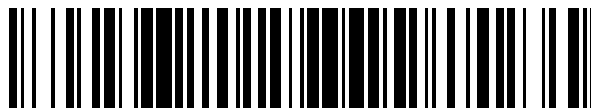


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 521 990**

21 Número de solicitud: 201431399

51 Int. Cl.:

C12N 1/14 (2006.01)

C12N 1/38 (2006.01)

A01N 63/04 (2006.01)

A01N 43/16 (2006.01)

A01P 5/00 (2006.01)

A01P 21/00 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

25.09.2014

43 Fecha de publicación de la solicitud:

13.11.2014

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;
ESCUADERO BENITO, Nuria y
LÓPEZ MOYA, Federico

54 Título: **Uso de quitosano para aumentar la formación de apresorios, el parasitismo de nematodos fitopatógenos y la colonización rizosférica por Pochonia chlamydosporia**

57 Resumen:

La presente invención se refiere al uso de quitosano para aumentar la formación de apresorios en *Pochonia chlamydosporia* y/o aumentar la patogenicidad de *Pochonia chlamydosporia* sobre huevos de nematodos. La presente invención también se refiere al uso de quitosano para aumentar la colonización de raíces de plantas por *Pochonia chlamydosporia* sin afectar al desarrollo de las mismas.

ES 2 521 990 A1

USO DE QUITOSANO PARA AUMENTAR LA FORMACIÓN DE APRESORIOS, EL PARASITISMO DE NEMATODOS FITOPATÓGENOS Y LA COLONIZACIÓN RIZOSFÉRICA POR *POCHONIA CHLAMYDOSPORIA*

5 DESCRIPCIÓN

CAMPO DE LA INVENCIÓN

10 La presente invención se encuadra en el campo de la horticultura y agronomía en general, y en particular, se refiere al uso de quitosano para incrementar la infección de nematodos fitopatógenos y la colonización rizosférica de cultivos mediante hongos agentes de control biológico.

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

15 El género de nematodos fitopatógenos más importante es *Meloidogyne* spp., ya que afecta seriamente tanto a la cantidad como a la calidad de las cosechas de numerosos cultivos agrícolas. Las cuatro especies principales de *Meloidogyne*: *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* y *M. hapla* causan pérdidas a nivel mundial en torno al 30%, aunque las pérdidas
20 agrícolas a nivel individual, en focos localizados, son mucho mayores.

La mayoría de cultivos agrícolas de importancia económica se ven afectados por al menos una especie de dicho género. El tomate es un buen huésped para los nematodos agalladores, se trata además del cultivo más ampliamente distribuido en la cuenca
25 mediterránea (Ornat y Sorribas, 2008).

Una de las especies más importantes de hongos parásitos de huevos de nematodos es *Pochonia chlamydosporia* (Goddard) Gams y Zare. Este hongo se ha estudiado como agente de control biológico contra nematodos debido a su amplia distribución mundial
30 infectando especies de nematodos fitopatógenos de importancia económica (como *Meloidogyne* spp.). Esta especie es común tanto en el suelo como en la rizosfera externa pero también tiene la capacidad de colonizar tejidos epidérmicos y corticales de la raíz de plantas, con interés económico, como el tomate y la cebada (Macia-Vicente, 2009a). Esta capacidad de colonización radicular se ha sugerido como un prerrequisito importante para
35 un buen agente de control biológico de enfermedades radiculares.

Por otro lado, se ha comprobado que la colonización endofítica de las raíces por *Pochonia chlamydosporia* (*P. chlamydosporia*) conlleva beneficios para la planta huésped, como la promoción del crecimiento o protección frente a patógenos radiculares (Macia-Vicente y col., 2009b). Todas estas características hacen de *P. chlamydosporia* una herramienta útil para el control de nematodos fitopatógenos en Agricultura Sostenible. Además su capacidad de colonización y establecimiento de forma endofítica en las raíces de cultivos podría suponer una ventaja para el hongo en los agroecosistemas facilitando su efecto antagonista frente a nematodos. El problema que presenta la aplicación de *P. chlamydosporia* en la rizosfera es la disminución de la colonización con el tiempo por la elevada tasa de crecimiento radicular respecto al crecimiento fúngico (Escudero & Lopez-Llorca, 2012).

Químicamente la quitina es un β -1,4-glucano formado por unidades de N-acetilglucosamina. La quitina forma parte de estructuras biológicas, como el exoesqueleto de invertebrados acuáticos (principalmente crustáceos y moluscos) y terrestres (insectos y nematodos). También se ha observado en la pared celular de algunas algas verdes, así como en la pared celular de las hifas de los hongos verdaderos. El quitosano se sintetiza en dichos organismos por desacetilación enzimática de la quitina mediante las quitín desacetilasas.

Además de por mecanismos biológicos se puede obtener quitosano por procesos químicos, sometiendo la quitina a un medio básico muy concentrado (elevado pH) e incubándola a temperaturas superiores a 60°C. El quitosano obtenido en estas condiciones es similar al producido en la naturaleza.

En la actualidad el quitosano es un compuesto con un enorme potencial, del que se han descubierto diferentes aplicaciones, logrando importantes avances tanto en medicina como en agricultura. El quitosano es un polímero policatiónico que interacciona con moléculas con carga negativa, aspecto importante en el tratamiento de vertidos de aguas residuales. El quitosano es un compuesto que presenta un gran potencial como agente antimicrobiano por su actividad bactericida y fungicida por desestabilizar las membranas en hongos fitopatógenos sensibles (Palma-Guerrero J., Lopez-Jimenez J.A., Pérez-Berná A.J., Huang I., Jansson H., Salinas J., Lopez-Llorca L.V., 2010. Membrane fluidity determines sensitivity of filamentous fungi to chitosan. *Mol Microbiol.* 75 (4), 1021-1032). Sin embargo el quitosano es compatible con hongos agentes de control biológico (Palma-Guerrero J., Jansson H-B., Salinas J., Lopez-Llorca L.V., 2008. Effect of chitosan on hyphal growth and spore germination of plant pathogenic and biocontrol fungi. *J. Appl. Microbiol.*, 104 (2), 541-553). En particular en los hongos nematófagos (incluyendo a *P. chlamydosporia*) y hongos

entomopatógenos el quitosano aumenta la esporulación.

Se hace necesario a la luz de lo anteriormente expuesto el aumentar la capacidad parasítica de Agentes de Control Biológico (como *P. chlamydosporia*) y su capacidad de colonizar raíces de cultivos huéspedes (como el tomate) de dichos nematodos fitopatógenos (del género *Meloidogyne* y otros).

EXPLICACIÓN DE LA INVENCION

La presente invención soluciona los problemas descritos anteriormente ya que se refiere al uso del quitosano para aumentar la patogenicidad contra nematodos y la colonización de raíces de cultivos por *P. chlamydosporia*.

Mediante la presente invención se facilita la aplicación de *P. chlamydosporia* favoreciendo su acción nematicida y promotora del crecimiento de cultivos en los agro-ecosistemas.

Así pues en un primer aspecto, la presente invención se refiere al uso de quitosano para aumentar la formación de apresorios en *P. chlamydosporia* y/o aumentar la patogenicidad de *P. chlamydosporia* sobre huevos de nematodos.

Por patogenicidad, la presente invención se refiere tanto a la incidencia de la infección (% huevos infectados), como a la severidad de la misma (agudeza de la infección medida como número medio de hifas penetrando un huevo de nematodo).

En una realización particular de la presente invención, el quitosano se encuentra en una concentración comprendida entre 0.1-2 mg/ml.

En otra realización particular de la presente invención, los nematodos pertenecen al género *Meloidogyne*.

