

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 500 790**

21 Número de solicitud: 201431313

51 Int. Cl.:

C12N 1/14 (2006.01)

A01N 63/04 (2006.01)

C12R 1/645 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

11.09.2014

43 Fecha de publicación de la solicitud:

30.09.2014

71 Solicitantes:

UNIVERSIDAD DE ALICANTE (100.0%)

Carretera San Vicente del Raspeig, s/n

03690 San Vicente del Raspeig (Alicante) ES

72 Inventor/es:

LÓPEZ LLORCA, Luis Vicente;

ZAVALA GONZÁLEZ, Ernesto A. y

RAMÍREZ LEPE, Mario

54 Título: **Uso de Pochonia chlamydosporia para promover la floración y fructificación en cultivos**

57 Resumen:

La presente invención se refiere al uso del hongo endófito *Pochonia chlamydosporia* para disminuir los tiempos de floración y fructificación y aumentar el rendimiento de los cultivos.

ES 2 500 790 A1

USO *POCHONIA CHLAMYDOSPORIA* PARA PROMOVER LA FLORACIÓN Y FRUCTIFICACIÓN EN CULTIVOS

DESCRIPCIÓN

5 Uso de *Pochonia Chlamydosporia* para promover la floración y fructificación en cultivos.

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se encuadra, en el campo de la horticultura y agronomía en general, y en particular, se refiere al uso de un hongo endófito capaz de reducir el tiempo de floración y
10 fructificación de los cultivos, aumentando así su rendimiento.

ESTADO DE LA TÉCNICA

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) originario de América del Sur, se ha convertido en la hortaliza más difundida en todo el mundo y la de mayor valor económico. Su demanda aumenta
15 continuamente y con ella, su cultivo, producción y comercio.

El cultivo de tomate es de gran importancia debido a que gracias a los sistemas de producción bajo invernadero, es posible tener cosecha durante todo el año. Sin embargo, estos rendimientos sólo pueden ser alcanzados empleando grandes cantidades de agroquímicos,
20 entre los cuales se deben destacar los fertilizantes, que representan un 25% de los costes totales de producción. El cultivo de tomate requiere una fertilización nitrogenada de 300-800 kg/ha, fósforo 400-800 kg/ha y de potasio 600-1,100 kg/ha. Estos elevados consumos se deben, en gran parte, a la baja eficiencia de los fertilizantes utilizados, que está directamente relacionada con las características químicas y biológicas del suelo.

25 Los principales problemas a los que se enfrenta la producción de tomate en el mundo, son problemas nutricionales, y numerosas plagas y enfermedades causadas respectivamente por insectos, hongos, virus, bacterias y nematodos. Para hacer frente a estos problemas se utilizan

numerosos productos fitosanitarios que incrementan los costes de producción debido a su elevado coste.

Los nematodos agalladores (*Meloidogyne spp.*) son un problema de primera magnitud en el cultivo del tomate, que origina enormes pérdidas económicas. Se han utilizado diversas medidas de control en áreas infestadas con nematodos. El método tradicional es el uso de nematicidas químicos, sin embargo, el gran impacto ambiental negativo y la ineffectividad debido a su uso prolongado han restringido su utilización y ha surgido la necesidad de crear alternativas más seguras y efectivas. Entre estas alternativas, destaca el control biológico, que el USDA (United States Department of Agriculture) define como “el uso o manejo de enemigos naturales nativos, introducidos o modificados genéticamente (depredadores, parásitos, parasitoides y patógenos de plagas), y sus productos, para reducir las poblaciones y los efectos de las plagas/enfermedades”.

Pochonia chlamydosporia (de aquí en adelante *P. chlamydosporia*) es un hongo parásito de huevos de nematodos que también tiene la capacidad de colonizar tejidos epidérmicos y corticales de la raíz de cultivos, con elevado interés económico, como el tomate y la cebada (Macia-Vicente, et al. (2009a) Real- time PCR quantification and live-cell imaging of endophytic colonization of barley (*Hordeum vulgare*) roots by *Fusarium equiseti* and *Pochonia chlamydosporia*. New Phytologist. 182(1): 213-228). Esta capacidad de colonización radicular se ha sugerido como un prerrequisito importante para un buen agente de control biológico de enfermedades radiculares.

