

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 872 599**

21 Número de solicitud: 202030362

51 Int. Cl.:

A01N 63/38 (2010.01)

A01N 63/30 (2010.01)

A01N 63/20 (2010.01)

A01N 63/27 (2010.01)

A01N 63/28 (2010.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

28.04.2020

43 Fecha de publicación de la solicitud:

02.11.2021

Fecha de concesión:

25.02.2022

45 Fecha de publicación de la concesión:

04.03.2022

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD DE LEÓN (100.0%)
Avda. de la Facultad 25
24071 León (León) ES**

72 Inventor/es:

**CASQUERO LUELMO, Pedro A.;
MAYO PRIETO, Sara;
RODRÍGUEZ GONZÁLEZ, Álvaro;
CARRO HUERGA, Guzmán;
ÁLVAREZ GARCÍA, Samuel;
PORTEOUS ÁLVAREZ, Alejandra J. y
DEL SER HERRERO, Sara**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

54 Título: **RECUBRIMIENTO DE SEMILLA QUE COMPRENDE UN AGENTE DE BIOCONTROL Y CONOS DE LÚPULO**

57 Resumen:

Recubrimiento de semilla que comprende un agente de biocontrol y conos de lúpulo.

La presente invención es un recubrimiento de semilla que comprende un agente de biocontrol y conos de lúpulo como fuente de carbono, y opcionalmente un agente de fijación. La invención también comprende la semilla recubierta y el procedimiento de fijación.

ES 2 872 599 B2

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 41 LP 24/2015. Dentro de los seis meses siguientes a la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial cualquier persona podrá oponerse a la concesión. La oposición deberá dirigirse a la OEPM en escrito motivado y previo pago de la tasa correspondiente (art. 43 LP 24/2015).

DESCRIPCIÓN

**RECUBRIMIENTO DE SEMILLA QUE COMPRENDE UN AGENTE DE BIOCONTROL Y
CONOS DE LÚPULO**

5

Campo de la invención

La presente invención pertenece al campo de la horticultura. En particular, al tratamiento de semillas vegetales para promover la germinación y el desarrollo de la planta en los primeros
10 estadios de crecimiento.

Antecedentes de la invención

El tratamiento de semillas utilizando recubrimientos es una práctica común en horticultura. Los recubrimientos se aplican en la superficie de la semilla para protegerla y mejorar las
15 condiciones de siembra; por ejemplo, a través del tratamiento de superficie con pesticidas para combatir enfermedades e insectos plaga, o el recubrimiento con agentes para retrasar la germinación de las semillas o para mejorar su capacidad para resistir a la sequía, calor, salinidad del suelo u otros factores externos. Otro objetivo de los recubrimientos es incrementar el peso de la semilla para facilitar su manejo.

20

Cuando el recubrimiento modifica claramente el tamaño y la forma de la semilla, el tipo de tratamiento se conoce como pildoración.

Hasta ahora el recubrimiento de semillas pildoradas ha comprendido ingredientes como arcilla
25 roja, arcilla, perlita, harina fósil, carbonato cálcico, talco, hidróxido cálcico, hidróxido de aluminio o caolín, con o sin la adición de un aglutinante. El recubrimiento de semillas pildoradas suele además comprender sustancias como nutrientes y pesticidas para favorecer el desarrollo de la semilla. En estos casos, las semillas se recubren con un agente activo triturado o en forma de mezcla en polvo, o bien disuelto en una disolución o suspensión con
30 la que se trata la superficie de las semillas.

Aunque el uso de sustancias de síntesis química suele ser eficaz y económico, presenta también grandes inconvenientes ambientales y sanitarios. Con mayor frecuencia, el consumo de alimentos está dirigido por aspectos no sólo relacionados con la seguridad del producto,
35 sino con aspectos sanitarios, nutricionales y ambientales. Se buscan por ello técnicas de producción más naturales que reduzcan el uso de sustancias de síntesis química.

Una forma sostenible a largo plazo para el control de fitopatógenos es el empleo de agentes biológicos o de biocontrol.

5 Existen formulaciones de agentes biológicos formados por bacterias como *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Streptomyces* y *Bacillus*, y por hongos como *Gliocladium*, *Trichoderma*, *Ampelomyces*, *Candida* y *Coniothyrium*. Sin embargo, la acción de dichos agentes de biocontrol depende de la cantidad de carbono y/o materia orgánica disponible en el medio, de la temperatura y de otros factores.

10

Los agentes de biocontrol necesitan una fuente de carbono para poder desarrollarse adecuadamente y así poder proteger a las plantas. Sin embargo, los recursos biológicos usados como fuente de carbono son finitos y extraerlos directamente del ecosistema puede resultar insostenible. Además, los agentes de biocontrol pueden responder de forma distinta a diferentes fuentes de carbono, sobre todo cuando son parte de mezclas complejas de material orgánico. Es posible además que la fuente de carbono interfiera con el crecimiento de la planta.

15

La solicitud EP 1051075 A2 describe un agente protector de las plantas basado en una preparación de distintas plantas. La EP 0538091 A1 emplea compuestos extraídos de algas marinas para recubrir la semilla. La solicitud WO 03071855 A2 describe una semilla recubierta con un polvo fino seco de un micronutriente mezclado con un agente dispersante. Ninguno de estos documentos describe ni sugiere el uso de agentes de biocontrol.

