento de semillas seguido por infiltración al vacío, o infiltración al vacío en medio del proceso de acondicionamiento de semillas.

La duración del tratamiento de acondicionamiento de semillas varía por especies. En formas de realización de la tecnología divulgada, la duración del acondicionamiento de semillas se disminuye para permitir tiempo para la infiltración al vacío. El tiempo de procesamiento total, incluyendo el acondicionamiento de semillas y la infiltración al vacío, se ajusta con el fin de llevar las semillas tan cerca como sea posible a completar el proceso de germinación, pero parando poco antes de la germinación misma. Después del tratamiento, las semillas se secan y se pueden almacenar para uso posterior. Si se tratan apropiadamente, las semillas estarán libres de enfermedad transmitida por semillas, mostrarán mayor vigor de semilla, tendrán germinación a temperatura fría mejorada, y posiblemente germinación aumentada también.

Las formas de realización de la tecnología divulgada estarán más claras en vista de la siguiente descripción de las figuras.

La figura 1 muestra un diagrama de flujo que describe las etapas realizadas en un método ejemplar de llevar a cabo formas de realización de la tecnología divulgada. La etapa 110 implica elegir qué especie de semilla se buscará desinfectar. La siguiente etapa, la etapa 120, se dirige a seleccionar las sustancias apropiadas que se ha demostrado que son eficaces contra la enfermedad diana, y que no son fitotóxicas. Puesto que esta es una técnica nueva y penetra profundamente en el endospermo de las semillas, se necesita hacer un nuevo cribado de fitotoxicidad para ver cómo reacciona una sustancia en este método. Por tanto, en la etapa 130, se lleva a cabo un cribado de fitotoxicidad en las semillas elegidas usando el tratamiento elegido. Los resultados del cribado usando métodos anteriores no son aplicables porque otros métodos habrían alcanzado menor penetración y no sería un indicador de fitotoxicidad apropiado usando la tecnología divulgada. Por ejemplo, los inventores cribaron el antibiótico oxitetraciclina usando el método de añadir sustancias químicas al agua usada en acondicionamiento en matriz (Eastin, J.A., 2000, Patente en EE UU 6.076.301) y el método de la presente invención. Se usó agua que contenía 500 ppm de oxitetraciclina para acondicionar semillas triploides de sandía usando acondicionamiento en matriz. Además, la misma semilla se trató con infiltración al vacío usando soluciones de oxitetraciclina 500 ppm durante 6 horas, que iba seguido por un acondicionamiento en matriz usando agua. Para control, se trató semilla del mismo lote usando infiltración al vacío con agua, seguido por acondicionamiento en matriz usando agua. Además, las semillas sin tratar se conservaron como un control adicional. Los resultados se muestran en la tabla 200 de la figura 2.

Los resultados muestran que oxitetraciclina es muy fitotóxica cuando penetra el endospermo de la semilla. La germinación estaba afectada, y el T50 (el tiempo en horas para que el 50% de las semillas germine) también estaba afectado. Además, las plántulas que se desarrollaron a partir de semillas tratadas con infiltración al vacío con una solución de oxitetraciclina 500 ppm durante 6 horas seguido por acondicionamiento en matriz con agua mostraron

amarillamiento grave mientras que otras no. Los resultados demuestran tanto la penetración mucho más profunda de la semilla cuando se usa la combinación de acondicionamiento de semillas e infiltración al vacío con sustancias químicas en oposición a acondicionamiento de semillas solo con sustancias químicas, como también la fitotoxicidad de oxitetraciclina. De la misma manera, se puede comprobar la idoneidad de cualquier sustancia para esta técnica de desinfección.

El cribado adicional usando el formato descrito anteriormente, mostró que las siguientes sustancias eran fitotóxicas: ácido oxalínico, ciprofloxacina, cloranfenicol, y fosfato trisódico (una sustancia antiviral comúnmente usada). Las sustancias cribadas que muestran efectos fitotóxicos leves incluyen trimetoprima-sulfametoxazol, sulfato de colistina, Terraclor Super X (un fungicida comercial que contiene pentacloronitrobenceno y etridiazol), y Switch (un fungicida comercial que contiene fludioxonil y ciprodinil). Las sustancias cribadas que no mostraron efectos fitotóxicos son piperacilina/tazobactam, ceftriaxona sódica, y agua electrolizada.