Se ha comprobado además que la colonización endofítica de las raíces por parte de *P. chlamydosporia* conlleva una serie de beneficios para la planta huésped, tales como promoción del crecimiento o protección frente a patógenos fúngicos y nematodos (Macia-Vicente, J.G., Rosso L.C., Ciancio. A., Jansson, H.B., y Lopez-Llorca, L.V. (2009b) Colonisation of barley roots by endophytic *Fusarium equiseti* and *Pochonia chlamydosporia*: Effects on plant growth and disease. Annals of Applied Biology 155 (3): 391-401).

Posteriormente se ha comprobado que *P. chlamydosporia* puede desarrollar interacciones mutualistas con la planta huésped, generándole beneficios como protección frente a patógenos fúngicos y promoción del crecimiento de la parte aérea y radicular en plantas de cebada (Rosso, L. C., Colagiero, M., Salatino, N., y Ciancio, A. (2014). Observations on the effect of trophic conditions on *Pochonia chlamydosporia* gene expression. *Annals of Applied Biology*, 164(2), 232-243).

Algunos aislados de *P. chlamydosporia* capaces de parasitar huevos del nematodo fitopatógeno *Rotylenchulus reniformis* in vitro, son también capaces de disminuir el número de *R. reniformis* y de incrementar el peso aéreo y radicular de plantas de algodón en condiciones de invernadero (Wang, K., et al. (2005). Isolation, selection, and efficacy of *Pochonia chlamydosporia* for control of *Rotylenchulus reniformis* on cotton. *Phytopathology*, 95(8), 890-893).

La inoculación con *P. chlamydosporia* en suelos provocó un incremento en los parámetros vegetativos (peso fresco aéreo) de lechuga (*Lactuca sativa* L.) en áreas de baja fertilidad infectadas con el nematodo agallador *M. incognita* (Dias-Arieira *et al*, (2011). Efficiency of *Pochonia chlamydosporia* in *Meloidogyne incognita* control in lettuce crop (*Lactuca sativa* L.). *Journal of Food, Agriculture and Environment*, 9(3-4), 561-563).

En estudios realizados por Escudero y López-Llorca, (2012) Effects on plant growth and root-knot nematode infection of an endophytic GFP transformant of the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia*. *Symbiosis*, 57(1), 33-42 en sistema de cepellón se comprobó que un transformante del hongo *P. chlamydosporia* con la proteína verde fluorescente (GFP) fue capaz de promover el crecimiento de la parte aérea y radicular de plantas de tomate a los 21 días de la inoculación radicular con el hongo. Gracias a ello se consiguió mayor tolerancia al nematodo agallador *M. javanica*.

P. chlamydosporia aumentó significativamente los parámetros de crecimiento (longitud aérea y radicular) de plantas de okra (*Abelmoschus esculentus*) infectadas con el nematodo agallador *M. incognita*, de igual forma redujo la presencia de agallas, masas de huevos y juveniles del

nematodo en la raíz (Mukhtar *et al*, 2013 Biocontrol potential of *Pasteuria penetrans*, *Pochonia chlamydosporia*, *Paecilomyces lilacinus* and *Trichoderma harzianum* against *Meloidogyne incognita* in okra. *Phytopathologia Mediterranea*, 52(1), 66-76.).

- 5 Viggiano *et al*, (2014) Use of *Pochonia chlamydosporia* to control *Meloidogyne javanica* in cucumber. *Biological Control*, 69, 72-77 evaluaron el efecto de un bionematicida basado en *P. chlamydosporia*, para el control de *M. javanica*, demostrando que la aplicación de dicho producto (Pc-10) en los suelos redujo el número de huevos de *M. javanica*/g de raíz y aumento el peso fresco de las raíces de calabacín (*Cucumis sativus* L.).

