

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 600 966**

21 Número de solicitud: 201531190

51 Int. Cl.:

A01N 63/04 (2006.01)

12

ADICIÓN A LA PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

11.08.2015

43 Fecha de publicación de la solicitud:

13.02.2017

Fecha de concesión:

14.11.2017

45 Fecha de publicación de la concesión:

21.11.2017

61 Número y fecha presentación solicitud principal:

P 200700801 27.03.2007

73 Titular/es:

**FAUNA ÚTIL, S.L. (34.0%)
Ctra. La Guardia - Tuy, km 194
36740 Tomiño (Pontevedra) ES;
AGUÍN CASAL, Olga María (33.0%) y
MANSILLA VÁZQUEZ, José Pedro (33.0%)**

72 Inventor/es:

**AGUÍN CASAL, Olga María y
MANSILLA VÁZQUEZ, José Pedro**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

54 Título: **Gel para el tratamiento de Cryphonectria parasitica en castaños, perfeccionado**

57 Resumen:

Adición a la patente de invención número P200700801, por un gel para el tratamiento de Cryphonectria parasitica en castaños.

La presente adición se refiere a mejoras introducidas en el "gel para el tratamiento de Cryphonectria parasitica en castaños" descrito en la patente de invención P200700801.

En la presente adición se describen las cepas hipovirulentas de C. parasitica útiles en el tratamiento de castaños que padecen infecciones fúngicas causadas por el hongo Cryphonectria parasitica. La presente adición se refiere también al procedimiento de preparación del gel, y a su uso.

ES 2 600 966 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP 11/1986.

ADICIÓN A LA PATENTE DE INVENCIÓN NUMERO P200700801, POR UN GEL PARA EL TRATAMIENTO DE *CRYPHONECTRIA PARASITICA* EN CASTAÑOS

DESCRIPCIÓN

5

Campo técnico

La presente invención se engloba dentro del campo del tratamiento de infecciones arbóreas, en concreto de infecciones de castaños por parte del hongo *Cryphonectria parasitica* por métodos biológicos basados en cepas hipovirulentas del hongo.

10

Estado de la técnica

15 El hongo *C. parasitica*, originario de China y Japón, es el responsable de la práctica destrucción del castaño americano (*Castanea dentata*) en uno de los mayores desastres naturales del siglo XX. En 1904 se detectó su presencia en castaños del parque zoológico de Nueva York y en menos de medio siglo acabó con millones de ejemplares de este árbol.

20

En Europa el hongo fue localizado por primera vez en 1938 cerca de Génova (Italia), llegando a la península ibérica hacia 1947, cuando apareció en zonas de Vizcaya dedicadas al castaño.

25 *C. parasitica* es un hongo muy agresivo que invade al huésped muy rápidamente, formando canchales que al expandirse pueden impedir la circulación de la savia, causando la muerte de ramas o brotes situados por encima de la lesión.

Los síntomas iniciales del ataque por el hongo consisten en la aparición de un enrojecimiento y ligero hinchamiento de la corteza originando grietas y hendiduras en sentido longitudinal. Posteriormente, la corteza adquiere un aspecto laminado observándose bajo la superficie los cuerpos de fructificación del hongo denominados peritecas y picnidios. Finalmente, bajo la corteza y entre las láminas se observa un micelio blanco muy característico en forma de abanico.

35

Los métodos de control de la infección por *C. parasitica* usados más habitualmente consisten en:

- 40 • Métodos mecánicos, por poda de ramas afectadas y protección del muñón con un mástic fungicida.

- Métodos químicos, mediante el uso de compuestos activos en combinaciones tales como el oxiclورو de cobre con benomilo; o el oxiclورو de cobre al 5% con benomilo 50 WP y carbendazima 50 WP (Murat y Serdar, 2004).
- 5 • Métodos genéticos, para conseguir obtener castaños híbridos resistentes a la enfermedad. Cabe destacar que no se ha conseguido todavía ningún híbrido totalmente resistente a la enfermedad.
- 10 • Métodos biológicos, basados en la coinfección con cepas hipovirulentas del hongo. Estos métodos son los únicos hasta la fecha que logran la recuperación del árbol infectado y no una mera ralentización de la infección.