20

La patente CN 103039439 B sí incorpora *Trichoderma*, que es un hongo beneficioso para las plantas utilizado como agente de control biológico contra diversos patógenos vegetales. La composición incluye polietilenglicol y un adhesivo para formar el recubrimiento, sin embargo no utiliza ningún sustrato orgánico.

25

La solicitud WO 1991007869 A1 se considera como el documento más cercado de la técnica. Describe una semilla recubierta con *Trichoderma* y un material particulado carbonáceo, en particular, turba, esquistos lignosos, lignita de *Sphagnum*, carbón activado o mezclas de los mismos. Sin embargo, estos componentes de suelos húmicos no resultan los más adecuados como fuente de carbono para *Trichoderma* o para cualquier otro agente de biocontrol.

30

35

Por otra parte, el lúpulo, *Humulus lupulus*, es una planta de la que se aprovechan las flores, también conocidas como “conos”, para la industria cervecera y farmacéutica. Solo los conos de las flores femeninas pueden secretar lupulina que es donde se acumulan los principales principios activos del lúpulo. En el mejor conocimiento de los inventores nunca se ha descrito el uso de conos de lúpulo como fuente de carbono de un agente de biocontrol.

El problema de la técnica puede plantearse como la obtención de una fuente de carbono de mejor disponibilidad para un agente de biocontrol en un recubrimiento de semilla. La solución de la presente invención es el uso de conos de lúpulo en dicho recubrimiento.

10 **Descripción**

La presente invención se refiere a un recubrimiento de semillas que comprende al menos un agente de biocontrol y conos de lúpulo como fuente de carbono. Dicho recubrimiento promueve el crecimiento del agente de biocontrol y mejora las características de crecimiento de la planta.

15 En la presente invención, se entiende por “agente de biocontrol” o agente biológico un microorganismo con capacidad para reducir la población de un eventual agente patógeno o para evitar sus efectos.

20 El recubrimiento de semillas de la presente invención puede encontrarse en una cantidad de 3 a 200 kg por cada kg de semilla, es decir, en un porcentaje en peso de 300 a 2.000%, con respecto al peso de la semilla. Por tanto, el recubrimiento de la presente invención se considera un tipo de pildorado de semillas. La cantidad de recubrimiento varía en función del tamaño y forma de la semilla en el mejor conocimiento del experto.

25 En la presente invención se entiende por “conos de lúpulo”, la flor femenina de la planta *Humulus lupulus*, ya sea la flor entera o cualquier parte o combinación de partes la misma, o bien polvo de conos de lúpulo.

30 Los conos de lúpulo de la invención tienen un tamaño de partícula que puede variar según la superficie a recubrir, pero en un aspecto preferible será menor de 500 µm.

En otro aspecto preferible, el recubrimiento de la presente invención comprende polvo de conos de lúpulo, más preferiblemente con un tamaño de partícula entre 150 y 500 µm. El polvo de conos de lúpulo es obtenible por trituración, molienda, o cualquier método conocido en la técnica para la formación de polvos.

En otro aspecto de la invención, los conos de lúpulo se utilizan en el recubrimiento en forma seca.

- 5 Los conos de lúpulo a utilizar en el recubrimiento de la presente invención pueden provenir de cualquier fuente, por ejemplo, directamente de la cosecha de la planta, de restos de cosecha de la planta o de desechos o subproductos de la industria.

10 Los conos de lúpulo pueden representar entre el 5 y 99,5% en peso del peso total del recubrimiento. Por ejemplo, los conos de lúpulo pueden encontrarse en una cantidad de 5% a 10%, de 10% a 20%, de 20% a 30%, de 30% a 40%, de 40% a 50%, de 50% a 60%, de 70% a 80%, de 80% a 90%, o de 90% a 99,5%, en peso, con base en el peso total del recubrimiento. El porcentaje de conos de lúpulo a utilizar varía de acuerdo con el tamaño de la semilla; por ejemplo, puede ser de entre 60% y 90% para semillas pequeñas, de 20% y 15 60% para semillas medianas, y de entre 5% y 20% para semillas grandes, con respecto al peso de las semillas.

De acuerdo con la presente invención, el recubrimiento de la semilla comprende al menos un agente de biocontrol. En un aspecto preferible, el agente de control biológico es una bacteria. 20 En otro aspecto es un hongo que forma esporas. Preferiblemente, el agente de biocontrol tiene la capacidad de colonizar el sistema de raíces de la planta a la cual se aplica. Más preferiblemente, los agentes de biocontrol se seleccionan entre al menos una bacteria del género de *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Streptomyces* o *Bacillus*, y al menos un hongo del género *Gliocladium*, *Trichoderma*, *Ampelomyces*, *Candida* o *Coniothyrium*. Es posible utilizar 25 combinaciones de dos o más agentes de biocontrol conforme a la presente invención. En un aspecto preferido, el agente de biocontrol es *Trichoderma spp.*, y preferiblemente se selecciona de *T. harzianum*, *T. velutinum*, o combinaciones de los mismos.