10 Un experimento utilizando los agentes de control biológico *Pseudomonas fluorescens*, *Trichoderma viride* y *P. chlamydosporia* fue el realizado por Deepa y col, (2011) en cultivos de *Citrus limonia* L. (limón), encontrando que dichos agentes de control redujeron la población del nematodo *Tylenchulus semipenetrans*, y fueron capaces de incrementar el rendimiento del
15 cultivo respecto al control.

Chaya y col, (2012) Bio-management of *Meloidogyne incognita* on okra using a formulation of *Pochonia chlamydosporia*. *Pest Management in Horticultural ecosystems*, 18 (1), 84-87, realizaron experimentos de campo para evaluar la eficacia de una formulación de Vermicompost (humus de lombriz) enriquecido con *P. chlamydosporia* para el control de *M. incognita* en el
20 cultivo de *Abelmoschus esculentus* (Okra). Sus resultados indican que existe una reducción de la población del nematodo al aplicar 50g/m² del tratamiento, así como un incremento en el rendimiento del cultivo comparado con plantas infectadas con *M. incognita*. A través de estas investigaciones, se pudo estandarizar una estrategia para el control del nematodo en cultivos de
25 okra.

Como se ha comprobado en los antecedentes expuestos, el término promoción de crecimiento se refiere a un aumento en el desarrollo vegetativo, (peso fresco aéreo y longitud aérea) y radicular (peso fresco radicular y longitud radicular) de los cultivos.

30

Todos los estudios realizados en campo e invernaderos, están basados en la comparación de tratamientos con *P. chlamydosporia* obteniéndose resultados favorables en la reducción de una gran variedad de nematodos en diferentes cultivos de interés económico, así como un aumento en el rendimiento de éstos comparando con cultivos infectados por dichos nematodos sin la aplicación de tratamiento, sin embargo en ningún estudio se determina el efecto de *P. chlamydosporia* sobre los parámetros de desarrollo de dichos cultivos.

Sería interesante proporcionar un agente biológico para el control biológico que además proporcionara un efecto positivo en el desarrollo de los cultivos evitando de tal forma el uso de compuestos químicos que son perjudiciales para el medio ambiente.

10

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención proporciona la solución a los problemas anteriormente expuestos ya que se refiere al uso del hongo *P. chlamydosporia* para promover el crecimiento y disminuir los tiempos de floración y fructificación, aumentando de esta manera el rendimiento del cultivo.

15 Presentando las siguientes ventajas:

- i. Disminución en el uso de compuestos agroquímicos (fertilizantes, nematicidas y fumigantes) cuya producción o uso afecta al medio ambiente.
- ii. El control de nematodos patógenos de plantas.
- iii. El control de algunos hongos fitopatógenos.
- iv. Disminución en costos de cultivo por la reducción del uso de fertilizantes, nematicidas y fumigantes y fitoestimulantes (hormonas y otros).

20

Así pues en un primer aspecto, la presente invención se refiere al uso de *P. chlamydosporia* para el control de la floración y fructificación de cultivos.

25 En una realización particular, el control de la floración se realiza mediante inducción de la floración del cultivo.

En la presente invención por inducción de la floración del cultivo se entiende como una disminución del tiempo de floración, considerando como tiempo de floración a aquel en el que el 50% de las plantas poseen al menos una flor.

En otra realización particular, el control de la fructificación se realiza mediante la inducción de la fructificación del cultivo.

En la presente invención por inducción de la fructificación del cultivo se entiende como una disminución del tiempo de fructificación, considerando como tiempo de fructificación a aquel en el que el 50% de las plantas poseen al menos un fruto.

En otra realización particular de la presente invención, el control de la fructificación implica un aumento en el tamaño de los frutos del cultivo.