En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso de quitosano para aumentar la colonización de raíces de plantas por *P. chlamydosporia* sin afectar al desarrollo de las plantas.

En una realización en particular de la presente invención, el quitosano se encuentra en una concentración comprendida entre 0.01-0.1 mg/ml.

En otra realización particular de la presente invención, el quitosano se aplica en pautas de riego.

- 5 Por quitosano en la presente invención se refiere a quitosano de origen biológico o de origen químico. En la presente invención por origen biológico se refiere a quitosano natural con un origen animal o fúngico y por origen sintético se refiere a un quitosano sintetizado en el laboratorio mediante procedimientos químicos o bioquímicos.

10 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1.- En esta gráfica se observa que la aplicación de quitosano sobre conidios germinados de *P. chlamydosporia* aumenta significativamente la diferenciación de apresorios, estructuras necesarias para el parasitismo de huevos de nematodos por *P.*
15 *chlamydosporia*.

Figura 2.- En esta figura se observa que el uso del quitosano aumenta el parasitismo de huevos del nematodo fitopatógeno *M. javanica* por *P. chlamydosporia*. En este experimento se ha medido tanto la incidencia (% huevos infectados) como la severidad (agudeza de la
20 infección medida como número medio de hifas penetrando un huevo de nematodo).

Figura 3.- En esta figura se observa el efecto de la concentración de quitosano en el riego sobre el desarrollo de plantas de cebada a los 21 días de tratamiento continuado.

25 Figura 4.- En esta figura se analiza el efecto de la concentración de quitosano en el riego sobre el desarrollo de plantas de cebada: (a) peso fresco y seco aéreos y peso fresco radicular, (b) longitud máxima aérea y radicular.

Figura 5.- En esta figura se observa el efecto de la concentración de quitosano en el riego sobre el desarrollo de plantas de tomate a los 21 días de tratamiento continuado.
30

Figura 6.- En esta figura se analiza el efecto de la concentración de quitosano en el riego sobre el desarrollo de plantas de tomate: (a) peso fresco y seco y peso fresco radicular, (b) longitud máxima aérea y radicular.
35

Figura 7.- En esta figura se analiza el efecto de la concentración de quitosano en el riego

sobre el desarrollo de plantas de cebada preinoculadas con el hongo nematófago *P. chlamydosporia*: (a) peso fresco aéreo (PFA), (b) peso seco aéreo (PSA), (c) peso fresco radicular (PFR), (d) longitud máxima aérea (LMA), (e) longitud máxima radicular (LMR). Pc en la leyenda del eje de abscisas indica que dicho tratamiento incluyó la inoculación con *P. chlamydosporia*.

Figura 8.- Muestra el efecto del riego continuado con quitosano (a los 21 días del tratamiento) sobre la colonización (total y endofítica) por *P. chlamydosporia* de plántulas de tomate pre-inoculadas con el hongo. a) Evaluación de la colonización por siembra de fragmentos de raíz. b) Evaluación de la colonización por PCR cuantitativa utilizando cebadores específicos para el hongo y para la planta.

EXPOSICIÓN DETALLADA DE MODOS DE REALIZACIÓN

Mediante la presente invención se obtiene un aumento en la formación de apresorios, en la patogenicidad (incidencia y severidad) de huevos de nematodos así como en la colonización total de raíces de plantas de tomate por *P. chlamydosporia*, sin afectar a su desarrollo.

El quitosano de la presente invención puede ser de origen sintético o químico o bien obtenido a partir de la quitina de origen animal o fúngica tras desacetilización, o bien el propio quitosano presente en la pared celular de algunos hongos.

Ni los cultivos ni los agentes de control biológico a utilizar deben verse afectados negativamente por el quitosano.

Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar la invención y no deben ser considerados como limitativos del alcance de la misma.

EJEMPLO 1: Efecto del quitosano en la formación de apresorios

Se estudió el efecto del quitosano en la formación de apresorios en el hongo nematófago *P. chlamydosporia*. El aislado de *P. chlamydosporia* utilizado fue el 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 ATCC con la referencia MYA-4875.

El quitosano utilizado fue el denominado T8s, proporcionado por la empresa Marine BioProducts GmbH (Bremerhaven, Alemania). Se trata de un quitosano con un peso molecular de 70 KDa, y un grado de desacetilación del 82.5 %.

- 5 Para utilizar experimentalmente el quitosano, previamente debe disolverse. Para ello, el quitosano en polvo se disolvió con Ácido Clorhídrico 0.25 M y se ajustó el pH a 5.6 con Hidróxido de Sodio 1 M. La disolución de quitosano se sometió a diálisis en agua destilada a 4°C, con un cambio al día, a lo largo de tres días, para eliminar las sales presentes en el quitosano, o formadas al ajustar el pH del HCl a 5.6 con NaOH (Benhamou, *et al.*, 1994).
- 10 Tras la diálisis se comprobó que el pH del quitosano se mantuvo estable a 5.6. Finalmente, se sometió el quitosano disuelto a esterilización mediante calor húmedo en autoclave.

- 15 El medio de cultivo para crecer *P. chlamydosporia* fue PDA (agar dextrosa patata, BD), una vez esterilizado con calor húmedo en autoclave (20 minutos a 120 °C) el medio de cultivo se dispensó en placas Petri de plástico estériles de nueve centímetros de diámetro. Las placas se inocularon en el centro con discos de 5 mm tomados del borde de una colonia de 21 días de Pc123 creciendo activamente y se incubaron a 25°C en oscuridad.

- 20 Cuando las colonias tenían entre 18 y 21 días se extrajeron los conidios y se cuantificaron. Para extraer los conidios se trabajó en una cámara de flujo laminar, con material esterilizado por calor húmedo en autoclave, y con el instrumental flameado previamente. Se añadió agua destilada estéril sobre la placa, se arrastraron los conidios utilizando un asa de vidrio, se recogieron con una micropipeta, se pasaron a través de Papel Miracloth y se dispusieron en tubos Falcon estériles de 15 ml. La concentración de conidios se calculó utilizando una
- 25 cámara de Neubauer de 0,025 mm² de área y 0,1 mm de profundidad. De esta forma se calculó el número de conidios y se extrapoló su resultado al número de conidios por ml.

- 30 Los conidios con una concentración de 1×10^6 conidios*ml⁻¹ se pusieron a germinar en extracto de levadura al 0.0125% durante 16 horas, pasado ese tiempo se centrifugaron a 6000 rpm durante 10 minutos y se homogeneizaron con diferentes concentraciones de quitosano: 0 mg*ml⁻¹, 0.005 mg*ml⁻¹, 0.01 mg*ml⁻¹, 0.1 mg*ml⁻¹, 1 mg*ml⁻¹ y 2 mg*ml⁻¹. De cada una de las condiciones se pusieron 100 µl en una superficie de poliestireno (fragmentos de placas de Petri, Sterilin), ya que en Lopez-Llorca et al., (2002) se describió como un material inductor de formación de apresorios. Se dejaron en oscuridad a 25 °C
- 35 durante 10 horas y pasado ese tiempo se contó el número de apresorios diferenciados

respecto a los conidios germinados de la muestra. Los resultados del efecto del quitosano sobre la diferenciación de apresorios de *P. chlamydosporia* se resumen en la Figura 1.

Se observaron diferencias significativas en cuanto al número de apresorios formados de *P. chlamydosporia* en las concentraciones de quitosano más elevadas (0.1, 1 y 2 mg*ml⁻¹), siendo el número de apresorios en esas condiciones prácticamente el doble que en el tratamiento control (sin quitosano).