30 La concentración de agente de biocontrol en el recubrimiento varía de acuerdo con factores como el tipo, propiedades y dimensiones de la semilla. El agente de biocontrol debe estar en una cantidad suficiente para proporcionar un efecto protector o promotor del crecimiento. UN aspecto preferible de la invención es utilizar de 10^5 a 10^{10} unidades formadoras de colonia (CFU) por gramo de peso de la semilla.

35 En otro aspecto preferible, el recubrimiento de semillas comprende además al menos un agente de fijación. El agente de fijación puede necesitarse para fijar el agente de biocontrol y

los conos de lúpulo a la superficie de la semilla. En la presente invención se puede utilizar cualquier tipo de agente de fijación siempre que no sea dañino para la semilla o el agente de biocontrol. Por esta razón, un aspecto muy preferible es un agente de fijación acuoso. En otro aspecto más preferible, el agente de fijación está presente en una cantidad de entre 0,5 y 90% en peso con base en el peso total del recubrimiento.

El agente de fijación se puede seleccionar de una sustancia seleccionada de melaza, azúcar granulada, alginatos, goma guar, goma arábica, goma xantana, goma karaya, mucílago, o combinaciones de los mismos. En otro aspecto, el agente de fijación puede además comprender acetatos de polivinilo, copolímeros de acetato de polivinilo, alcoholes polivinílicos, copolímeros de alcohol de polivinilo, celulosas, incluyendo etilcelulosas y metilcelulosas, celulosas hidroximetilo, hidroxipropilcelulosas, hidroximetilpropil-celulosas, polivinilpirrolidonas, dextrinas, maltodextrinas, polisacáridos, grasas, aceites, proteínas, gomas lacas, copolímeros de cloruro de vinilideno, copolímeros de cloruro de vinilideno, lignosulfonatos de calcio, copolímeros acrílicos, almidones, polivinilacrilatos, zeínas, gelatina, carboximetilcelulosa, quitosano, óxido de polietileno, polímeros y copolímeros de acrilamida, acrilato de polihidroxietilo, metilacrilimida, monómeros de etiloceno, alúmina, alginatos, poliácido de metilo, polímeros y copolímeros de acetato de vinilo, metilcelulosa, celulosa, polivinilpirrolidona, o combinaciones de los mismos.

En otro aspecto preferible, la composición de recubrimiento consiste en un agente de biocontrol y conos de lúpulo como fuente de hidratos de carbono. En otro aspecto más preferible, incluye además un agente de fijación.

Los conos de lúpulo presentan la ventaja técnica de proporcionar un mayor crecimiento del agente de biocontrol y, por tanto, de mejorar de las características de crecimiento de la semilla y proteger contra fitopatógenos, con respecto a la turba.

La presente invención es útil para mejorar las características de crecimiento de las semillas, promover la germinación y el desarrollo de la planta en los primeros estadios de crecimiento y proteger cultivos agrícolas frente a daños de enfermedades y plagas. Debido a que el recubrimiento y las semillas recubiertas conforme a la presente invención se pueden valer únicamente de agentes de biocontrol y lúpulo como sustrato, tienen la ventaja de que evita la utilización de compuestos de síntesis química.

Más aún, la invención aprovecha el potencial del lúpulo, pues la industria genera una cantidad importante de desechos de conos de lúpulo. De este modo, la presente invención representa una alternativa ecológica y sostenible para mejorar el crecimiento de las semillas y proteger los cultivos agrícolas.

5

En otro aspecto preferible más, el recubrimiento de la presente invención incluye un relleno de bentonita, caolín, arcilla, talco, perlita, sílices, polvo de cuarzo, montmorillonita, carbón activado, carbohidratos, almidones, harinas, tierra de diatomeas, o combinaciones de los mismos.

10

La presente invención también se refiere a una semilla recubierta con el recubrimiento de semillas descrito. Por tanto, otro aspecto preferible más es una semilla recubierta, cuyo recubrimiento comprende conos de lúpulo y al menos un agente de biocontrol.

15

La semilla de la presente invención puede ser cualquier semilla vegetal sin importar su forma o tamaño. Preferiblemente, la semilla en cuestión pertenece a una planta de interés agronómico, por ejemplo una planta hortícola como tomate, calabacín o pimiento; una planta forrajera como alfalfa o trébol; un cereal como avena, maíz o trigo; una leguminosa como soja, judía, guisante o altramuza, una planta oleaginosa como colza o girasol, una planta de aprovechamiento industrial como algodón, remolacha o tabaco, o de cualquier planta ornamental o silvestre.

20

En otro aspecto preferible, la semilla a recubrir tiene un tamaño de 1 a 20 mm. En otro aspecto más, es una semilla pequeña, con un tamaño menor a 3 mm, tal como una semilla de brócoli, colza o alfalfa. En otro aspecto más, la semilla a recubrir es una semilla mediana, que tiene un tamaño de 3 mm hasta 10 mm, tal como una semilla de lenteja o trigo. En otro aspecto más, es una semilla grande, con un tamaño mayor que 10 mm, tal como una semilla de maíz, judía, garbanzo, girasol o melón.