La hipovirulencia se define como una atenuación de la virulencia del patógeno provocada por la infección del hongo por un virus de ARN de doble cadena (dsARN). Los virus responsables del fenómeno de hipovirulencia se incluyen en la familia *Hypoviridae*, género *Hypovirus*. El virus responsable de la hipovirulencia en Europa es el denominado CHV1 (*Cryphonectria hypovirus 1*), cuyo genoma consiste principalmente en ARN lineal de doble cadena de 12.712 pares de bases (L-dsRNA) aunque también se han observado moléculas de ARN de menor tamaño: M-dsRNA de 8-10 kbp y S-dsRNA de 0,6-1,7 kbp.

En los métodos biológicos de control de la infección por *C. parasitica*, es necesario que cepas hipovirulentas del hongo transmitan el virus a cepas virulentas. Esta transmisión está mediada por anastomosis hifales y por conidias (esporas asexuales). El éxito del control de la infección depende de factores que influyen en la dispersión natural de la hipovirulencia. Uno de estos factores es la incompatibilidad vegetativa entre distintas cepas del hongo. Los genes de la incompatibilidad vegetativa entre aislados fúngicos determinan la probabilidad de transmisión del hipovirus.

Hasta hace poco tiempo se pensaba que en Europa la incompatibilidad vegetativa de *C. parasitica* estaba controlada por 6 loci de incompatibilidad vegetativa (VC) con dos alelos cada uno. A partir de estos seis loci eran posibles 64 genotipos ($2^6 = 64$). Sin embargo, diversos estudios han encontrado tipos VC que no eran compatibles con ninguno de los 64 tipos establecidos. De esta manera se planteó la teoría de la existencia de otros loci o de algún alelo adicional para describir el determinismo de todos los tipos VC. En la actualidad, la nomenclatura europea eleva el número de grupos de compatibilidad a 74 y a medida que se van describiendo más poblaciones aparecen nuevos tipos.

Los estudios realizados en España establecen el tipo de compatibilidad EU2 como el más abundante (engloba el 71% de los aislados), si bien también detectan la existencia de otros tipos pero en menor proporción. Se ha comprobado que la conversión de una cepa virulenta en hipovirulenta resulta más eficaz si se utilizan cepas hipovirulentas pertenecientes al mismo grupo de compatibilidad obtenidas espontáneamente en la zona donde se quiere realizar el control.

La hipovirulencia en campo se caracteriza por la presencia de canchros cicatrizados en la corteza sin que se produzca la muerte del árbol. Se observa una escasa producción de picnidios y el micelio queda restringido a las capas externas de la corteza. Con frecuencia no presenta la forma típica de abanico de los canchros virulentos. La diferenciación *in vitro* entre cepas hipovirulentas y virulentas se basaba hasta hace unos años en la observación de características morfológicas de las colonias en cultivo, como por ejemplo la coloración del micelio, el crecimiento, la textura y la presencia de cuerpos de fructificación. Sin embargo la puesta a punto de técnicas moleculares para la detección y caracterización del ARN de doble cadena ha facilitado enormemente la determinación rápida y fiable de las cepas hipovirulentas.

La aplicación del control biológico en campo consiste en la inoculación de micelio hipovirulento en la zona del árbol afectada de tal manera que el hipovirus pueda pasar a través de las uniones hifales provocando la conversión de la cepa virulenta en hipovirulenta. Es imprescindible que el inóculo hipovirulento sea compatible con las cepas virulentas, en caso contrario, además de reducir la eficacia del biocontrol se estaría facilitando la recombinación genética del patógeno lo que podría dar lugar a nuevos tipos de compatibilidad y, en consecuencia, a nuevos focos de infección. En la práctica se recomienda tratar alrededor del 10-15% de los canchros de una parcela y en años consecutivos continuar interviniendo sobre nuevos canchros para que la cepa hipovirulenta se extienda por toda la zona tratada.

La presente adición a la patente de invención número P200700801, por un “gel para el tratamiento de *Cryphonectria parasitica* en castaños”, tiene la finalidad de describir las cepas hipovirulentas de *C. parasitica* útiles en el tratamiento de castaños que padecen infecciones fúngicas causadas por *Cryphonectria parasitica*.