En la figura 1 se puede comprobar el efecto promotor del quitosano sobre la diferenciación de los tubos germinativos de *P. chlamydosporia* en apresorios. En el eje de ordenadas se representa el porcentaje de los ápices de tubos germinativos de conidios diferenciados en apresorios.

EJEMPLO 2: Efecto del quitosano en el parasitismo y severidad de huevos de nematodos fitopatógenos

Para la realización del ensayo de patogenicidad se utilizaron 30 huevos de *Meloidogyne javanica* repartidos en 3 réplicas (10huevos/réplica). Como inóculo se utilizaron conidios de *P. chlamydosporia* 123 procedentes de placas de PDA y su extracción se realizó como se ha explicado en el Ejemplo 1. Asimismo se utilizaron las siguientes concentraciones de quitosano: 0, 0.1, 1 y 2 mg*ml⁻¹.

Se dispusieron los huevos junto con el quitosano a cada una de las concentraciones descritas y los conidios de Pc 123 a una concentración final de 10⁶ conidios* ml⁻¹ en portaobjetos con diez pocillos de 6 mm de diámetro (ICN Biomedicals) como se indica a continuación: Se añadieron 20 µl de la suspensión de conidios por pocillo, con tres pocillos por tratamiento y tiempo de medida (24, 48, 72, 96 y 120 horas), el experimento contó con tres réplicas independientes. Los portaobjetos se dispusieron dentro de una placa de Petri estéril, sobre un trozo de papel de filtro estéril humedecido, formando una cámara húmeda.

A las 24, 48, 72, 96 y 120h se contó al microscopio la incidencia (% de huevos infectados) y la severidad (agudeza de la infección medida como número medio de hifas penetrando un huevo de nematodo) adicionando las concentraciones de quitosano descritas previamente (0, 0.1, 1 y 2 mg*ml⁻¹). Los resultados obtenidos se sintetizan en la Figura 2. Se observa un aumento significativo en la incidencia (% de huevos infectados) y la severidad (número de hifas penetrando un huevo de nematodo) en aquellos tratamientos con mayores

concentraciones de quitosano ($1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ y $2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) en los tiempos finales de medida (96h y 120h).

En la figura 2 se puede comprobar el efecto promotor del quitosano sobre el parasitismo (midiendo la incidencia y severidad del mismo) de huevos del nematodo fitopatógeno *M. javanica* por el hongo nematófago *P. chlamydosporia*. En la parte inferior y a la izquierda de cada imagen se indica la incidencia (% de huevos infectados) y a la derecha la severidad (agudeza de la infección medida como número medio de hifas penetrando un huevo de nematodo) adicionando diferentes concentraciones de quitosano.

EJEMPLO 3: Efecto del quitosano en el desarrollo de plántulas de cebada

Se esterilizó medio germinador (agar técnico 12 g/l (Cultimed), glucosa 10 g/l (Scharlau), peptona 0,1 g/l (Becton, Dickinson and Company) y extracto de levadura 0,1 g/l (Sigma)) mediante calor húmedo en autoclave y se dispensó en Placas de Petri de 90 mm de diámetro.

Se esterilizaron semillas de cebada (*Hordeum vulgare* var. *disticum* superficialmente utilizando hipoclorito sódico al 4% y unas gotas del detergente Tween-20 (Sigma) durante 1 hora en agitación (120 rpm). Posteriormente las semillas se lavaron 3 veces con agua destilada estéril durante 5 minutos cada vez y finalmente se dejaron secar en papel de filtro estéril durante 20 minutos. Pasado ese tiempo las semillas se sembraron en las placas de Petri de medio germinador preparadas previamente.

Las semillas se dejaron durante 48h a 25 °C en oscuridad, pasado ese tiempo las plántulas se dispusieron de forma individual en contenedores cilíndricos de 150 cm^3 con 70 cm^3 de arena de mar autoclavada y se regaron con 23 ml de Medio Gamborg's 1:10 autoclavado (Sigma). Tanto la arena como el Medio Gamborg's se esterilizaron mediante calor húmedo en autoclave.

Los tratamientos incluyeron pautas de riego con las siguientes concentraciones de quitosano (0, 0.01, 0.1, 1 y $2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$), adicionadas a medio Gamborgs 1:10 en todos los tratamientos.

Las plántulas se dispusieron de forma aleatoria en una cámara de cultivo Sanyo MLR-351H, con un fotoperiodo de 16 h de luz ($100 \mu\text{E}/\text{cm}$) y 8 h de oscuridad a temperatura constante, 25°C y humedad constante, 65%, durante la totalidad del experimento.

La humedad del sustrato vegetal se mantuvo constante durante el experimento añadiendo las diferentes pautas de riego explicadas anteriormente cuando fue necesario. El experimento incluyó 10 plantas de cada uno de los tratamientos. A los 21 días se evaluó para cada planta su peso fresco, seco y la longitud máxima de la parte aérea, así como el peso fresco y la longitud máxima radicular.

En las Figuras 3 y 4 se resumen los resultados obtenidos, en las que se observa que en los parámetros de peso fresco y seco aéreo y longitud máxima aérea ninguna de las concentraciones de quitosano probadas presentaron diferencias respecto al control. Sin embargo las plantas con pautas de riego de las siguientes concentraciones de quitosano: 0.01 mg*ml⁻¹, 0.1 mg*ml⁻¹ vieron incrementados los siguientes parámetros respecto al control: Longitud máxima radicular y peso fresco radicular. Así mismo se observó que la longitud máxima radicular fue menor respecto a las plantas control en las pautas de riego con quitosano a 1 y 2 mg*ml⁻¹.

EJEMPLO 4: Efecto del quitosano en el desarrollo de plántulas de cebada

Se preparó medio germinador de igual manera que en el Ejemplo 3. Se esterilizaron semillas de tomate (*Solanum lycopersicum* var. *Marglobe*) superficialmente utilizando hipoclorito sódico al 4% y unas gotas del detergente Tween-20 (Sigma) durante 20 minutos en agitación (120 rpm). Posteriormente las semillas se lavaron 3 veces con agua destilada estéril durante 5 minutos cada vez y finalmente se dejaron secar en papel de filtro estéril durante 20 minutos. Pasado ese tiempo las semillas se sembraron en las placas de Petri de medio germinador preparadas previamente.

Las semillas se incubaron durante 3 días a 25 °C en oscuridad y 4 días a fotoperiodo pasado dicho tiempo las plántulas se dispusieron de forma individual en contenedores cilíndricos de 150 cm³ con 70 cm³ de arena de mar autoclavada y se regaron con 23 ml de Medio Gamborg's 1:10 autoclavado (Sigma). Tanto la arena como el Medio Gamborg's se esterilizaron mediante calor húmedo en autoclave.

Las pautas de riego así como duración y réplicas del experimento fueron las mismas que las descritas para el Ejemplo 3.

En las figuras 5 y 6 se resumen los resultados obtenidos, en los que se observa que todos

los parámetros medidos con las pautas de riego de 0.01 y 0.1 mg*ml⁻¹ no presentaron diferencias respecto al control. Sin embargo en las plantas con pautas de riego con quitosano a 1 y 2 mg*ml⁻¹ todos los parámetros fueron estadísticamente menores respecto a las plantas control.

5

EJEMPLO 5: Efecto del quitosano en el desarrollo de plántulas de tomate y en la colonización de *P. chlamydosporia*

El medio germinador y la esterilización de las semillas de tomate se realizó de igual manera que en el Ejemplo 4. Previa a la disposición en los contenedores cilíndricos se inocularon con *P. chlamydosporia*, para ello las plántulas de 7 días se colocaron durante 3 días en una placa de CMA (Agar harina de maíz) de 21 días, pasado ese tiempo se dispusieron de igual manera que en el ejemplo 4. La diferencia fueron las pautas de riego, en este caso se utilizaron los siguientes tratamientos: 0, 0.01, 0.05, 0.1 y 0.3 mgml⁻¹ de quitosano. La duración y réplicas del experimento fueron las mismas que las descritas para el Ejemplo 3.