25

30

Un aspecto preferible de la presente invención es una semilla recubierta en al menos un 50% de su superficie, preferiblemente en al menos el 80% o en al menos el 90% de la superficie de las semillas, lo más preferible recubierta en el 100% de su superficie.

35

Otra realización preferible más es un método de recubrimiento de una semilla con el recubrimiento de la invención. Para recubrir la semilla es necesario poner en contacto los componentes del recubrimiento de semillas con la superficie de la semilla. Para fijar el agente

de biocontrol y los conos de lúpulo a la superficie de la semilla puede necesitarse un agente de fijación. La puesta en contacto de cada uno de los componentes del recubrimiento de semillas, incluyendo lúpulo, agente de biocontrol, y, en su caso, agente de fijación y/o cualquier otro componente opcional o adicional, puede ocurrir simultánea o secuencialmente.

5

En un aspecto preferible más, el recubrimiento de las semillas se realiza en una sola etapa, poniéndola en contacto con una mezcla de todos los componentes del recubrimiento de la invención. También es posible añadir secuencialmente los componentes del recubrimiento hasta formar la semilla recubierta de la presente invención. Por ejemplo, tratándose de un recubrimiento de la invención que utiliza agente de fijación, el método puede realizarse en dos etapas: primero, se pone en contacto con la superficie de las semillas una mezcla de agente de fijación y ya sea el agente de biocontrol o los conos de lúpulo; y posteriormente, se pone en contacto la semilla con el componente restante. En un aspecto adicional, la puesta en contacto se acompaña de agitación mecánica con el fin de mejorar la eficiencia y/o velocidad del recubrimiento.

15

El método de la presente invención puede comprender, además, una etapa de secado de la semilla recubierta, con el fin de promover o acelerar la fijación del recubrimiento y la manipulación de las semillas recubiertas.

20

El recubrimiento de las semillas puede llevarse a cabo en cualquier aparato adecuado para el tratamiento de las mismas, incluyendo en una mezcladora concreta o un tambor rotatorio o lecho fluidizado. El recubrimiento se puede realizar por lotes o en un proceso continuo.

25 **Ejemplos**

Ejemplo 1: Desarrollo de aislamientos del agente de biocontrol *Trichoderma spp.* en restos de cosecha de lúpulo.

Se estudió el efecto que tienen los restos de cosecha de lúpulo en el desarrollo de un agente de biocontrol de la especie *Trichoderma spp.* Para ello se emplearon dos aislamientos de *T. harzianum* y uno de *T. velutinum* que han demostrado su capacidad de biocontrol. que se identificaron con los nombres de *T. harzianum* T019, *T. harzianum* T059 y *T. velutinum* T029. Como sustratos, se utilizó hojas y conos de lúpulo.

30

Se molieron todos los sustratos hasta obtener un tamaño de partícula inferior a 500 µm, y se esterilizaron en autoclave a 121°C durante 20 min para eliminar cualquier organismo que pudieran tener. En placas Petri de 60 mm de diámetro se pesaron 5 g de cada sustrato. Se

35

añadieron 5 ml de agua destilada autoclavada a 121°C 20 min. Se preparó una solución de esporas de *T. harzianum* y otra de *T. velutinum*, cada una con una concentración de 2×10^7 esporas/ml y se añadió 1 ml de esa solución a cada placa Petri. Se sellaron las placas con Parafilm y se incubaron durante 15 días a 25 °C. Se hicieron 3 repeticiones por tratamiento.

5 Trascurrido este periodo se conservaron a -80°C hasta su procesado.

Para la obtención de la cantidad de *Trichoderma* desarrollado en los sustratos se extrajo el ADN de cada placa con FavorPrep Soil DNA Isolation Kit (Favorgen Biotech Corporation) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se realizó qPCR de cada extracción usando Step One Plus™ (Applied Biosystems, Foster City, CA). Se empleó el gen α -actina como referencia para el análisis.

Tabla 1. Concentración de ADN obtenida en los distintos sustratos.

Sustrato	Concentración ADN ($\mu\text{g}/\text{ml}$)		
	<i>T. harzianum</i> T019	<i>T. harzianum</i> T059	<i>T. velutinum</i> T029
Restos de hojas	5,274	10,947	0,003
Conos o flores	3.358,989	73,386	2,492

15 Los resultados, mostrados en la Tabla 1, muestran que los conos de lúpulo en donde ha estado desarrollándose los aislamientos de *Trichoderma* es mucho mayor en conos de lúpulo que en restos de hojas. Con estos resultados se demuestra que los conos de lúpulo promueven el desarrollo de los agentes de biocontrol.

20 **Ejemplo 2: Desarrollo de aislamientos del agente de biocontrol *Trichoderma spp.* en turba**

Se cultivó *Trichoderma* bajo las mismas condiciones del Ejemplo 1, pero utilizando turba y turba con harina de maíz como sustratos. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

25 Tabla 2. Concentración de ADN obtenida en turba y turba con harina de maíz.

Sustrato	Concentración de ADN ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
	<i>Trichoderma</i> T019
Turba	90,14
Turba + harina de maíz	29,23

En consecuencia, el uso de conos o flores de lúpulo para el desarrollo de *Trichoderma* spp. ha sido muy superior en comparación con la turba o la turba con harina de maíz.