En una realización particular de la presente invención, el cultivo es un cultivo de tomates, cereales, leguminosas.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento para el control de la floración y fructificación de cultivos (de aquí en adelante procedimiento de la presente invención) que comprende al menos una etapa de inoculación de plántulas de dicho cultivo con *Pochonia chlamydosporia*. Más en particular, las plantas se inoculan con conidios y/o clamidosporas. Más en particular, la inoculación comprende entre 2000-6000 clamidosporas o conidios de *Pochonia chlamydosporia*.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Fig. 1. Muestra el efecto en el tiempo de floración en plantas inoculadas con *P. chlamydosporia*. El tiempo de floración fue significativamente menor (ANOVA, $P < 0.05$) en las plantas tratadas con el hongo *P. chlamydosporia*, (aislado Pc75) respecto a las plantas control (no tratadas). Las diferencias se muestran marcadas con un (*). El tiempo de floración se define como aquel en el que el 50% de las plantas poseen al menos una flor.

Fig.2 Muestra el efecto en el tiempo de fructificación en plantas inoculadas con *P. chlamydosporia*. El tiempo de fructificación fue significativamente menor (Kruskal wallis, $P < 0.05$) en las plantas tratadas con el hongo *P. chlamydosporia*, (aislados Pc64 y Pc75) respecto a las plantas control (no tratadas). Las diferencias se muestran marcadas con (*). El tiempo de fructificación se define como aquel en el que el 50% de las plantas poseen al menos un fruto.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Para la realización de los experimentos se utilizaron los aislados mencionados en la tabla 1 que muestra el origen de los aislados de *P. chlamydosporia*, una descripción detallada del nombre asignado a los diferentes aislados, el huésped del que ha sido aislado y el origen del huésped

Tabla 1. Origen de las cepas de *P. chlamydosporia*.

Aislado	Huésped	Origen
Pc64	<i>Huevos de Meloidogyne spp.</i>	España (Tarragona)
Pc75	<i>Huevos de Heterodera schachtii.</i>	España (Valladolid)
Pc123	<i>Huevos de Heterodera avenae.</i>	España (Sevilla)

El aislado de *P. chlamydosporia* 123 (Pc123), procedente de Sevilla, aislado de *Heterodera avenae* perteneciente a la colección de hongos del laboratorio de Fitopatología, Departamento de Ciencias del Mar y Biología Aplicada, Universidad de Alicante y depositado en la Colección Americana de Cultivos tipo (ATCC) con la referencia MYA-4875.

El aislado *P. chlamydosporia* Cepa *Metacordyceps chlamydosporia* Pc64, procedente de Tarragona, aislado de *Meloidogyne spp* y depositado en la Colección Española de Cultivos tipo CECT el 17/07/2014 con el número de acceso CECT 20915.

El aislado *P. chlamydosporia* Cepa *Metacordyceps chlamydosporia* Pc75, procedente de Valladolid, aislado de *Heterodera schachtii*, y depositado en la Colección Española de Cultivos tipo CECT el 17/07/2014 con el número de acceso CECT 20916.

- 5 Los aislados de *P. chlamydosporia* se cultivaron en placas de Petri con medio de cultivo agar extracto de maíz (CMA) a una temperatura de 25°C y resembrados cada 30 días. Transcurrido este tiempo los conidios y clamidosporas, fueron removidos y cuantificados en una cámara de Neubauer hasta ajustar a la concentración adecuada.
- 10 Se esterilizaron superficialmente semillas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) cv. Marglobe con una solución de hipoclorito de sodio al 1%, durante 5 min. A continuación, las semillas se lavaron 3 veces con agua destilada estéril durante 1 min/lavado y finalmente se dejaron secar en una campana de flujo laminar. Las semillas esterilizadas superficialmente se sembraron en placas de Petri con medio germinador (1% de glucosa, 0.01% de extracto de levadura, 0.01%
15 de peptona y 1.5% de agar técnico), se incubaron en obscuridad durante 3 días y en fotoperiodo (16/8 horas de luz/oscuridad respectivamente) durante 7 días. Transcurrido este tiempo las plántulas (30 plántulas por aislado de *Pochonia* o control) se dispusieron individualmente en contenedores estériles de 100 ml con 70 cm³ de arena estéril en una cámara de cultivo a 25 °C y el mismo fotoperiodo durante 21 días.
- 20 Cada lote de plantas se inoculó al inicio del experimento con 4 cilindros de 5 mm de diámetro del borde de una colonia de un aislado de *P. chlamydosporia* crecido en CMA durante 21 días, y las plantas control se dejaron sin inóculo. Posteriormente se trasplantaron a macetas de 4.5 L conteniendo arena no estéril a la que se añadieron 30 g de fertilizante NPK. Cada planta tratada
25 con *P. chlamydosporia* fue re-inoculada con 5000 clamidosporas o conidios/g de sustrato del mismo aislado de *P. chlamydosporia*, las plantas se re-inocularon a los 30 días con la misma cantidad de clamidosporas. Las plantas se cultivaron en invernadero a una temperatura de 15 °C durante la noche y 30°C durante el día, con humedad relativa del 60%.