Para evaluar la colonización total y endofítica se escogieron 2 métodos: el método de siembra de fragmentos y el método de PCR cuantitativa, tal y como se describe en Escudero et al., 2012. Se escogieron 5 plantas para evaluar la colonización total y 5 plantas para la colonización endofítica. Para evaluar la colonización total se realizaron 3 lavados de las raíces con agua destilada estéril de 1 minuto cada uno, se secó la raíz con papel de filtro estéril y se sembró la misma cortada, en fragmentos de entre 0,5 y 1 cm, en medio agar extracto de maíz (CMA) (método de fragmentos) o se realizó una extracción de ADN y una PCR cuantitativa (método de PCR cuantitativa). Para medir la colonización endofítica se realizó una esterilización superficial de las raíces con hipoclorito sódico al 1% durante 1 minuto y posteriormente se realizaron 3 lavados con agua destilada estéril de 1 minuto cada uno. La raíz se secó como ya se ha indicado y se utilizó la misma metodología que para evaluar la colonización total.

En las figuras 7 y 8 se resumen los resultados obtenidos, donde se observa que la inoculación de las raíces de tomate con *P. chlamydosporia* y las pautas de riego de 0, 0.01, 0.05 y 0.1 mgml⁻¹ no afectan negativamente al desarrollo de las plantas de tomate. Por otro lado se observa que el quitosano aplicado en la pauta de riego aumenta la colonización (total y endofítica) de *P. chlamydosporia*, el método por el cual se observa mejor el incremento de la colonización fue el de PCR cuantitativa.

Los ejemplos demostraron que el uso del quitosano aumentó la formación de apresorios en el hongo nematófago *P. chlamydosporia*, aumentó la patogenicidad (incidencia y severidad) de *P. chlamydosporia* sobre huevos de nematodos fitopatógenos del genero *Meloidogyne* spp. Y el quitosano incorporado en las pautas de riego a concentraciones adecuadas, 5 aumentó significativamente la colonización total de raíces de plantas de tomate por *P. chlamydosporia*, sin afectar a su desarrollo.

REIVINDICACIONES

- 1.- Uso de quitosano para aumentar la formación de apresorios en *Pochonia chlamydosporia* y/o aumentar la patogenicidad de *Pochonia chlamydosporia* sobre huevos de nematodos.
- 5 2. Uso según la reivindicación 1, donde el quitosano se encuentra en una concentración comprendida entre 0.1-2 mg/ml.
3. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde los nematodos pertenecen al género *Meloidogyne*.
4. Uso de quitosano para aumentar la colonización de raíces de plantas por *Pochonia*
10 *chlamydosporia* sin afectar al desarrollo de las plantas.
5. Uso según la reivindicación 4, donde el quitosano se encuentra en una concentración comprendida entre 0.01-0.1 mg/ml.
6. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 4-5, donde el quitosano se aplica en pautas de riego.
- 15 7. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el quitosano es de origen biológico o sintético.
8. Uso según la reivindicación 7, donde el quitosano es de origen animal o fúngico.