5 **Ejemplo 3: Efecto del pildorado de semillas con lúpulo en la germinación**

Se emplearon distintos tipos de semillas para la evaluación del pildorado. Se pretendió comprobar el efecto del pildorado realizado antes de la siembra en la germinación. Por ello se evaluaron semillas de distintas formas y tamaños:

- 10 - Semillas pequeñas, < 3 mm: brócoli, colza, alfalfa
- Semillas medianas, 3 – 10 mm: lenteja, trigo
- Semillas grandes, > 10 mm: maíz, judía, garbanzo, girasol, melón

Se realizó una prueba de germinación en el laboratorio. Las semillas se desinfectaron con un ciclo de limpieza de 20 minutos en solución de hipoclorito de sodio al 10% y 3 lavados en agua destilada autoclavada para destruir los patógenos presentes en la cubierta de la semilla y evitar el crecimiento de hongos. Las semillas se dejaron secar en campana de flujo laminar durante 20 min.

20 Posteriormente se realizó el pildorado siguiendo el siguiente procedimiento: 1) las semillas a recubrir se colocaron en un aparato adecuado para el recubrimiento de semillas; 2) se añadió un porcentaje del peso de las semillas de un agente de fijación, que incluye goma arábiga; 3) se agitó hasta que las semillas quedaron recubiertas; 4) se añadió un porcentaje del peso de las semillas del polvo de conos de lúpulo, *H. lupulus*; 5) se agitó hasta que las semillas
25 quedaron recubiertas.

Para semillas pequeñas (< 3 mm), se utilizó 60 % de *S. muticum* y 30% de agente de fijación del peso de semillas. Para semillas medianas (3-10 mm), 20 % de *S. muticum* y 15% de agente de fijación del peso de semillas. Para semillas grandes (> 10 mm), 7% de *S. muticum*
30 y 3% de agente de fijación del peso de semillas.

Posteriormente, se recogieron las semillas y se dejaron secar para su manipulación. Como control, se utilizó la semilla sin pildorar.

35 Se realizaron 3 repeticiones de 10 semillas para melón y 20 semillas para el resto, de tamaño similar sin daño observable, que se distribuyeron homogéneamente en placas de Petri (80-

100 mm de diámetro en función del tamaño de la semilla) sobre dos papeles de filtro añadiendo 1-15 ml de agua destilada autoclavada según el tipo de semilla. Las placas se sellaron con Parafilm para evitar pérdidas de humedad y se mantuvieron en la oscuridad durante 12 días a 22 ± 1 °C, revisando la germinación diariamente.

- 5 Se consideró que las semillas estaban germinadas cuando las radículas tenían más de 3 mm. Se tomaron los datos de germinación de la semilla (porcentaje del número de semillas agregadas), la longitud de la raíz de las plántulas emergidas, así como el peso fresco de las radículas emergidas se midió cuando se había alcanzado el 95 % de las semillas germinadas o bien durante 3 días consecutivos no se habían producido nuevas germinaciones. También
- 10 se calcularon los siguientes índices:

$$(1) \text{ Germinación relativa (\%)} = \frac{\text{Semillas germinadas (tratamiento)}}{\text{Semillas germinadas (control)}} \times 100$$

$$(2) \text{ Biomasa relativa (\%)} = \frac{\text{Peso fresco medio (tratamiento)}}{\text{Peso fresco medio (control)}} \times 100$$

$$(3) \text{ Longitud relativa raíz (\%)} = \frac{\text{Longitud media raíz (tratamiento)}}{\text{Longitud media raíz (control)}} \times 100$$

$$(4) \text{ Índice germinación} = \frac{\text{Germinación (Tratamiento)}}{\text{Germinación (control)}} \times \frac{\text{Longitud raíz (tratamiento)}}{\text{Longitud raíz (control)}} \times 100$$

Los resultados se muestran en la Tabla 3.

15 *Tabla 3. Germinación de las distintas semillas recubiertas con lúpulo y sus controles cuando han sido pildoradas y sembradas en el mismo día.*

Semilla	Germinación (%)	GR ¹ (%)	Biomasa (mg)	BR ² (%)	Longitud raíz (mm)	LRR ³ (%)	IG ⁴
Tamaño pequeño							
Alfalfa	C ⁵	58,33 ± 3,33 a		2,49 ± 0,14 a		24,72 ± 1,81	
	T ⁶	61,67 ± 10,93 a	105,71	2,86 ± 0,17 a	114,62	33,14 ± 2,82	134,05 141,71
Brócoli	C	65,00 ± 5,00 a		3,67 ± 0,23 b		36,73 ± 3,03	
	T	28,33 ± 3,33 b	43,59	9,89 ± 3,53 a	269,48	17,52 ± 2,93	47,70 43,59
Colza	C	90,00 ± 10,00 a		4,13 ± 0,24 a		54,79 ± 3,93	
	T	50,00 ± 2,89 b	55,56	4,03 ± 0,26 a	97,66	42,55 ± 4,07	77,65 55,56