Las sustancias con niveles adecuados de fitotoxicidad se criban después para su afectividad contra enfermedades diana. Para un ejemplo, los inventores cribaron el antibiótico piperacilina/tazobactam, y agua electrolizada para su afectividad contra Acidovorax avenae subsp. citrulli en semillas diploides de sandía. Se eligieron las semillas diploides de sandía porque típicamente muestran infecciones externamente. Las semillas infectadas se remojaron en soluciones durante 30 minutos de agua electrolizada, y piperacilina/tazobactam a 100 ppm y 250 ppm. Los resultados mostraron que el agua electrolizada y piperacilina/tazobactam a 250 ppm eran eficaces en eliminar las bacterias, mientras que piperacilina/tazobactam a 100 ppm no era eficaz. Esto sirve solo como un ejemplo, y se puede usar cualquier método de cribado ya sea in vivo o in vitro para cribar para afectividad contra las enfermedades diana y dosis apropiada.

Volviendo a la figura 1, si el cribado produce resultados desfavorables, y la fitotoxicidad se encuentra en la etapa 140, entonces el método se termina en la etapa 150. Después de la etapa 150, el método puede volver a la etapa 120 mediante lo cual se puede elegir una nueva sustancia de tratamiento.

Si no se encuentra fitotoxicidad, entonces en la etapa 160 se elige una técnica de acondicionamiento. Los ejemplos de técnicas de acondicionamiento incluyen osmoacondicionamiento 161, acondicionamiento en matriz 162, e hidroacondicinamiento 163. Siguiendo con el método, en la etapa 170, se elige una duración de acondicionamiento. La duración de acondicionamiento es la longitud de tiempo al que las semillas se someten a una técnica de acondicionamiento. La duración puede variar entre un día a 15 días. Los ejemplos mostrados en la figura 1 son dos días 171, tres días 172, y cuatro días 173. Además, se plasma X días 174 para representar cualquier duración prescrita por un usuario. Por último, en la etapa 180, las semillas se tratan usando infiltración al vacío. Para esta etapa, se puede elegir una duración también, aunque la duración puede no ser tan determinante de los resultados en comparación con la duración del acondicionamiento.

La determinación de la duración apropiada del tratamiento de acondicionamiento y el tratamiento de infiltración al vacío se realiza en una base empírica. Para un ejemplo, los inventores identificaron la duración de tratamiento apropiada de la siguiente manera. Un lote de semillas de brócoli infectadas con Xanthomonas campestris pv. Campestris se trataron con las siguientes pautas de tratamiento. Acondicionamiento osmótico con polietilenglicol (PEG) durante 4, 5, y 6 días seguido por infiltración al vacío con piperacilina/tazobactam a 500 ppm durante 6 horas. Las semillas se ensayaron después de los tratamientos tanto para germinación como presencia de la enfermedad Xanthomonas campestris pv. Campestris. Los resultados se muestran en la tabla 300 de la figura 3.

Los resultados muestran que el mejor tratamiento para este lote particular fue acondicionamiento osmótico durante 4 días seguido por 6 horas de infiltración al vacío con 500 ppm de piperacilina/tazobactam, que dio los mejores resultados de germinación y erradicó la enfermedad transmitida por semillas Xanthomonas campestris pv. Campestris. Este ejemplo muestra la forma en que se pueden desarrollar los protocolos de tratamiento. Se pueden desarrollar varios protocolos estándar para cada cultivo específico, y cada lote se ensaya después para ver qué protocolo es el mejor. Como punto de partida para el desarrollo del protocolo, se usa el conocimiento previo en la materia de acondicionamiento de semillas y después se realiza la adaptación para ajustar la duración deseada del proceso de infiltración al vacío.

Como otro ejemplo basado en el desarrollo de un protocolo anterior, se trataron semillas de melón infectadas con el virus del mosaico verde jaspeado del pepino (CGMMV). Primero, las semillas se trataron externamente con fosfato trisódico para inactivar el virus en la cubierta de la semilla para asegurar que la infección es interna. Los tratamientos fueron como sigue: acondicionamiento en matriz durante 3 días con 100 gramos de semilla, 300 gramos de matriz sólida, 70 ml de agua seguido por 24 horas de infiltración al vacío con agua electrolizada, acondicionamiento en matriz durante 3 días con 100 gramos de semilla, 300 gramos de matriz sólida, 100 ml de agua seguido por 24 horas de infiltración al vacío con agua electrolizada, acondicionamiento en matriz durante 4 días con 100 gramos de semilla, 300 gramos de matriz sólida, 100 ml de agua seguido por 24 horas de infiltración al vacío con agua electrolizada, y acondicionamiento en matriz durante 5 días con 100 gramos de semilla, 300 gramos de matriz sólida, 100 ml de agua seguido por 24 horas de infiltración al vacío con agua electrolizada. Durante el periodo de infiltración al vacío de 24 horas, el agua electrolizada se sustituyó con agua electrolizada fresca cada hora. Las semillas se ensayaron para germinación y para CGMMV por ELISA en plántulas. Los resultados se muestran en la tabla 400 de la figura 4.