FIG.1

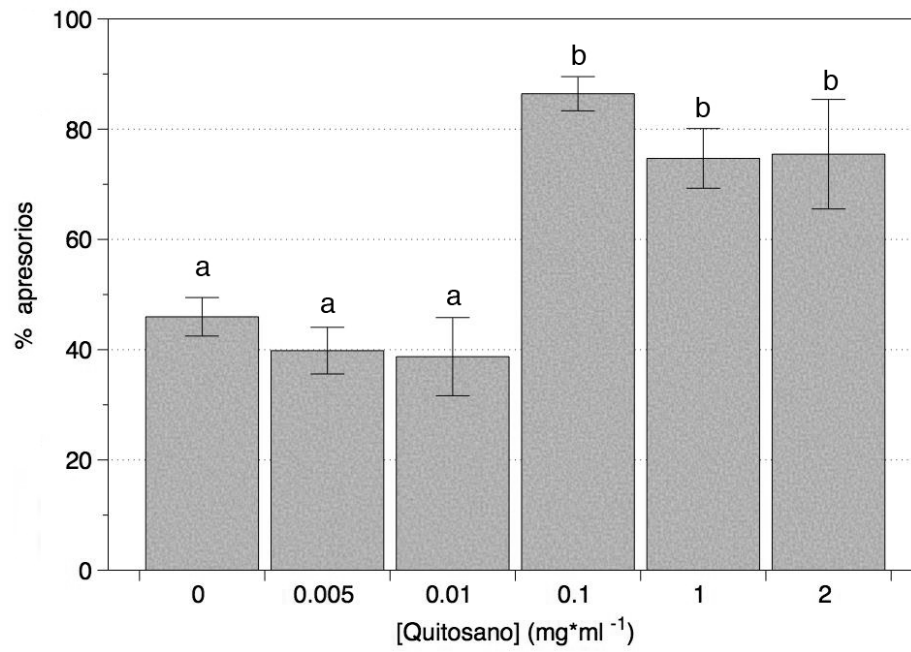


FIG.2

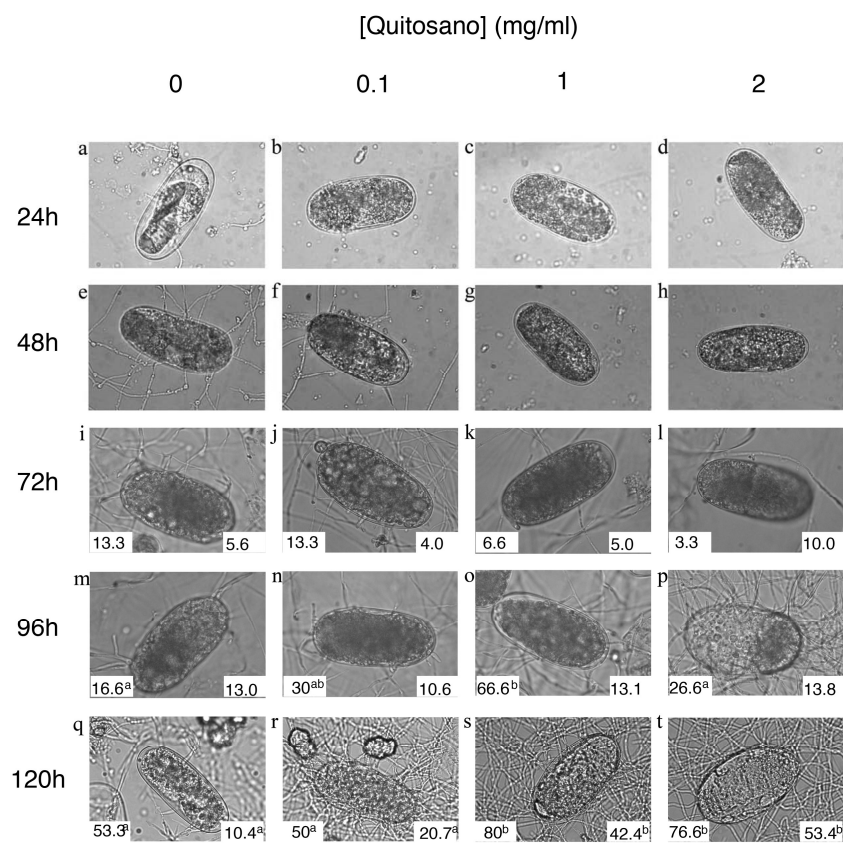


FIG.3

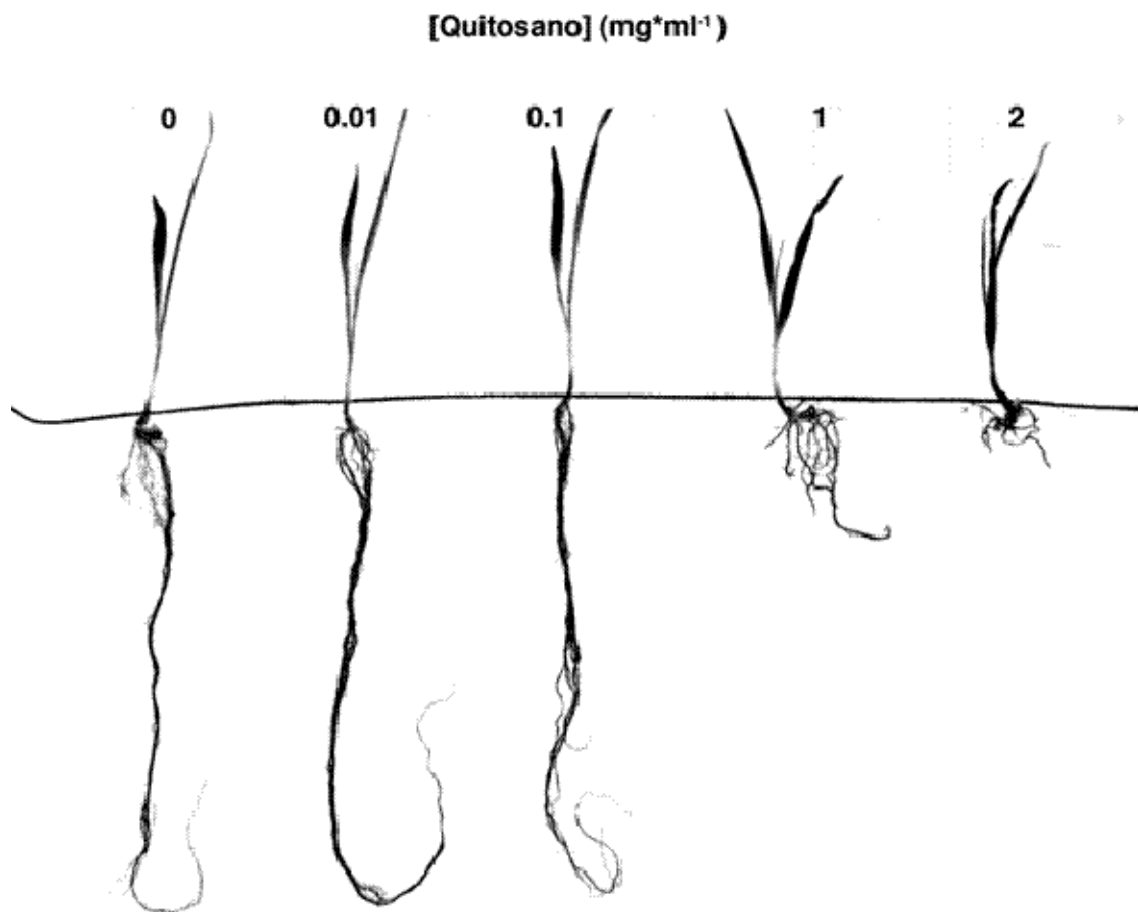


FIG. 4

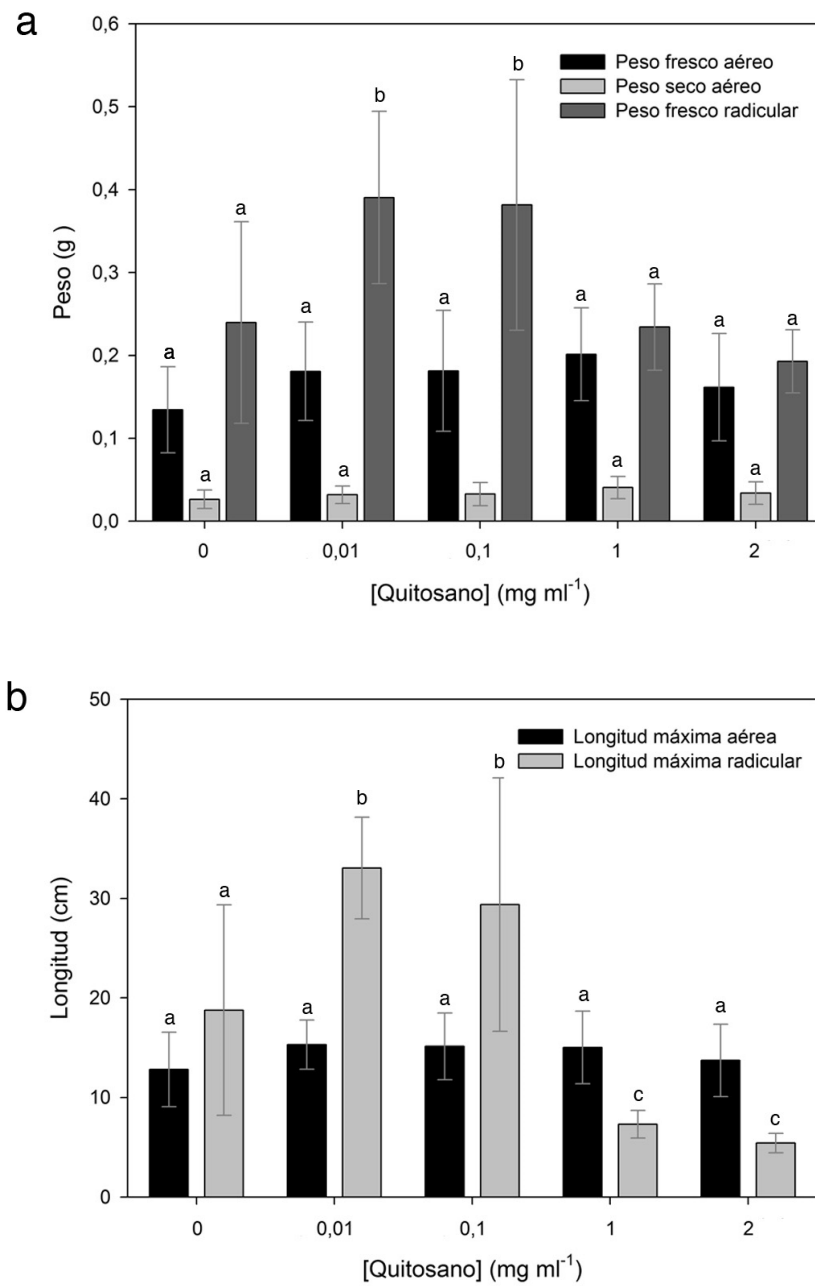


FIG.5

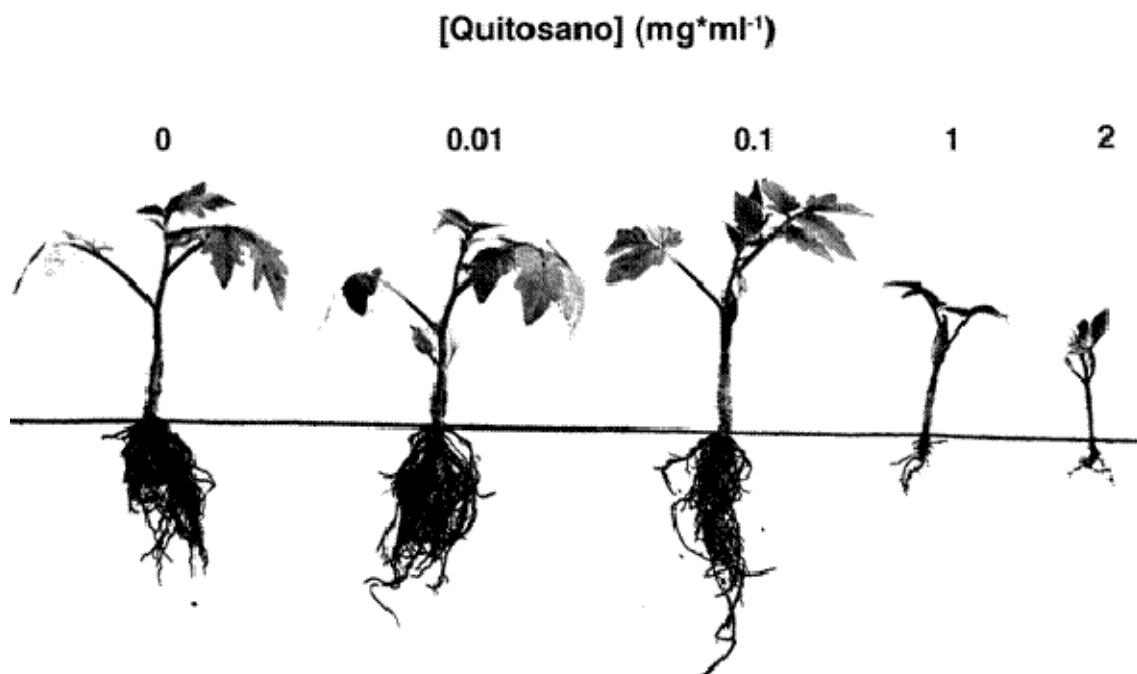


FIG. 6

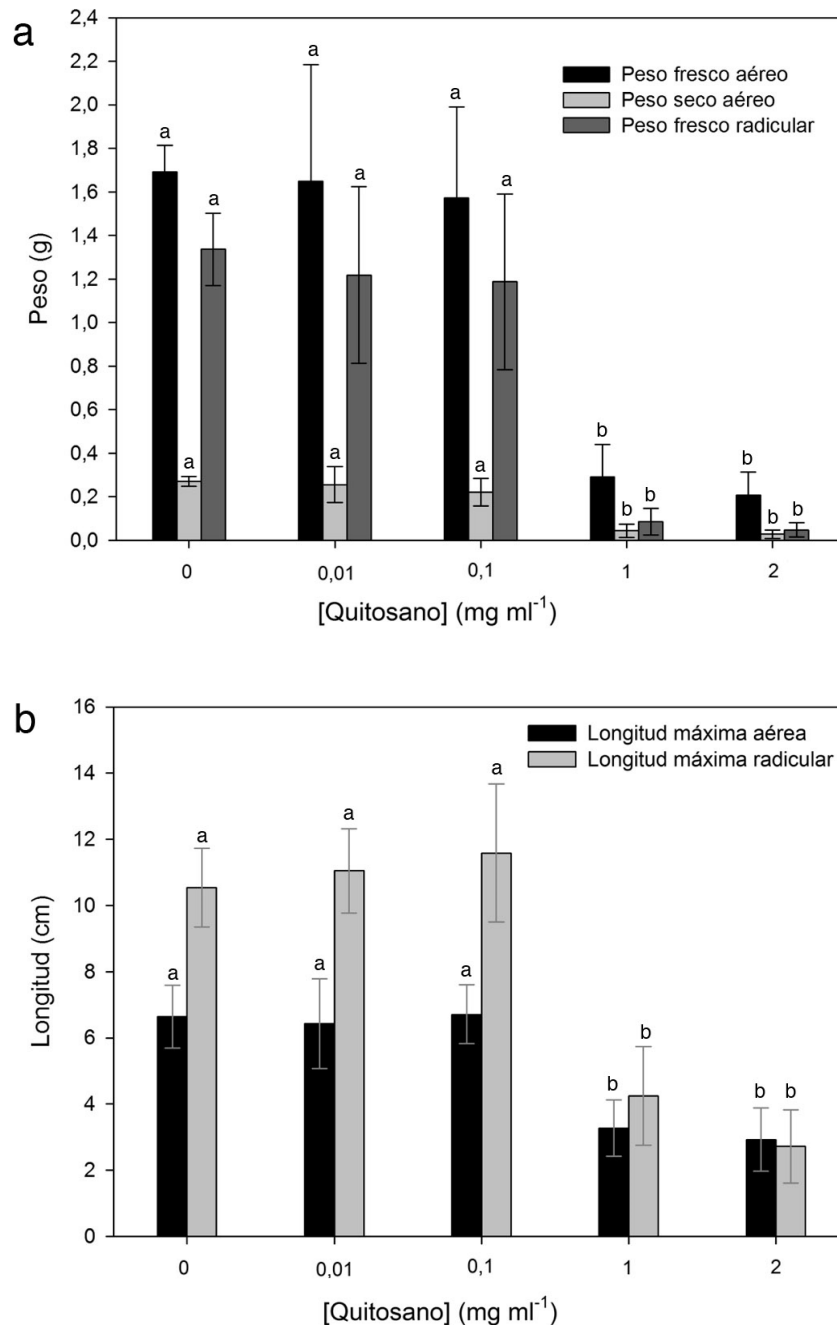


FIG.7

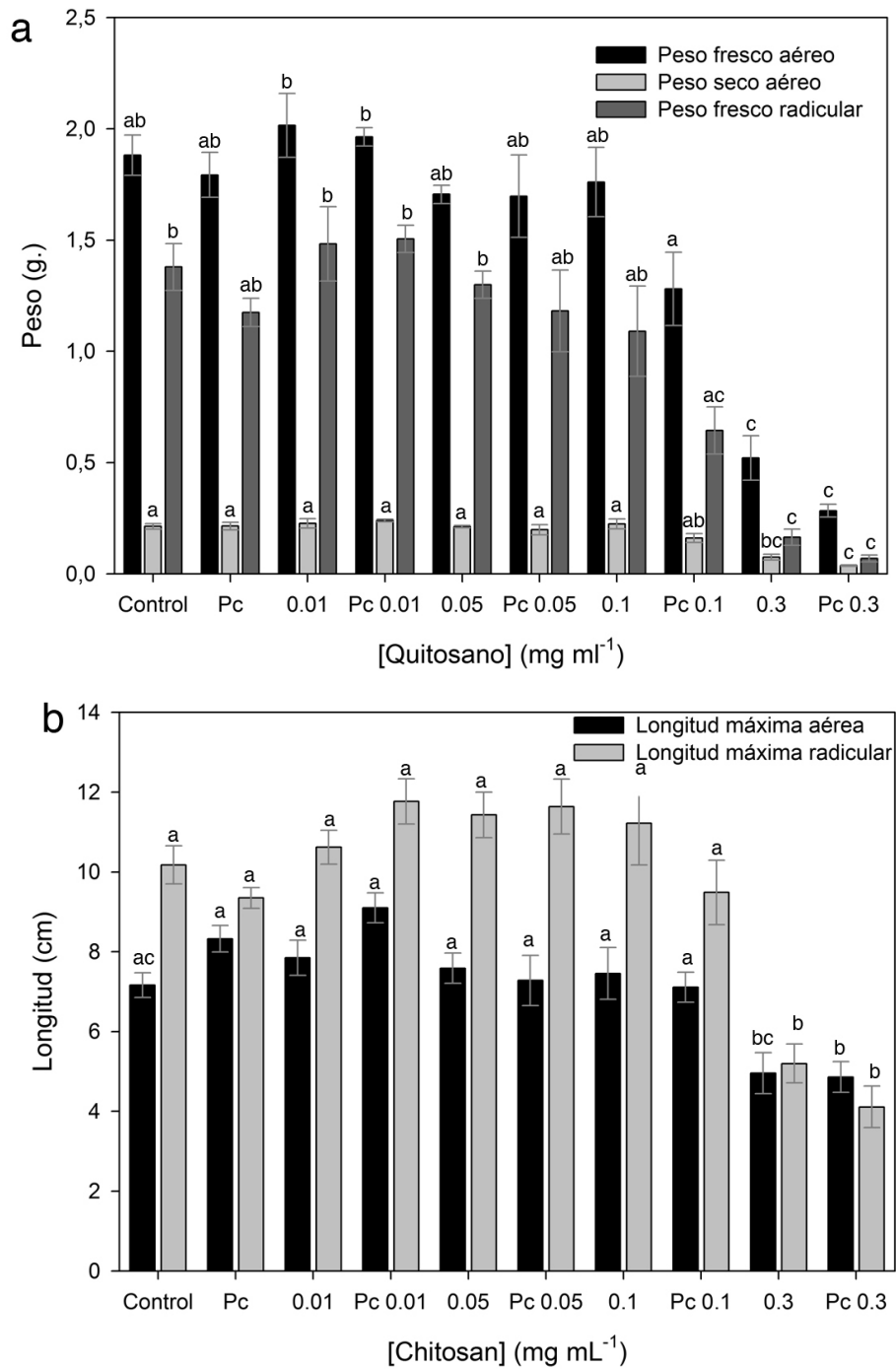
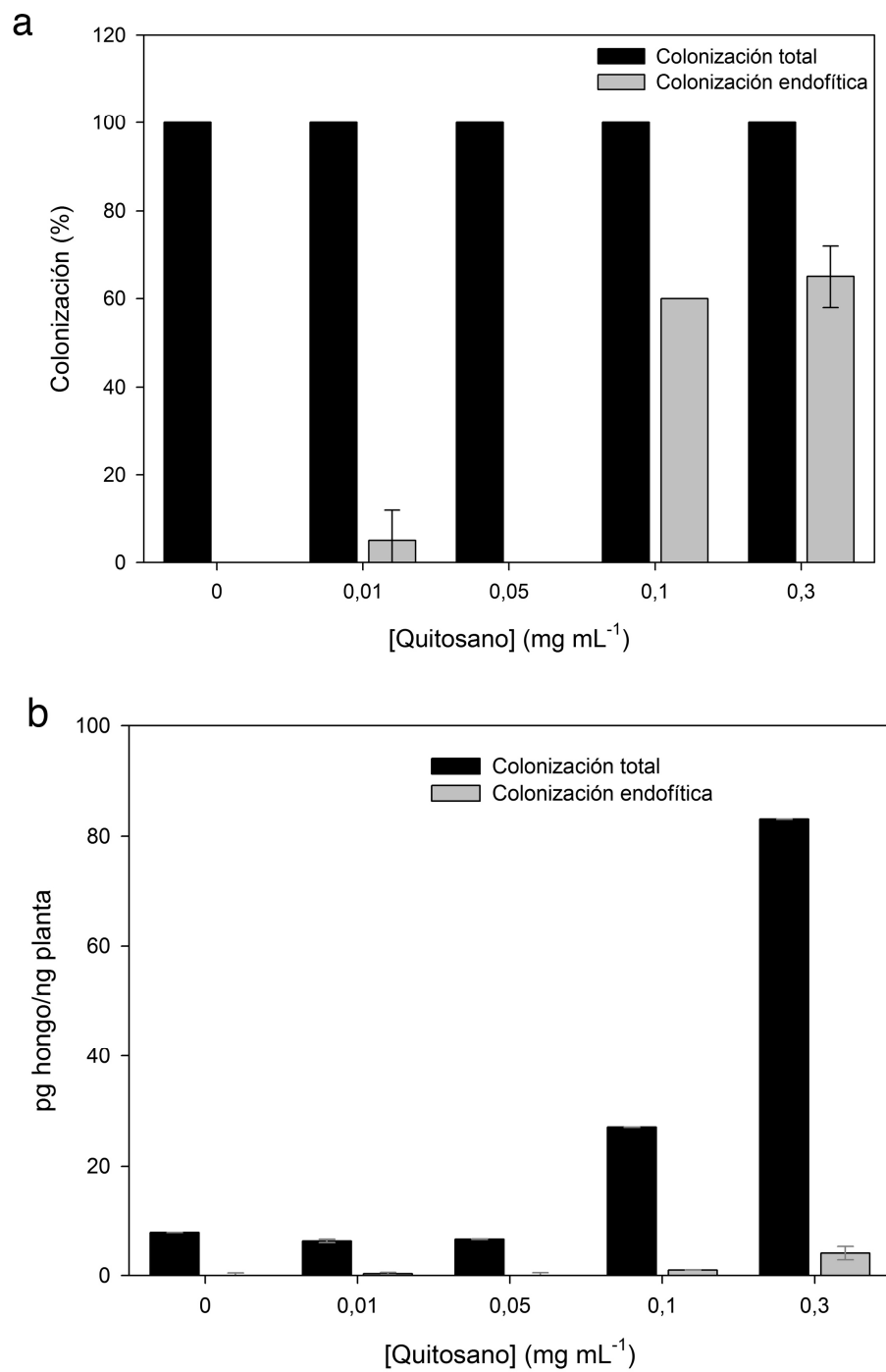


FIG.8





- (21) N.º solicitud: 201431399
(22) Fecha de presentación de la solicitud: 25.09.2014
(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	PALMA-GUERRERO J., GÓMEZ-VIDAL S., TIKHONOV V. E., SALINAS J., JANSSON H. B., LOPEZ-LLORCA L. V. "Comparative analysis of extracellular proteins from <i>Pochonia chlamydosporia</i> grown with chitosan or chitin as main carbon and nitrogen sources." Enzyme and Microbial Technology (2010) Vol. 46, páginas 568-574. Todo el documento.	1-8