30 Descripción detallada de la invención

El objeto de la presente invención se refiere a una composición útil para el tratamiento de infecciones por *C. parasitica* en castaños, que comprende:

- 3-3,5% de extracto de malta líquido al 1%;
- 0,25-0,5% de cultivo de una cepa hipovirulenta de *C. parasitica* con compatibilidad vegetativa con la cepa causante de la infección;
- en gel de polímero universal de ácido acrílico hidrosoluble al 2% con un pH comprendido entre 7 y 7,5;

y se caracteriza porque la cepa hipovirulenta de *Cryphonectria parasitica* se elige de entre cepas con presencia del hipovirus CHV1 tipo E pertenecientes a los tipos de compatibilidad E1, E2 o E5 de Galicia (Aguín *et al.*, 2008).

En una realización preferida, la composición se caracteriza porque dicho gel de polímero universal de ácido acrílico hidrosoluble es Carbopol® seleccionado entre Carbopol®940 y Carbopol®934.

- 5 En una realización más preferida, la composición se caracteriza porque dicho gel se encuentra dentro de una dosificadora. En una realización aún más preferida, la composición se caracteriza porque dicho gel se encuentra dentro de un tubo de aluminio. El aluminio permite una mejor conservación del gel objeto de la presente invención.
- 10 Es también objeto de la presente invención un procedimiento para la obtención de la composición descrita anteriormente que comprende:
- añadir a un volumen de entre 3 y 3,5 ml de extracto de malta líquido entre 0,25 y 2,5 g de la cepa hipovirulenta de *C. parasitica*;
 - mezclar la solución anterior; y
- 15 • añadir dicha solución a un gel de Carbopol® al 2%;
- y se caracteriza porque la cepa hipovirulenta de *Cryphonectria parasitica* se elige de entre cepas con presencia del hipovirus CHV1 tipo E pertenecientes a los tipos de compatibilidad E1, E2 o E5 de Galicia.
- 20 En una realización preferida, el procedimiento se caracteriza porque la cepa hipovirulenta de *C. parasitica* se mantiene a 24°C sobre celofán en medio de cultivo PDA. El uso de celofán, de carácter poroso, permite separar el medio de cultivo del micelio, para así poder obtener el micelio más puro, en el momento de mezclarlo con el extracto de malta.
- 25 En una realización más preferida, el procedimiento se caracteriza porque comprende introducir el gel resultante en una dosificadora.

En una realización aún más preferida, el procedimiento se caracteriza porque se introduce el producto resultante en un tubo de aluminio.

- 30 Es asimismo objeto de la presente invención un uso de la composición descrita anteriormente que comprende:
- introducir dicha composición en agujeros realizados en la corteza de los árboles a tratar con un diámetro equivalente al tamaño del cancro a tratar, hasta cubrir el hueco;
- 35 • tapar los agujeros con cinta adhesiva;
- sellar dicha cinta con silicona; y
 - dejar actuar entre 12 y 24 meses.

- 40 En una realización preferida, los agujeros realizados en la corteza de los árboles a tratar poseen un diámetro comprendido entre 6-15 mm.

Las realizaciones preferidas de la presente invención se describen con propósito ilustrativo y no deben ser considerados como limitantes de la invención en modo alguno.

5 **Breve descripción de las figuras**

Figura 1. Estado de un cancro recién inoculado.

Figura 2. Estado del cancro un año después de la inoculación.

10

Figura 3. Estado de un cancro recién inoculado.

Figura 4. Estado del cancro un año después de la inoculación.

15

Figura 5. Estado de un cancro recién inoculado.

Figura 6. Estado del cancro un año después de la inoculación.

20 **Modo de realización de la invención**

A continuación se detalla un ejemplo de realización de la presente invención con carácter ilustrativo, y en modo alguno limitativo de la misma.