Lenteja	C	88,33 ± 4,41 a		7,47 ± 0,13 a		13,60 ± 0,61		
	T	83,33 ± 7,26 a	94,34	7,41 ± 0,17 a	99,17	11,55 ± 0,54	84,94	94,34
						a		
						b		
Trigo	C	100,00 ± 0,00		7,29 ± 0,16 a		17,43 ± 0,63		
	T	96,67 ± 1,67 a	96,67	6,68 ± 0,16 b	91,64	14,91 ± 0,86	85,54	96,67
						a		
						b		
Tamaño grande								
Garbanzo	C	98,33 ± 1,67 a		74,84 ± 0,78		13,96 ± 0,67		
	T	76,67 ± 3,33 b	77,97	73,07 ± 0,77	97,64	5,23 ± 0,28 b	37,49	77,97
				a		a		
				a		b		
Girasol	C	95,00 ± 0,00 a		17,91 ± 0,32		21,16 ± 1,02		
	T	81,67 ± 6,01 a	85,96	17,71 ± 0,40	98,92	14,14 ± 1,27	66,82	85,96
				a		a		
				a		b		
Judía	C	98,33 ± 1,67 a		114,72 ± 2,63 a		43,07 ± 3,44		
	T	93,33 ± 3,33 a	94,92	113,72 ± 2,80 a	99,13	31,67 ± 2,59	73,53	94,92
				a		a		
				a		b		
Maíz	C	95,00 ± 0,00 a		48,80 ± 0,96		21,12 ± 1,40		
	T	90,00 ± 2,89 a	94,74	48,83 ± 1,13	100,07	17,15 ± 1,38	81,19	94,74
				a		a		
				a		b		
Melón	C	73,33 ± 14,53		12,68 ± 0,53		41,77 ± 4,50		
	T	40,00 ± 5,77 a	54,55	14,99 ± 0,66	118,19	58,39 ± 5,75	139,81	54,55
				b		b		
				a		a		

¹ Germinación relativa

² Biomasa relativa

³ Longitud relativa de la raíz

⁴ Índice de germinación

⁵ Control

⁶ Tratamiento con lúpulo

Observando los resultados, la germinación no fue inhibida en la mayoría de las semillas, a excepción de brócoli, colza y melón que hubo una menor germinación respecto al control. En cuanto a la producción de biomasa, ninguna semilla presentó una reducción, destacando el

brócoli en que el desarrollo fue mayor respecto al control. En cuanto a la longitud de la radícula, la aplicación del pildorado causó en algunas semillas que se incrementara como en el caso de la alfalfa y el melón. En cuanto al índice de germinación las semillas presentaron unos valores altos a excepción de brócoli y melón, que fueron bajos.

5

Con estos resultados se demuestra que los conos de lúpulo no resultan un agente inhibidor de la germinación de las semillas que han sido pildoradas y sembradas en el mismo día, llegando incluso a favorecerla en algunas de ellas.

10 **Ejemplo 4: Efecto del pildorado de semillas con polvo de conos de lúpulo en la germinación trascurrido un mes desde el pildorado**

Se emplearon distintos tipos de semillas para la evaluación del pildorado realizado con un mes de antelación a la siembra, teniendo en cuenta su forma y tamaño. Se pretendió comprobar el efecto del pildorado realizado mucho tiempo antes de la siembra por si pudiera endurecerse e impedir la germinación. Por ello se evaluaron semillas de la misma variedad
15 de tamaños usada en el Ejemplo 3.

Se realizó una prueba de germinación en el laboratorio. Las semillas se desinfectaron con un ciclo de limpieza de 20 minutos en solución de hipoclorito de sodio al 10% y 3 lavados en agua
20 destilada autoclavada para destruir los patógenos presentes en la cubierta de la semilla y evitar el crecimiento de hongos. Las semillas se dejaron secar en campana de flujo laminar durante 20 minutos. Posteriormente se realizó el pildorado siguiendo el procedimiento descrito en el Ejemplo 3.

25 Se realizaron 3 repeticiones de 10 semillas, de tamaño similar sin daño observable que se distribuyeron homogéneamente en placas de Petri (80-100 mm de diámetro en función del tamaño de la semilla) sobre dos papeles de filtro añadiendo 1-15 ml según el tipo de semillas agua destilada autoclavada. Las placas se sellaron con Parafilm para evitar pérdidas de humedad y se mantuvieron en la oscuridad durante 12 días a 22 ± 1 °C, comprobando la
30 germinación diariamente.

Se consideró que las semillas estaban germinadas cuando las radículas tenían más de 3 mm. Se tomaron los datos de germinación de la semilla (porcentaje del número de semillas agregadas), la longitud de la raíz de las plántulas emergidas, así como el peso fresco de las radículas emergidas se midió cuando se había alcanzado el 95 % de las semillas germinadas
35 o bien durante 3 días consecutivos no se habían producido nuevas germinaciones. También

se calcularon los índices de germinación relativa (%), biomasa relativa (%), longitud relativa raíz (%) e índice germinación (%) conforme se indica en el Ejemplo 3.

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4.