A	ES 2307413 B2 (UNIVERSIDAD DE ALICANTE) 16.11.2008, todo el documento.	1-8
A	PALMA -GUERRERO J., JANSSON H. B., SALINAS J. y LOPEZ-LLORCA L. V. "Effect of chitosan on hyphal growth and spore germination of plant pathogenic and biocontrol fungi." Journal of Applied Microbiology (2008) Vol. 104, páginas 541-553. Todo el documento.	1-8
A	TIKHONOV V. E., et al. "Purification and characterization of chitinases from the nematophagous fungi <i>Verticillium chlamydosporium</i> and <i>V. suchlasporium</i> ." Fungal Genetics and Biology (2002) Vol. 35, páginas 67-78. Todo el documento.	1-8
A	PALMA-GUERRERO J., et al. "Membrane fluidity determines sensitivity of filamentous fungi to chitosan." Molecular Microbiology (2010) Vol. 75, páginas 1021-1032. Todo el documento.	1-8
A	MANGUNACELAYA J. et al. "Quitosano (Biorend) como complemento a la acción de productos nematocidas en vid de mesa y vinífera"(abstract) XIV Congreso Nacional de Fitopatología, Talca (30 noviembre – 3 diciembre 2004) Chile. Recuperado de Internet <URL: http://www.sochifil.cl/pdf/XIV.pdf >; Página 23.	1-8
A	NORDBRING-HERTZ B., JANSSON H-B., TUNLID A. "Nematophagous fungi." Encyclopedia of life sciences (2006), páginas 1-11. Todo el documento.	1-8
A	MANZANILLA-LÓPEZ R. H., ESTEVES I., FINETTI-SIALER M. M., HIRSCH P. R., WARD E., DEVONSHIRE J. e HIDALGO-DÍAZ L. " <i>Pochonia chlamydosporia</i> : advances and challenges to improve its performance as a biological control agent of sedentary endo-parasitic nematodes." Journal of Nematology (marzo 2013) Vol. 45, páginas 1-7. Todo el documento.	1-8