25 Se eligen castaños que padecen infecciones fúngicas causadas por *Cryphonectria parasitica*. En cada árbol se realizan agujeros de aproximadamente 8 mm de diámetro alrededor de los cancos, en el límite entre la zona afectada y la zona sana. En cada agujero se inocula una gota del gel hasta cubrir el hueco. Para evitar la pérdida o desecación del gel, los agujeros se tapan con cinta adhesiva y se sellan con silicona.
30 Entre los 18-24 meses se produce la cicatrización de la lesión.

En total se analizaron 48 cancos virulentos en castaños de Galicia. Se observó que en 44 de ellos no hubo crecimiento de las lesiones, y sí cicatrización (Figuras 1-6).

35

Obtención del gel

El primer paso consiste en aislar el hongo *Cryphonectria parasitica*. Para ello se usan fragmentos sintomáticos de corteza de un castaño infectado. Se desinfecta la superficie
40 con agua destilada e hipoclorito sódico, para eliminar los restos vegetales asociados a la muestra. Una vez secos se siembran en el medio nutritivo PDAMB (*) y se mantienen a 24°C en oscuridad durante 5-7 días. Diariamente se observa el crecimiento fúngico de la placa para comprobar la evolución del cultivo. A los 5-7 días de la siembra, se hace un

repicado del hongo a una nueva placa del medio PDA con celofán para proceder al análisis de la virulencia.

5 (*) Preparación del medio PDAmb: En un erlenmeyer se incorporan 39 g de PDAmb (patata-dextrosa-agar suplementado con 100 mg/L de metionina y 1 mg/L de biotina) Difco®. Se enrasa a 1 litro con agua destilada y se agita a 400 rpm durante aproximadamente 75 min a 80-90°C. A continuación, se esteriliza a 121°C durante 20 min, se dispensa en placas Petri estériles y se conserva en la nevera a 4°C hasta su uso.

10 El análisis de la virulencia del hongo se puede realizar en función de sus características morfológicas.

15 Un aislado de *C. parasitica* se considera virulento cuando el micelio presenta en un primer momento color blanco pero posteriormente adquiere una tonalidad amarillenta con presencia abundante de cuerpos de fructificación (picnidios) distribuidos en anillos concéntricos.

20 Por el contrario, cepas cuyo micelio se mantiene siempre de color blanco y con nula o escasa presencia de picnidios, se pueden considerar posibles cepas hipovirulentas. Para confirmar el análisis, se colocan bajo luz ultravioleta durante siete días para forzar su fructificación. Si al cabo de esos días mantienen esa misma morfología se puede confirmar la hipovirulencia.

25 El análisis de la virulencia del hongo se puede realizar asimismo en función de sus características moleculares.

30 Para confirmar la hipovirulencia de *Cryphonectria parasitica* por métodos moleculares, se realiza la extracción del dsRNA. En un tubo de microcentrifuga se pesan 125 mg de micelio fresco y se añaden 700 µL de buffer de extracción (STE 2X (0,2 M NaCl, 0,1 M Tris pH 8, 2 mM EDTA pH 8), 2% SDS, 1% bisulfito sódico). La muestra se machaca con un pistón estéril y se incuba a 65°C durante al menos 15 minutos. A continuación se añaden 700 µL de una mezcla de fenol, cloroformo, alcohol isoamílico (FCI) 25:24:1 y se agita en vortex durante 90 segundos, tras lo cual se centrifuga durante 10 minutos a 16.000 x g. El sobrenadante se transfiere a un tubo limpio y se añade otro volumen de

35 FCI. La muestra se agita en vórtex durante 60 segundos y se centrifuga a 16.000xg durante 5 minutos. La fase acuosa superior se transfiere a un tubo limpio completando el volumen hasta 1 mL con STE 1X y se añaden 0,21 mL de etanol al 95% para obtener una concentración final de aproximadamente el 17%. Posteriormente se mezcla con 100 mg