Según los resultados, la germinación mejoró, y el tiempo hasta el 50% de germinación (T50) disminuyó en el 42% mostrando una velocidad superior en germinación en temperatura fría. De forma más importante, la enfermedad transmitida por semillas se erradicó. Como se representa en las figuras 2 a 4, al combinar el acondicionamiento de semillas con la infiltración al vacío antes o después del acondicionamiento, se puede alcanzar la desinfección interna de la semilla al tiempo que se mejora la calidad de la germinación de la semilla, y se permite el almacenamiento para uso futuro.

Los ejemplos específicos anteriores se deben interpretar como simplemente ilustrativos, y no limitantes de la divulgación en modo alguno. Sin elaboración adicional, se cree que un experto en la materia puede, basado en la descripción en el presente documento, utilizar la presente divulgación a su alcance más completo. Aunque se dieron ejemplos específicos de enfermedades transmitidas por semillas, la invención se puede usar para virtualmente todas las enfermedades transmitidas por semillas, incluyendo bacterias, hongos, virus, y viroides. Además, se mencionaron cultivos específicos en los ejemplos; sin embargo, la invención se puede usar para semillas de virtualmente cualquier cultivo incluyendo hortalizas, cultivos agronómicos, y plantas ornamentales. La invención es una técnica de aplicación, y se puede usar con cualquier sustancia que sea miscible en agua.

REIVINDICACIONES

1. Un método de tratar semillas que consiste en las siguientes etapas, en donde dichas etapas se llevan a cabo en cualquier orden:

   acondicionar dichas semillas usando una técnica de acondicionamiento elegida entre osmoacondicionamiento, acondicionamiento en matriz, o hidroacondicionamiento durante una duración específica de acondicionamiento entre 1 y 15 días;
   y
   aplicar una técnica de infiltración al vacío durante una duración de entre 2 horas y 72 horas a dichas semillas usando una solución desinfectante.

2. El método de la reivindicación 1, en donde dicha técnica de acondicionamiento es acondicionamiento en matriz.

3. El método de la reivindicación 1, en donde dicha técnica de acondicionamiento es osmoacondicionamiento.

4. El método de la reivindicación 1, en donde dicha solución desinfectante es agua electrolizada.

5. El método de la reivindicación 1, en donde dicha duración de la infiltración al vacío es entre 2 horas y 36 horas.

6. El método de la reivindicación 1, en donde la técnica de acondicionamiento se aplica primero seguido por la técnica de infiltración al vacío.

7. El método de la reivindicación 1, en donde la técnica de infiltración al vacío se aplica primero seguida por la técnica de acondicionamiento.