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
31.10.2014

Examinador
M. J. García Bueno

Página
1/5

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N1/14 (2006.01)

C12N1/38 (2006.01)

A01N63/04 (2006.01)

A01N43/16 (2006.01)

A01P5/00 (2006.01)

A01P21/00 (2006.01)

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

C12N, A01N, A01P

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, TXTE, TXTF, XPESP, NPL, BIOSIS, GOOGLE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 31.10.2014

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-8	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-8	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
D01	PALMA-GUERRERO J., GÓMEZ-VIDAL S., TIKHONOV V. E., SALINAS J., JANSSON H. B., LOPEZ-LLORCA L. V. "Comparative analysis of extracellular proteins from <i>Pochonia chlamydosporia</i> grown with chitosan or chitin as main carbon and nitrogen sources." <i>Enzyme and Microbial Technology</i> (2010) Vol. 46, páginas 568-574.	2010
D02	ES 2307413 B2 (UNIVERSIDAD DE ALICANTE)	16.11.2008
D03	PALMA -GUERRERO J., JANSSON H. B., SALINAS J. y LOPEZ-LLORCA L. V. "Effect of chitosan on hyphal growth and spore germination of plant pathogenic and biocontrol fungi." <i>Journal of Applied Microbiology</i> (2008) Vol. 104, páginas 541-553.	2008
D04	TIKHONOV V. E., et al. "Purification and characterization of chitinases from the nematophagous fungi <i>Verticillium chlamydosporium</i> and <i>V. suchlasporium</i> ." <i>Fungal Genetics and Biology</i> (2002) Vol. 35, páginas 67-78.	2002
D05	PALMA-GUERRERO J., et al. "Membrane fluidity determines sensitivity of filamentous fungi to chitosan." <i>Molecular Microbiology</i> (2010) Vol.75, páginas 1021-1032.	2010
D06	MANGUNACELAYA J. et al. "Quitosano (Biorend) como complemento a la acción de productos nematocidas en vid de mesa y vinífera"(abstract) XIV Congreso Nacional de Fitopatología, Talca (30 noviembre – 3 diciembre 2004) Chile. Recuperado de Internet <URL: http://www.sochifil.cl/pdf/XIV.pdf >	2004
D07	NORDBRING-HERTZ B., JANSSON H-B., TUNLID A. "Nematophagous fungi." <i>Encyclopedia of life sciences</i> (2006), páginas 1-11.	2006
D08	MANZANILLA-LÓPEZ R. H., ESTEVES I., FINETTI-SIALER M. M., HIRSCH P. R., WARD E., DEVONSHIRE J. e HIDALGO-DÍAZ L. " <i>Pochonia chlamydosporia</i> : advances and challenges to improve its performance as a biological control agent of sedentary endo-parasitic nematodes." <i>Journal of Nematology</i> (marzo 2013) Vol. 45, páginas 1-7.	03.2013

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

La presente solicitud de invención consiste en el uso del quitosano para aumentar la formación de apresorios en *Pochonia chlamydosporia* y/o aumentar la patogenicidad de *Pochonia chlamydosporia* sobre huevos de nematodos (reivindicaciones 1-3).

La presente solicitud de invención también consiste en el uso del quitosano para aumentar la colonización de raíces de plantas por *P. chlamydosporia* sin afectar al desarrollo de las plantas (reivindicaciones 4-8).

El documento D01 consiste en un estudio de las proteínas extracelulares expresadas por *P. chlamydosporia* en un medio que contiene quitosano (ver todo el documento).

El documento D02 consiste en el uso del quitosano para aumentar la esporulación de hongos, entre ellos *P. chlamydosporia* (ver todo el documento).

El documento D03 consiste en una investigación sobre el efecto tóxico del quitosano sobre hongos con acción importante sobre el biocontrol y la patogenicidad. Entre los hongos que se estudian se encuentran las esporas de *P. chlamydosporia* (ver todo el documento).

El documento D04 consiste en un método de purificación de quitinasas de *Verticillium chlamydosporium* y *V. suchlasporium* y sus efectos en la degradación de huevos de nematodos (ver todo el documento).

El documento D05 consiste en un estudio para caracterizar los componentes de membrana celular de hongos resistentes al quitosano y hongos sensibles al quitosano y determinar los componentes lipídicos de la membrana plasmática que confieren sensibilidad al quitosano. Con los resultados obtenidos se sugiere una nueva estrategia para el diseño de agentes antifúngicos (ver todo el documento).

El documento D06 consiste en un estudio sobre el quitosano como complemento a la acción de productos nematicidas, en vid de mesa y vinífera (ver página 23).

El documento D07 consiste en un estudio sobre los hongos nematófagos (ver todo el documento).

El documento D08 consiste en un estudio sobre *Pochonia chlamydosporia* como enemigo de ciertos nematodos (ver todo el documento).

1.- NOVEDAD (Art. 6.1 Ley 11/1986) Y ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 8.1 Ley 11/1986).

1.1.- REIVINDICACIONES 1-8.

El documento D01 se considera el estado de la técnica más próximo al objeto de las reivindicaciones 1-8 y divulga la hipótesis de la inducción de la expresión de enzimas extracelulares hidrolíticas por parte del quitosano en hongos nematófagos, las cuales participan en la penetración del hongo en los huevos de nematodos.

Con el conocimiento del documento D01, la invención reivindicada no se puede considerar obvia para un experto en la materia ya que no hay datos suficientes sobre la presencia y funciones de estas enzimas relacionadas con el quitosano en hongos nematófagos, en concreto en *Pochonia chlamydosporia*.

En los documentos D02-D05 se utiliza *Pochonia chlamydosporia* como unos de los hongos sensibles al quitosano, pero no divulga el uso de quitosano en dicho hongo para aumentar la formación de apresorios, ni aumentar la patogenicidad de *P. chlamydosporia* sobre los huevos de nematodos. Tampoco divulgan el aumento de la colonización de las raíces de las plantas infectadas por dicho hongo.

Por lo tanto, los documentos D02-D05 son solo documentos que reflejan el estado de la técnica.

El documento D06 divulga que el quitosano es una buena herramienta cuando se usa como complemento a nematicidas en el manejo de nematodos fitoparásitos porque potencia la acción nematicida y además, se vigoriza la planta y ésta se defiende mejor de los nematodos.

Sin embargo, el documento D06 difiere de la solicitud de la invención en que no se divulga el uso del hongo *Pochonia chlamydosporia* junto con el uso del quitosano como producto nematicida.

El documento D07 divulga la forma de parasitar los huevos de nematodos mediante apresorios de *P. chlamydosporia* y su capacidad de colonizar las raíces de plantas. Sin embargo el documento D07 no menciona el uso de quitosano para mejorar dichas funciones de *P. chlamydosporia*.

El documento D08 divulga un estudio sobre *Pochonia chlamydosporia* como enemigo de ciertos nematodos.

Los documentos D06-D08 solo muestran el estado general de la técnica, y no se consideran de particular relevancia.

Por lo tanto se considera que las reivindicaciones 1-8 son nuevas e implican actividad inventiva según los artículos 6.1 y 8.1 Ley 11/1986.