El rendimiento de cultivo se estimó midiendo el tiempo de floración y fructificación, finalmente a los 150 días del inicio del experimento se cuantificaron el número de frutos en los diferentes estadios de desarrollo (E1:0-15 mm, E2: 16-30mm, E3: 31-45mm, E4: >45mm de diámetro, E5: frutos maduros) y su peso por planta, Este ensayo se repitió 2 veces obteniéndose resultados similares en ambas réplicas.

Los datos del ensayo mostrados en la figura 1, demuestran que el tiempo de floración fue significativamente menor en las plantas tratadas con el hongo *P. chlamydosporia*, (Pc75) respecto a las plantas control (no tratadas).

En cuanto al efecto de la inoculación con *P. chlamydosporia* sobre el tiempo de fructificación, como muestra la figura 2, fue significativamente menor en las plantas tratadas con el hongo *P. chlamydosporia*, (Pc64, Pc75) respecto a las plantas control (no tratadas). Por otro lado y tal y como muestra la tabla 2, los datos demostraron que el peso de frutos por planta fue mayor en las plantas tratadas con los hongos Pc64, Pc75. Estos resultados concuerdan con el estadio de desarrollo de frutos, en donde se observó que las plantas tratadas con estos hongos mostraron mayor cantidad de frutos en el estadio 4 (>45mm de diámetro) y las plantas tratadas con el hongo Pc64 presentó mayor cantidad de frutos maduros que las plantas control.

La tabla 2 muestra el rendimiento de frutos y el estadio de desarrollo de los frutos por planta. Se observa que el peso de frutos es mayor en las plantas tratadas con los hongos Pc64, Pc75 y Pc123 respecto al control (plantas sin inoculo). Estos resultados concuerdan con el estadio de desarrollo de frutos, en donde se observan diferencias significativas en los frutos en estadio 4 (>45mm de diámetro) en las plantas tratadas con los aislados Pc64 y Pc69. Adicionalmente las plantas inoculadas con la cepa Pc64 presentaron diferencias significativas respecto al control en el número de frutos maduros por planta a los 150 días.

Tabla 2. Rendimiento de plantas de tomate inoculadas con *Pochonia chlamydosporia* durante 150 días en condiciones de invernadero.

Tratamiento	E4	E5	Frutos/planta	Peso de frutos/planta	Peso de frutos maduros/planta
Control	4.2±2.30	3.9±2.7	15±6.8	370±98	164.3±109
Pc64	10.5±3.9*	8.3±4.2*	18±7.0	489±163	305.6±114
Pc75	9.3±4.60*	6.4±4.1	20±4.3	474±160	266.3±165
Pc123	5.3±2.40	2.8±1.3	18±7.2	330±134	145.7±54

E4: frutos en estadio 4 (diámetro > 45mm); E5: frutos maduros. Los números seguidos por (*) en la misma columna presentan diferencias significativas respecto al control (plantas no inoculadas) con una prueba (Wilcoxon test, $P < 0.05$).

