

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 613 583**

21 Número de solicitud: 201631636

51 Int. Cl.:

A01D 46/00

(2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

21.12.2016

43 Fecha de publicación de la solicitud:

24.05.2017

Fecha de concesión:

11.12.2017

45 Fecha de publicación de la concesión:

18.12.2017

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA (100.0%)
Vicerrectorado de Investigación, Transferencia e
Innovación. Avda. de Elvas, s/n
06006 Badajoz (Badajoz) ES**

72 Inventor/es:

GÓMEZ JIMÉNEZ, María Carmen

54 Título: **PROCEDIMIENTO PARA FOMENTAR LA ABSCISION DE LA ACEITUNA Y FACILITAR SU RECOLECCION MEDIANTE LA APLICACION DE N-NITRO-L-ARGININA METIL ÉSTER (L-NAME)**

57 Resumen:

Procedimiento para fomentar la abscisión de la aceituna y facilitar su recolección mediante la aplicación de n-nitro-l-arginina metil éster (L-NAME). La presente invención se refiere a un procedimiento para fomentar la abscisión de la aceituna, en especial, para facilitar su recolección mediante la aplicación de L-NAME en forma de pulverización foliar antes de la recolección de la aceituna. El tratamiento de los olivos con L-NAME reduce la fuerza de retención de la aceituna al árbol y de este modo, facilita que éstas puedan recolectarse económicamente con escaso auxilio manual o mecánico dentro de la época adecuada de recogida y ello, sin ocasionar desfoliación de los olivos.

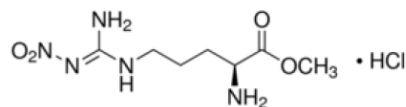


FIG. 1

ES 2 613 583 B1

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

PROCEDIMIENTO PARA FOMENTAR LA ABSCISIÓN DE LA ACEITUNA Y FACILITAR SU RECOLECCIÓN MEDIANTE LA APLICACIÓN DE N-NITRO-L-ARGININA METIL ÉSTER (L-NAME)

5

DESCRIPCIÓN

SECTOR DE LA TÉCNICA

Esta invención se relaciona con un nuevo procedimiento, en el área de la agricultura, para fomentar la abscisión del fruto mediante tratamiento con N-Nitro-L-arginina metil éster (L-NAME). Concretamente, la invención se relaciona con un procedimiento para disminuir la fuerza de retención de la aceituna al árbol y facilitar la recolección de la aceituna manual o mecánicamente.

ESTADO DE LA TÉCNICA

La abscisión es un proceso complejo, programado genéticamente y regulado durante el desarrollo, a través del cual los órganos multicelulares tales como hojas, flores, o frutos llegan a separarse del cuerpo de la planta (A.B. Bleecker y S.E. Patterson. The Plant Cell 9 (1997) 1169; J.E. Taylor y C.A. Whitelaw. New Phytologist 151 (2001) 323; J.A. Roberts, K.A. Elliot, y Z.H. González-Carranza. Annual Review of Plant Biology. 53 (2002) 131). La abscisión ocurre en sitios predeterminados llamados las zonas de abscisión (ZA), que consisten en algunas capas de pequeñas células que responden de diferentes maneras a las células vecinas como a las señales hormonales o ambientales (J.A. Roberts, K.A. Elliot, y Z.H. González-Carranza. Annual Review of Plant Biology. 53 (2002) 131; Z.H. Gonzalez-Carranza, A.A. Shahid, L. Zhang, Y. Liu, U. Ninsuwan y J.A. Roberts. Plant Physiology 160 (2012) 1342).

En la abscisión del fruto, el conocimiento de los mecanismos implicados es esencial para desarrollar estrategias de control y mejora de la recolección de la cosecha. Los avances en los análisis genéticos y moleculares sobre la abscisión de frutos carnosos han estado limitados por la falta de material genético experimental apropiado (genotipos o mutantes de abscisión) y por la pequeña cantidad de células de la ZA disponibles en la especie modelos para estos análisis. Asimismo, la abscisión del fruto carnoso es un proceso altamente variable según la especie y las variedades. En los últimos años, la combinación de los estudios fisiológicos, genéticos y genómicos clásicos han demostrado la implicación de múltiples rutas