40 de resina CF11 (Whatman) y se agita durante 10 minutos seguidos de una centrifugación a 16000xg 10 minutos. Tras descartar el sobrenadante a la resina se añade 1 mL de tampón de lavado (STE 1X, 17% etanol) y se centrifuga en las mismas condiciones realizando el lavado un total de dos veces. Una vez eliminado completamente el tampón anterior, se añaden 600 µL de STE 1X y se agita suavemente durante 10 minutos

centrifugando en las mismas condiciones, recuperándose 500 µL del sobrenadante que contiene el dsRNA y restos de ADN. El dsRNA se precipita con 750 µL (1,5 vol) de etanol al 95% y 130 µL (1/10 vol) de acetato sódico 3M pH 5,2 durante toda la noche a -20°C tras lo cual se centrifuga a 16.000xg durante 30 min. Tras descartar el sobrenadante el pellet se lava con 100 µL de etanol al 70%, se centrifuga durante 2 min en las mismas condiciones y se deja secar al aire. El dsRNA se resuspende en 60 µL de tampón de almacenamiento (TE (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA pH 8,0), 0,35 M NaCl) y se incuban con 2 µL de DNasa (6,4 µg/µL) (Sigma) a 37°C durante toda la noche. Una alícuota de 10 µL se analiza mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v), en tampón 0,5 X TBE (Tris- HCl 0,89 M, ácido bórico 0,89 M y EDTA 0,02 M, pH 8,4) a 90 V durante 120 minutos. En cada prueba se incluye un control positivo (una cepa hipovirulenta cedida por el Dr. Cortesi) y otro negativo, además del marcador λ Hind III (Fermentas). El gel se tiñe en una solución de bromuro de etidio (0,5 µg/ml) durante 30 minutos, se captura la imagen en el sistema de documentación SYNGENE y se analiza mediante el programa de densitometría 1-D Manager (TDI, Madrid).

En las cepas hipovirulentas aparece una banda entre 10 y 13 kb mientras que en las virulentas no aparecen bandas

Cuando se obtiene un aislado hipovirulento es necesario llevar a cabo el estudio de compatibilidad vegetativa con los aislados virulentos de *C. parasitica*, para comprobar si es posible su utilización en el control biológico. Este estudio se realiza mediante el método de barrera/fusión en el PDAg, que contiene potato dextrosa broth (24 g/L), extracto de malta (7 g/L), extracto de levadura (2 g/L), ácido tánico (0.8 g/L) y agar (20 g/L), suplementado con el colorante verde de bromocresol (50 mg/L) que facilita la observación de la barrera formada entre los dos aislamientos incompatibles.

En el desarrollo del método, fragmentos pequeños de cada micelio de 7 días de vida media, se sitúan en placas Petri a 1cm del margen y separados entre sí por 1 mm. Se incuban durante una semana a 25°C y en oscuridad.

Para la interpretación del resultado, dos aislados se consideran compatibles cuando los micelios de las colonias del hongo se fusionan completamente, mientras que una reacción incompatible se aprecia por la formación de una barrera visible entre los dos micelios y decoloración oscura en el agar, visible en la base de la placa Petri. Para poder aplicar el biocontrol en campo las cepas hipovirulentas tienen que ser compatibles con las virulentas.

Para elaborar el gel, se esteriliza el material a utilizar en autoclave durante 30 min a 121°C (vasos de precipitados, erlenmeyer, varillas de vidrio, espátula y los complementos de la dosificadora). En un vaso de precipitados, de 250 mL de capacidad, se añaden 2 g de Carbopol® 940 ó 934 y 100 mL de agua destilada. Se homogeneiza bien con la ayuda de una batidora. A continuación, se mide el pH, y posteriormente con la ayuda de una

pipeta Pasteur desechable, se va añadiendo NaOH, hasta lograr un rango de pH entre 7-7,5. Durante la subida del pH, se observa cómo se va solidificando la preparación convirtiéndose en gel.

- 5 Para la preparación del inóculo hipovirulento (cepa hipovirulenta CHV1 compatible con el tipo VC EU1), se realiza la incorporación del inóculo hipovirulento de *C. parasitica* al gel en la cámara de flujo laminar de la siguiente manera: Se coge un vaso de precipitados y se le añade con una jeringa entre 3-3,5 ml de extracto de malta líquido al 1% (en un erlenmeyer de 100 mL de capacidad, se añade 1 g de extracto de malta y 100 mL de H₂O
10 destilada, se agita y se esteriliza a 121°C durante 30 min) y entre 0,25-0,5 g de la cepa hipovirulenta de *C. parasitica* mantenida a 24°C sobre celofán en el medio de cultivo PDA. Se mezcla bien y se añade al gel.