5

REIVINDICACIONES

1. Uso de *Pochonia chlamydosporia* para el control de la floración y fructificación de cultivos.
2. Uso según la reivindicación 1, donde el control de la floración se realiza mediante inducción de la floración del cultivo.
3. Uso según la reivindicación 1, donde el control de la fructificación se realiza mediante la inducción de la fructificación del cultivo.
4. Uso según la reivindicación 1, donde el control de la fructificación implica un aumento en el tamaño de los frutos del cultivo.
5. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el cultivo es un cultivo de tomates, cereales, leguminosas.
6. Procedimiento para el control de la floración y fructificación de cultivos caracterizado por que comprende al menos una etapa de inoculación de plántulas de dicho cultivo con *Pochonia chlamydosporia*.
7. Procedimiento según la reivindicación 6, donde la inoculación comprende entre 2000-6000 clamidosporas o conidios de *Pochonia chlamydosporia*.

FIG.1

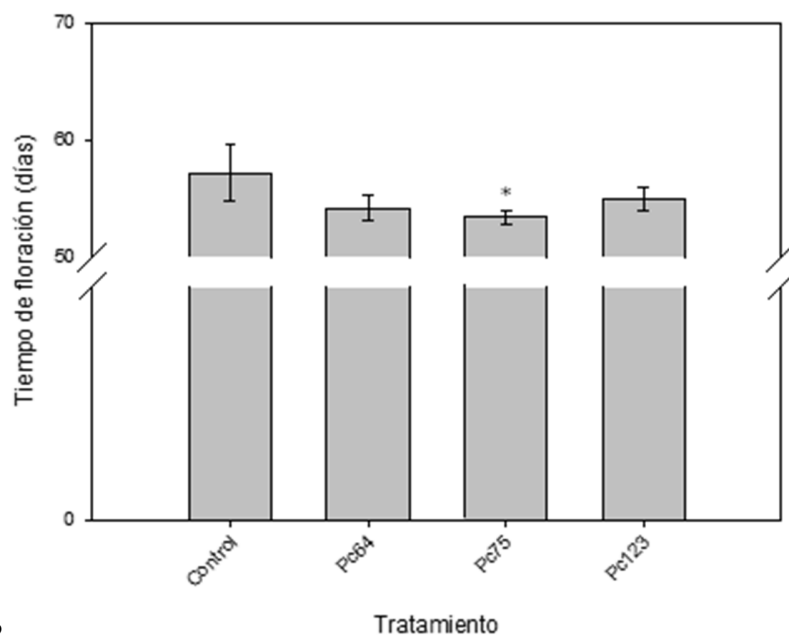
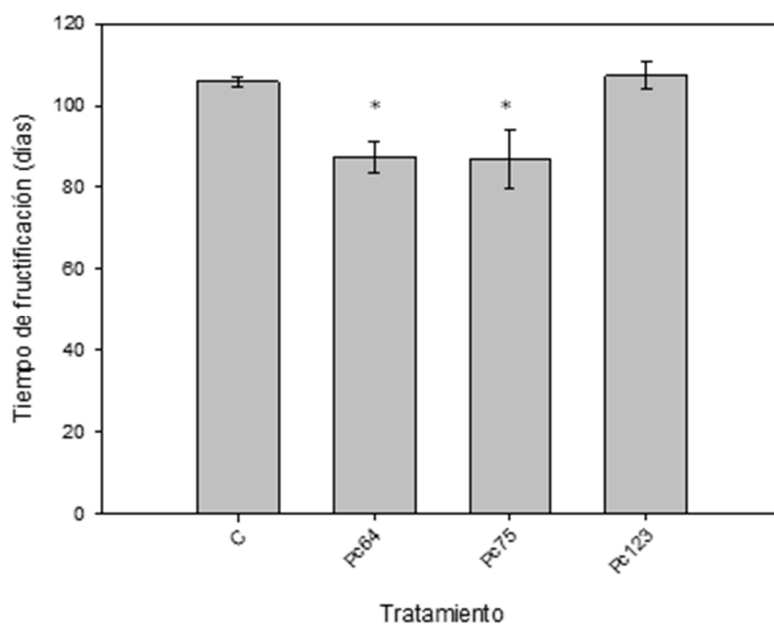