y procesos coordinados en la abscisión (Gonzalez-Carranza, A.A. Shahid, L. Zhang, Y. Liu, U. Ninsuwan y J.A. Roberts. *Plant Physiology* 160 (2012) 1342; L. H. Estornell, J. Agustí, P. Merelo, M. Talón y F.R. Tadeo. *Plant Science* 199 (2013) 48; C. Niederhuth, S.K. Cho, K Seitz y J.C. Walker. *Journal of Integrative Plant Biology* 55 (2013) 1251). Entre estas rutas y procesos implicados está la señalización hormonal de etileno, auxina, ácido abscísico, y ácido jasmónico (M. Ogawa, P. Kay, S. Wilson, S.M. Swain. *Plant Cell* 21 (2009) 216), así como la vía de HAE HSL2, el tráfico transmembrana y respuestas posteriores reguladas por estas señales (C. Niederhuth, S.K. Cho, K Seitz y J.C. Walker. *Journal of Integrative Plant Biology* 55 (2013) 1251). Sin embargo, para esclarecer la red (s) que integra estas distintas rutas y procesos se ha requerido de estudios de genómica, como los microarrays y estudios de RNA-seq utilizados en *Arabidopsis* (S. Cai y C.C. Lashbrook. *Plant Physiology* 146 (2008) 1305; C.C. Lashbrook y S. Cai *Plant Signal. Behav.* 3 (2008) 733; C. Niederhuth, S.K. Cho, K Seitz y J.C. Walker. *Journal of Integrative Plant Biology* 55 (2013) 1251). En otras especies vegetales distintas de *Arabidopsis*, enfoques genómicos funcionales se están aplicando para estudiar la abscisión. Los microarrays se han utilizado para estudiar los cambios de expresión génica de la abscisión inducida por etileno en cítricos (J. Agustí, P. Merelo, M. Cercós, F.R. Tadeo y M. Talón. *BMC Plant Biol.* 23 (2009) 127), manzana (A. Botton, G. Eccher, C. Forcato, A. Ferrarini, M. Begheldo, M. Zermiani, S. Moscatello, A. Battistelli, R. Velasco, B. Ruperti, A. Ramina. *Plant Physiol.* 155 (2011) 185; H. Zhu, C.D. Dardick, E. P. Beers, A.M. Callanhan, R. Xia y R. Yuan. *BMC Plant Biol.* 11: (2011) 138) y tomate (S. Meir, S. Philosoph-Hadas, S. Philosoph-Hadas, S. Sundaresan, K.S.V. Selvaraj, S. Burd, R. Ophir, B. Kochanek, M.S. Reid, C. Jiang y A. Lers. *Plant Physiol.* 154 (2010) 1929; T. Nakano, M. Fujisawa, Y. Shima y Y. Ito. *BMC Plant Biol.* 9 (2013) 13). Estos estudios han revelado cambios en las enzimas que modifican la pared celular, así como la interacción hormonal y factores como el estrés nutricional en la abscisión. Enfoques basados en la secuenciación del transcriptoma también se han utilizado para analizar la abscisión del fruto (C. Zhou, A.N. Lakso, T.L. Robinson y S. Gan. *Mol. Genet. Genom.* 280 (2008) 83; J. Corbacho, F. Romojaro, J.C. Pech, A. Latché y M.C. Gomez-Jimenez. *PLoS One.* 8 (2013) e58363).

En olivo (*Olea europaea* L.), cultivo de gran interés económico en España situándose en el primer lugar mundial en superficie y producción de aceite de oliva y aceituna de mesa, la regulación de la abscisión del fruto constituye un problema agronómico. En la actualidad, existen variedades de olivo, tales como “Manzanilla Sevillana” (variedad de aceituna de mesa) y “Arbequina” (variedad de aceite), cuyos frutos presentan una alta fuerza de retención en el momento de su recolección y por consiguiente, la eficacia de la recolección mecánica es muy