5 *Tabla 4: Germinación de las distintas semillas recubiertas con lúpulo y sus controles cuando han sido pildoradas y sembradas un mes tras el recubrimiento.*

Semilla		Germinación (%)	GR ¹ (%)	Biomasa (mg)	BR ² (%)	Longitud raíz (mm)	LRR ³ (%)	IG ⁴
Tamaño pequeño								
Alfalfa	C ⁵	36,67 ± 8,82 a	145,45	4,71 ± 0,69 a	67,25	45,94 ± 6,97 a	98,19	142,82
	T ⁶	53,33 ± 16,67 a		3,17 ± 0,36 b		45,11 ± 5,97 a		
Brócoli	C	73,33 ± 6,67 a	90,91	3,05 ± 0,37 a	82,32	28,44 ± 5,52 a	95,57	86,89
	T	66,67 ± 6,67 a		2,51 ± 0,35 a		27,18 ± 4,76 a		
Colza	C	63,33 ± 17,64 a	68,42	3,21 ± 0,37 a	87,05	56,98 ± 13,76 a	112,6	77,06
	T	43,33 ± 8,82 a		2,80 ± 0,46 a		64,17 ± 13,93 a		
Tamaño medio								
Lenteja	C	79,26 ± 0,74 a	113,55	10,73 ± 0,39 a	88,28	18,69 ± 1,45 a	71,10	80,73
	T	90,00 ± 10,00 a		9,47 ± 0,32 b		13,29 ± 1,00 b		
Trigo	C	93,33 ± 3,33 a	100,00	9,88 ± 0,41 a	93,73	22,97 ± 1,63 a	101,0	101,08
	T	93,33 ± 3,33 a		9,26 ± 0,31 a		23,22 ± 1,29 a		
Tamaño grande								
Garbanzo	C	83,33 ± 3,33 b	120,00	86,34 ± 1,90 a	94,42	14,44 ± 1,77 a	88,66	106,39
	T	100,00 ± 0,00 a		81,52 ± 1,24 b		12,80 ± 1,27 a		
Girasol	C	80,00 ± 10,00 a	66,67	34,14 ± 1,21 a	108,34	28,03 ± 2,57 a	135,7	90,53
	T	53,33 ± 12,02 a		36,99 ± 3,93 a		38,06 ± 6,13 a		
Judía	C	93,33 ± 3,33 a	85,71	113,64 ± 7,00 a	104,12	25,13 ± 3,41 a	82,13	70,39
	T	80,00 ± 0,00 b		118,32 ± 5,97 a		20,64 ± 2,40 a		
Maíz	C	100,00 ± 0,00 a	90,00	52,46 ± 1,27 a	104,12	29,91 ± 2,47 a	68,11	61,29
	T	90,00 ± 5,77 a		54,62 ± 1,55 a		20,37 ± 1,89 b		
Melón	C	20,00 ± 10,00 b	250,00	24,12 ± 0,91 a	74,77	28,74 ± 7,90 b	172,5	431,40
	T	50,00 ± 0,00 a		18,04 ± 1,05 b		49,59 ± 4,47 a		

¹ Germinación relativa

² Biomasa relativa

³ Longitud relativa de la raíz

⁴ Índice de germinación

⁵ Control

⁶ Tratamiento con lúpulo

Analizando la germinación, el pildorado con lúpulo no inhibió la germinación en las semillas de estudio, siendo favorecida significativamente en el caso del garbanzo y el melón. En cuanto

a la biomasa, fue algo inferior en algunas semillas como alfalfa, lenteja y melón, pero en el resto, no se produjo ninguna reducción de la misma. En el caso de la longitud de la raíz, las semillas no presentaron una disminución del desarrollo radicular, a excepción de lenteja, maíz y melón. En el caso del índice de germinación, cabe destacar la semilla de melón que se produjo un incremento notable en dicho valor.

Con estos resultados se demuestra que los conos de lúpulo no resultan un agente inhibidor del crecimiento de la planta a partir de semillas que han sido pildoradas y sembradas en el mismo día, llegando incluso a favorecerla en algunas de ellas.

Ejemplo 5: Efecto del pildorado de semillas con el agente de biocontrol *Trichoderma* y con polvo de conos de lúpulo en la germinación

Se emplearon distintos tipos de semillas para la evaluación del pildorado, teniendo en cuenta su forma y tamaño. Se pretendió comprobar el efecto del pildorado realizado antes de la siembra en la germinación. Por ello se evaluaron las siguientes semillas: semilla pequeña (< 3 mm): colza; semilla mediana 3 – 10 mm: trigo; semilla grande (>10 mm): judía.

Las semillas se desinfectaron con un ciclo de limpieza de 20 minutos en solución de hipoclorito de sodio al 10% y 3 lavados en agua destilada autoclavada para destruir los patógenos presentes en la cubierta de la semilla y evitar el crecimiento de hongos. Las semillas se dejaron secar en campana de flujo laminar durante 20 min. Posteriormente las semillas se impregnaron con una solución formada por 75 % v/v de agente de fijación y 25 % v/v solución de esporas de *Trichoderma* ($8 \cdot 10^7$ esporas/ml). Después fueron recubiertas con polvo de conos de lúpulo. Las semillas control no tenían recubrimiento.

Se realizaron 3 repeticiones de 10 semillas, de tamaño similar sin daño observable que se distribuyeron homogéneamente en macetas de polipropileno de 250 ml de capacidad con sustrato (80% turba rubia, 20% turba negra y pH 5.5). Se regaron cada maceta previamente a la siembra hasta que llegó a capacidad de campo. Se mantuvieron en cámara de cultivo a 22 ± 1 °C y se regaron cada 2 días con 25 ml de agua.