FIG.2





- ②① N.º solicitud: 201431313
②② Fecha de presentación de la solicitud: 11.09.2014
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	MACIA-VICENTE J G et al. Colonisation of barley roots by endophytic <i>Fusarium equiseti</i> and <i>Pochonia chlamydosporia</i> : Effects on plant growth and disease. <i>Annals of Applied Biology</i> . 2009. VOL: 155 No: 3 Págs: 391-401 ISSN 0003-4746 Doi: doi:10.1111/j.1744-7348.2009.00352.x, resumen.	1-7
A	DALLEMOLE-GIARETTA ROSANGELA et al. Screening of <i>Pochonia chlamydosporia</i> Brazilian isolates as biocontrol agents of <i>Meloidogyne javanica</i> . <i>Crop Protection</i> . 2012. VOL: 42 Págs: 102-107 ISSN 0261-2194(print) ISSN 1873-6904 (electronic) Doi: doi:10.1016/j.cropro.2012.06.002, resumen.	1-7
A	DALLEMOLE-GIARETTA ROSANGELA et al. Cover crops and <i>Pochonia chlamydosporia</i> for the control of <i>Meloidogyne javanica</i> . <i>Nematology</i> . 2011. VOL: 13 No: Part 8 Págs: 919-926 ISSN 1388-5545 Doi: doi:10.1163/138855411X563875, resumen.	1-7
A	WO 2005121314 A2 (UNIV EVORA et al.) 22.12.2005, reivindicaciones.	1-7

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
19.09.2014

Examinador
I. Rueda Molíns

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N1/14 (2006.01)

A01N63/04 (2006.01)

C12R1/645 (2006.01)

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

C05, C12N, A01N, C12R

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

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 19.09.2014

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-7	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-7	SI
	Reivindicaciones	NO

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

Base de la Opinión.-

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

1. Documentos considerados.-

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D02	MACIA-VICENTE J G et al. Colonisation of barley roots by endophytic <i>Fusarium equiseti</i> and <i>Pochonia chlamydosporia</i> : Effects on plant growth and disease. <i>Annals of Applied Biology</i> . VOL: 155 No: 3 Págs: 391-401 ISSN 0003-4746 Doi: doi:10.1111/j.1744-7348.2009.00352.x	2009
D03	DALLEMOLE-GIARETTA ROSANGELA et al. Screening of <i>Pochonia chlamydosporia</i> Brazilian isolates as biocontrol agents of <i>Meloidogyne javanica</i> . <i>Crop Protection</i> . VOL: 42 Págs: 102-107 ISSN 0261-2194 (print) ISSN 1873-6904 (electronic) Doi: doi:10.1016/j.cropro.2012.06.002	2012
D04	DALLEMOLE-GIARETTA ROSANGELA et al. Cover crops and <i>Pochonia chlamydosporia</i> for the control of <i>Meloidogyne javanica</i> . <i>Nematology</i> . VOL: 13 No: Part 8 Págs: 919-926 ISSN 1388-5545 Doi: doi:10.1163/138855411X563875	2011
D05	WO 2005121314 A2 (UNIV EVORA et al.)	22.12.2005

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA (artículos 6 y 8 de la LP11/1986)

En las reivindicaciones 1-5 de la solicitud de patente se reivindica el uso de *Pochonia chlamydosporia* para la inducción de la floración y de la fructificación de cultivos como los tomates, los cereales y las leguminosas.

En las reivindicaciones 6 y 7 de la solicitud de patente se reivindica un procedimiento para el control de la floración y fructificación de cultivos caracterizado por que comprende al menos una etapa de inoculación de plántulas de dicho cultivo con *Pochonia chlamydosporia*.

Los documentos D01-D04 divulgan como *Pochonia chlamydosporia* es un hongo parásito de huevos de nematodos, que coloniza las raíces de especies vegetales como la cebada y el tomate. También reflejan los citados documentos diferentes beneficios que confiere la colonización del hongo para la planta huésped, en ningún caso, de la información que muestra cualquiera de los documentos citados, se deduce que *Pochonia chlamydosporia* pudiera ser empleada con objeto de inducir floración y fructificación en los cultivos vegetales. Por tanto, las reivindicaciones 1-7 de la solicitud de patente presentan novedad y actividad inventiva, según lo establecido en los artículos 6 y 8 de la LP11/1986.