baja, provocando un aumento de los costes de recolección del fruto, lo que representa, hoy, un coste crítico al agricultor. El uso de productos químicos que faciliten la abscisión de la aceituna se ha estado investigando desde hace más de cuarenta años (H.T. Hartmann, A. Tombesi y J. Whisler. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 95 (1970) 635). Los mejores productos para facilitar la abscisión de la aceituna han sido los liberadores de etileno (H.T. Hartmann, A. Tombesi y J. Whisler. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 95 (1970) 635; G.C. Martin. Acta Hort. 356 (1994) 284; S. Bartolini, C. Cantini, y C. Vitagliano Acta Hort. 329 (1993) 249; J. Burns, L. Ferguson, K. Glozer, W.H. Krueger, R.C. Rosecrance. Hortscience 43 (2008) 1449; M.C. Parra-Lobato y M.C. Gomez-Jimenez. J Exp Bot. 62 (2011) 4447), tales como: ácido 2-cloroetilfosfónico (ethephon, ethrel), 2-cloroetil-tris-(2-metoxi-etoxi)-silano (Alsol) y ácido 2-cloroetilsulfónico, que liberan etileno, causando así una disminución de la fuerza de retención de la aceituna, y consiguientemente facilitando su recolección. Sin embargo, estos productos liberadores de etileno ejercen efectos secundarios negativos para el olivar, como son la caída de la hoja (G. Lang y G. Martin G. Journal of the American Society for the Horticultural Science, 114 (1989) 134), la aceleración de la maduración de la aceituna (A.I. Özgüven, F. Özgüven, Ö. Gezerel, H. Tath y C. Yilmaz. Acta Hort. 463 (1998) 359), reducción en el índice de floración del año siguiente (H.T. Hartmann, A. Tombesi y J. Whisler. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 95 (1970) 635) y además, estos productos tienen su mayor desventaja en su toxicidad propia y la de ciertos productos de su degradación, al liberar el etileno.

El ácido 1-amino-ciclopropano carboxílico (precursor de etileno) se sabe que es capaz de inducir la abscisión de la aceituna (véase, por ejemplo, ES Pat. Nº 496303). También se sabe que la adición de ciertas sustancias naturales a los olivos puede favorecer la abscisión del fruto (véase, por ejemplo, ES Pat. Nº 328941). Sin embargo, estos productos químicos tienen su mayor desventaja en la activación de la maduración del fruto lo que no es deseable en la recolección de variedades de aceituna de mesa, tales como la "Manzanilla Sevillana".

En la actualidad, para facilitar la abscisión de la aceituna y la recolección de las variedades de aceituna de mesa se ha comercializado un producto denominado CLOUD (ethephon 48% [SL] P/V) por la empresa SAPEC AGRO. Sin embargo, este tratamiento sigue teniendo efectos negativos sobre el olivar ya mencionados anteriormente, como activación de la caída de la hoja, activación de la maduración del fruto y la toxicidad ambiental. En los últimos años, se han realizado experimentos pulverizando foliarmente ethephon con fosfato monopotásico comprobando que este producto causa abscisión del fruto con menor caída de hojas en olivo (D. Barranco, O. Arquero, C. Navarro, y H.F. Rapoport. HortScience 39 (2004)1313, sin embargo, los resultados son altamente dependiente de las condiciones meteorológicas y del

estado de los cultivos, y por consiguiente, no se han podido reproducir (S. Castro-García, G.L. Blanco Roldán, F. Jiménez-Jiménez, J.A. Gil-Ribes, L. Ferguson, K. Glozer, W.H. Krueger, E.J. Fichtner, J.K. Burns, J.A. Miles y U.A. Rosa. *Acta Hort.* 965 (2012) 29; I. Zipori, A. Dag y Y. Tugendhaft. *Hortscience* 49 (2014) 55). Por lo tanto, aún no se ha encontrado un agente activo de la abscisión del fruto para facilitar la recolección mecanizada en las variedades de aceituna de mesa. En este sentido, el sector demanda, actualmente, el uso de compuestos que promuevan la abscisión del fruto para mejorar la recolección mecanizada en variedades de aceitunas de mesa, y por consiguiente, para reducir los costes de recolección de la cosecha, sin efectos negativos sobre el olivar.

10

El procedimiento objeto de esta solicitud de patente viene a solucionar este problema mediante el empleo de *N_w*-Nitro-L-arginina metil éster clorhidrato, también conocido como L-*N^G*-Nitroarginina metil éster o L-NAME. L-NAME tiene la fórmula molecular $C_7H_{15}N_5O_4 \cdot HCl$ y el peso molecular 269.69 g/mol (CAS #: 51298-62-5). L-NAME, inhibidor competitivo de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS), es un análogo de la arginina que inhibe la producción de óxido nítrico. La estructura química de L-NAME se muestra en la Figura 1.