15 Una vez incorporado el inóculo hipovirulento se introduce el gel en la dosificadora y este a su vez en un tubo de aluminio de 100 mL. El tubo se cierra con una selladora y se mantiene en nevera a 4°C hasta su uso. La viabilidad del producto es entre 30-40 días. Con este gel, elaborado a partir de micelio hipovirulento, se pueden tratar todo tipo de castaños que estén afectados por una cepa virulenta compatible con la hipovirulenta de *Cryphonectria parasitica*.

20

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición útil para el tratamiento de infecciones por *C. parasitica* en castaños, de acuerdo con la reivindicación 1 de la patente ES2328316 (P200700801), que comprende:
- a) 3-3,5% de extracto de malta líquido al 1%;
 - b) 0,25-0,5% de cultivo de una cepa hipovirulenta de *C. parasitica* con compatibilidad vegetativa con la cepa causante de la infección;
 - 10 c) en gel de polímero universal de ácido acrílico hidrosoluble al 2% con un pH comprendido entre 7 y 7,5;
- caracterizada porque** la cepa hipovirulenta de *Cryphonectria parasitica* se selecciona de un grupo que consiste en cepas que presentan un hipovirus CHV1 tipo E perteneciente a un tipo de compatibilidad seleccionado entre E1, E2 y E5 de Galicia.
- 15 2. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dicho gel de polímero universal de ácido acrílico hidrosoluble es Carbopol® seleccionado entre Carbopol®940 y Carbopol®934.
- 20 3. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dicho gel se encuentra dentro de una dosificadora.
4. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dicho gel se encuentra dentro de un tubo de aluminio.
- 25 5. Un procedimiento para la obtención de una composición descrita en las reivindicaciones 1 a 5, que comprende:
- a) añadir a un volumen de entre 3 y 3,5 ml de extracto de malta líquido entre 0,25 y 2,5 g de la cepa hipovirulenta de *C. parasitica*;
 - 30 b) mezclar la solución anterior; y
 - c) añadir dicha solución a un gel de Carbopol® al 2%, dando lugar a un producto útil para el tratamiento de infecciones por *C. parasitica* en castaños;
- caracterizado porque** la cepa hipovirulenta de *Cryphonectria parasitica* se selecciona de un grupo que consiste en cepas que presentan un hipovirus CHV1 tipo E perteneciente a un tipo de compatibilidad seleccionado entre E1, E2 y E5 de Galicia.
- 35 6. El procedimiento según la reivindicación 5, donde la cepa hipovirulenta de *C. parasitica* se mantiene a 24°C sobre celofán en medio de cultivo PDA.
- 40

7. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 5 o 6, donde se introduce el producto resultante de la etapa (c) de la reivindicación 5 en una dosificadora.
- 5 8. El procedimiento según la reivindicación 7, donde se introduce el producto resultante de la etapa (c) de la reivindicación 5 en un tubo de aluminio.
9. Un uso de la composición descrita en una de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado porque** comprende:
- 10 a) introducir dicha composición en agujeros realizados en la corteza de los árboles a tratar con un diámetro equivalente al tamaño del cancro a tratar, hasta cubrir el hueco;
- b) tapar los agujeros con cinta adhesiva;
- 15 c) sellar dicha cinta con silicona; y
- d) dejar actuar entre 12 y 24 meses.
10. El uso según la reivindicación 9, donde los agujeros realizados en la corteza de los árboles a tratar poseen un diámetro comprendido entre 6-15 mm.