Se consideró que las semillas estaban germinadas cuando las radículas tenían más de 3 mm. Se tomaron los datos de germinación de la semilla (porcentaje del número de semillas agregadas), la longitud de la raíz de las plántulas emergidas, así como el peso fresco de las radículas emergidas se midió cuando se había alcanzado el 95 % de las semillas germinadas o bien durante 3 días consecutivos no se habían producido nuevas germinaciones. También

se calcularon los índices de germinación relativa (%), biomasa relativa (%), longitud relativa raíz (%) e índice de germinación, conforme se indica en el Ejemplo 2. Los resultados se muestran en la Tabla 5.

5 *Tabla 5. Germinación de las distintas semillas recubiertas con lúpulo y el agente de biocontrol.*

Semilla	Germinación	GR ¹ (%)	Biomasa (mg)	BR ² (%)	Longitud raíz	LRR ³ (%)	IG ⁴
Tamaño pequeño							
Colza	C	23,33 ± 3,33 a	34,76 ± 7,53 a	99,47	46,11 ± 9,00 a	64,86	176,0
	T ⁶	63,33 ± 17,64 a					
Trigo	C	23,33 ± 12,02 b	130,84 ± 12,55 b	159,4	100,43 ± 8,07 b	157,2	651,3
	T	96,67 ± 3,33 a	208,65 ± 9,99 a	7	157,89 ± 3,14 a	1	1
Judía	C	90,00 ± 10,00 a	1.990,51 ± 136,04 b	152,6	117,93 ± 8,19 b	137,0	142,1
	T	93,33 ± 3,33 a	3.037,73 ± 158,27 a	1	161,62 ± 4,20 a	4	2

¹ Germinación relativa

² Biomasa relativa

³ Longitud relativa raíz

⁴ Índice de germinación

⁵ Control

⁶ Tratamiento con restos de lúpulo y *Trichoderma* sp.

10 Observando los resultados del efecto del pildorado de semillas con el agente de biocontrol *Trichoderma* y lúpulo en las tres semillas de estudio, la germinación presentó unos valores muy altos en las tres semillas, destacando el trigo con un valor superior al 600 %, al igual que la producción de biomasa y en la longitud del sistema radicular.

Con estos resultados se demuestra que los conos de lúpulo en combinación con un agente de biocontrol favorecen el desarrollo de las semillas respecto al control.

REIVINDICACIONES

1. Un recubrimiento de semilla caracterizado por que comprende al menos un agente de biocontrol y conos de lúpulo como fuente de carbono.
5
2. El recubrimiento de semilla según la reivindicación 1, caracterizado por que dichos conos de lúpulo son conos de lúpulo en polvo.
3. El recubrimiento de semilla según la reivindicación 1 o 2, caracterizado por que dichos
10 conos de lúpulo están presentes en una cantidad del 5 al 99,5% en peso respecto al peso total del recubrimiento.
4. El recubrimiento de semilla según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que el al menos un agente de biocontrol es una bacteria o un hongo,
15 o mezclas de los mismos.
5. El recubrimiento de semilla según la reivindicación 4, caracterizado por que dicha bacteria se selecciona del grupo que consiste en *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Streptomyces* y *Bacillus*.
20
6. El recubrimiento de semilla según la reivindicación 4, caracterizado por que dicho hongo se selecciona del grupo que consiste en *Gliocladium*, *Trichoderma*, *Ampelomyces*, *Candida* y *Coniothyrium*.
7. El recubrimiento de semilla según la reivindicación 6, caracterizado por que dicho
25 hongo es *Trichoderma* spp.
8. El recubrimiento de semilla según la reivindicación 7, caracterizado por que dicho hongo es *T. harzianum* y/o *T. velutinum*.
30
9. El recubrimiento de semilla según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado por que el al menos un agente de biocontrol está presente en una cantidad de 10^5 a 10^{10} CFU por gramo de peso de la semilla.
- 35 10. El recubrimiento de semilla según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado por que comprende al menos un agente de fijación.

11. Una semilla caracterizada por que presenta un recubrimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
- 5 12. La semilla según la reivindicación 11, caracterizada porque dicho recubrimiento cubre al menos el 50%, o al menos el 80% o al menos el 90%, o el 100% de la superficie de dicha semilla.
- 10 13. La semilla según la reivindicación 11 o 12, caracterizada por que dicha semilla es de una planta seleccionada del grupo que consiste en brócoli, colza, alfalfa, lenteja, trigo, maíz, judía, garbanzo, girasol, melón, tomate, calabacín, pimiento, trébol, avena, soja, guisante, altramuza, algodón, remolacha y tabaco.
- 15 14. Un método de recubrimiento de una semilla, caracterizado porque comprende poner en contacto conos de lúpulo y al menos un agente de biocontrol con la superficie de dicha semilla.
- 20 15. El método según la reivindicación 14, caracterizado porque dichos conos de lúpulo y dicho al menos un agente de biocontrol se ponen en contacto con la superficie de la semilla de forma secuencial.

20