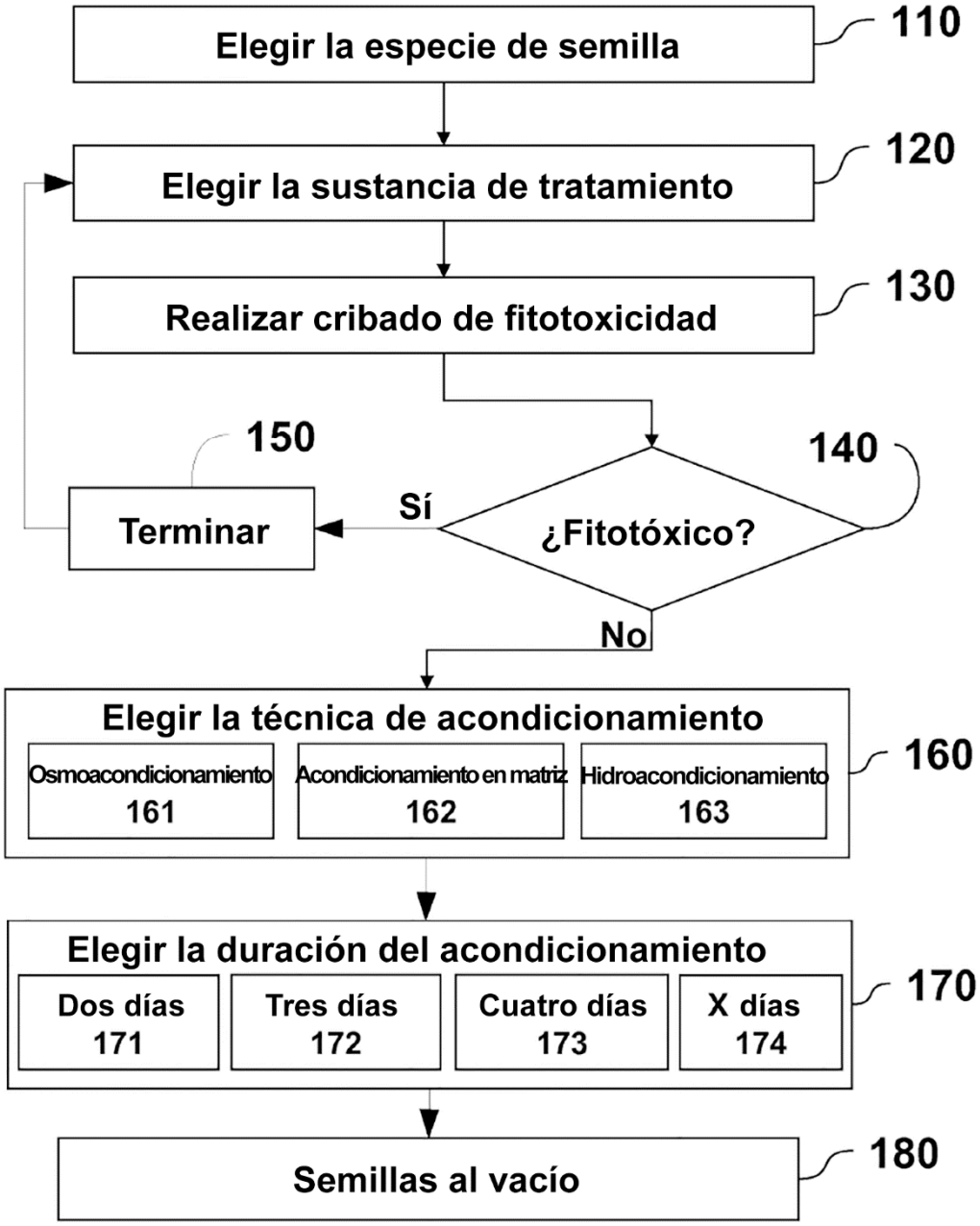
Elegir la especie de semilla
110
Elegir la sustancia de tratamiento
120
Realizar cribado de fitotoxicidad
130
150
140
Terminar
Sí
¿Fitotóxico?
No
Elegir la técnica de acondicionamiento
Osmoacondicionamiento
161
Acondicionamiento en matriz
162
Hidroacondicionamiento
163
160
Elegir la duración del acondicionamiento
Dos días
171
Tres días
172
Cuatro días
173
X días
174
170
Semillas al vacío
180

Figura 1

Porcentaje de germinación y T50 después de tratamiento con oxitetraciclina

Tratamiento	Germinación %	T50 (Horas)
Sin tratar	90	84
Acondicionamiento en matriz con solución de oxitetraciclina 500 ppm	88	92
Infiltración al vacío con solución de oxitetraciclina 500 ppm seguido por acondicionamiento en matriz con agua	48	No aplicable
Infiltración al vacío con agua seguido por acondicionamiento en matriz con agua	94	62

200

Figura 2

Porcentaje de germinación y presencia de la enfermedad

Acondicionamiento osmótico con infiltración al vacío

Tratamiento	Germinación %	Enfermedad
Sin tratar	86	Presente
Acondicionamiento osmótico 4 días con 6 horas de infiltración al vacío	98	Ausente
Acondicionamiento osmótico 5 días con 6 horas de infiltración al vacío	96	Ausente
Acondicionamiento osmótico 6 días con 6 horas de infiltración al vacío	91	Ausente

300

Figura 3

Porcentaje de germinación, T50, y presencia de la enfermedad

Acondicionamiento en matriz con infiltración al vacío

Tratamiento	Germinación %	T50 (Horas)	Presencia de la enfermedad
Sin tratar	94	71	Presente
Acondicionamiento en matriz durante 3 días con 70 ml de agua con 24 horas de infiltración al vacío	98	45	Ausente
Acondicionamiento en matriz durante 3 días con 100 ml de agua con 24 horas de infiltración al vacío	100	41	Ausente
Acondicionamiento en matriz durante 4 días con 100 ml de agua con 24 horas de infiltración al vacío	99	43	Ausente
Acondicionamiento en matriz durante 5 días con 100 ml de agua con 24 horas de infiltración al vacío	98	45	Ausente

400

Figura 4