FIGURA 1



FIGURA 2



FIGURA 3



FIGURA 4



FIGURA 5



FIGURA 6



- ②① N.º solicitud: 201531190
②② Fecha de presentación de la solicitud: 11.08.2015
②③ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **A01N63/04** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	AGUÍN O, et al. Distribución y diversidad de los tipos de compatibilidad vegetativa de <i>Cryphonectria parasitica</i> (Murrill) Barr en castaños de Castilla y León. 2005. <i>Bot. San. Veg. Plagas</i> . Vol. 31, páginas 287-297. Página 291.	1-10
A	AGUÍN O, et al. Caracterización morfológica y molecular de las poblaciones de <i>Cryphonectria parasitica</i> en castaños de Galicia. 2008. <i>Bol. San. Veg. Plagas</i> . Vol. 74, páginas 581-594. Resumen.	1-10
A	ROBIN C, et al. Chestnut blight in Europe: Diversity of <i>Cryphonectria parasitica</i> , hypovirulence and biocontrol. 2001. <i>For. Snow Landsc. Res</i> . Vol. 76(3), páginas 361-367.	1-10
A	JUHASOVA G, et al. <i>Cryphonectria parasitica</i> (Murr.) Barr and <i>Phytophthora</i> spp. in chestnut (<i>Castanea sativa</i> Mill.) in Slovakia. 2001. <i>For. Snow Landsc. Res</i> . Vol. 76 (3), páginas 373-377.	1-10
A	MONTENEGRO D, et al. Diversity of vegetative compatibility types, distribution of mating types and occurrence of hypovirulence of <i>Cryphonectria parasitica</i> in chestnut stands in NW Spain. 2008. <i>Forest Ecology and Management</i> Vol. 256, páginas 973-980.	1-10

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:

<p>Fecha de realización del informe 18.11.2015</p>	<p>Examinador I. Rueda Molíns</p>	<p>Página 1/4</p>
---	--	------------------------------

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

A01N

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: 18.11.2015

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-10	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-10	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	AGUÍN O, et al. Distribución y diversidad de los tipos de compatibilidad vegetativa de <i>Cryphonectria parasitica</i> (Murrill) Barr en castaños de Castilla y León. Bot. San. Veg. Plagas. Vol. 31, páginas 287-297. Página 291.	2005
D02	AGUÍN O, et al. Caracterización morfológica y molecular de las poblaciones de <i>Cryphonectria parasitica</i> en castaños de Galicia. Bol. San. Veg. Plagas. Vol. 74, páginas 581-594. Resumen.	2008
D03	ROBIN C, et al. Chestnut blight in Europe: Diversity of <i>Cryphonectria parasitica</i> , hypovirulence and biocontrol. For. Snow Landsc. Res. Vol. 76(3), páginas 361-367.	2001
D04	JUHASOVA G, et al. <i>Cryphonectria parasitica</i> (Murr.) Barr and <i>Phytophthora spp.</i> in chestnut (<i>Castanea sativa</i> Mill.) in Slovakia. For. Snow Landsc. Res. Vol. 76 (3), páginas 373-377.	2001
D05	MONTENEGRO D, et al. Diversity of vegetative compatibility types, distribution of mating types and occurrence of hypovirulence of <i>Cryphonectria parasitica</i> in chestnut stands in NW Spain. Forest Ecology and Management Vol. 256, páginas 973-980.	2008

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 LP11/86)

En las reivindicaciones 1-4 de la solicitud de patente se reivindica una composición útil para el tratamiento de infecciones por *C. parasitica* en castaños caracterizada porque la cepa hipovirulenta de *Cryphonectria parasitica* se selecciona de un grupo que consiste en cepas que presentan un hipovirus CHV1 tipo E perteneciente a un tipo de compatibilidad seleccionado entre E1, E2 y E5 de Galicia.

En las reivindicaciones 5-8 de la solicitud de patente se reivindica un procedimiento para la obtención de la composición anteriormente mencionada.

En las reivindicaciones 9 y 10 de la solicitud de patente se reivindica el uso de la citada composición.

En los documentos D01-D05 se estudian diferentes aspectos relacionados con el hongo *Cryphonectria parasitica*. Los documentos muestran estudios de diversidad de la compatibilidad vegetativa. La invención reivindicada en la solicitud de patente no se ha encontrado en el estado de la técnica, por tanto es nueva. A partir de la información divulgada en cualquiera de los documentos citados, no resultaría evidente para un experto en la materia, el desarrollo de la composición reivindicada en la solicitud de patente, por ello, la invención reivindicada presenta actividad inventiva. Es decir, las reivindicaciones 1-10 de la solicitud de patente presentan novedad y actividad inventiva, según lo establecido en los artículos 6 y 8 de la LP11/86.