15

El óxido nítrico, un producto del metabolismo del nitrógeno, ha surgido como un importante mensajero intercelular e intracelular controlando numerosos procesos fisiológicos (A. Besson-Bard, A. Pugin y D. Wendehenne. *Annual Review of Plant Biology* 59 (2008) 21). En las plantas, la síntesis de óxido nítrico es mediada principalmente por (i) la reducción de nitrito por la nitrato reductasa (NR; W.M. Kaiser, H. Weiner, A. Kandlbinder, C.B. Tsai, P. Rockel, M. Sonoda y E. Planchet. *Journal of Experimental Botany* 53 (2002) 875), la transferencia de electrones mitocondrial (E. Planchet, K. Jagadis Gupta, M. Sonoda y W.M. Kaiser. *The Plant Journal* 41 (2005) 732), o una forma no enzimática (P.C. Bethke, M.R. Badger y R.L. Jones. *The Plant Cell* 16 (2004) 332) y (ii) la oxidación de arginina por la enzima NOS (F.Q. Guo, M. Okamoto y N.M. Crawford. *Science* 302 (2003) 100). Sin embargo, sigue habiendo cierta incertidumbre acerca de la naturaleza y el momento de la síntesis del óxido nítrico por estos diversos mecanismos. Se ha demostrado que el óxido nítrico desempeña múltiples funciones biológicas en las plantas, en particular, en los procesos de desarrollo tales como la germinación, la organogénesis raíz, cierre de los estomas, floración y senescencia (L. Lamattina, C. García-Mata, M. Graziano y G. Pagnussat. *Annual Review of Plant Biology* 54 (2003) 109); así como en respuestas a estrés (M. Arasimowicz-Jelonek, J. Floryszak-Wieczorek y J. Kubis. *Plant Science* 177 (2009) 682; W. Ma, W. Xu, Y. Chen, Z. He y M. Ma. *Planta* 232 (2010) 325). Sin embargo, poco se conoce acerca del óxido nítrico

20

25

30

endógeno durante el proceso de abscisión. Nosotros hemos demostrado (M.C. Parra-Lobato y M.C. Gomez-Jimenez. Journal of Experimental Botany. 62 (2011) 4447) una correlación entre la abscisión del fruto y una disminución significativa en la emisión de óxido nítrico en olivo, sin embargo, se desconocen las enzimas que participan en el metabolismo de óxido nítrico durante la abscisión.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un procedimiento para fomentar la abscisión de la aceituna, en especial, para facilitar su recolección mediante la aplicación de L-NAME en forma de pulverización foliar antes de la recolección de la aceituna. El tratamiento de los olivos con L-NAME reduce la fuerza de retención de la aceituna al árbol y de este modo, facilita que éstas puedan recolectarse económicamente con escaso auxilio manual o mecánico dentro de la época adecuada de recogida y ello sin ocasionar desfoliación del olivo.

La recolección es la operación más costosa en el olivar, superando el 50% de los gastos totales de cultivo. En las últimas décadas la recolección se ha mecanizado, aunque para variedades de aceituna de mesa y variedades de aceite de muy temprana recolección, la eficacia de derribo es muy baja debido a la alta fuerza de retención del fruto y por consiguiente, es obligada la recolección manual encareciendo los costes de recolección. En este sentido, la producción de aceituna de mesa a nivel mundial se está convirtiendo en insostenible debido al estancamiento en la rentabilidad económica y al aumento de los costes de la recolección manual. Con la necesidad de mecanizar la recolección de la aceituna de mesa por la problemática existente de los costes de la recolección manual, el sector demanda el uso de compuestos químicos que provoquen la abscisión del fruto, no afectando en la medida de lo posible al olivo.

El principal problema técnico al que se dirige esta invención, tiene en cuenta que en estos momentos no existe una solución definitiva para facilitar la recolección de la aceituna en variedades de aceituna de mesa y en variedades de aceite que se recogen muy temprano, tanto si la recolección es manual como si se lleva a cabo de forma mecanizada, y consecuentemente, para reducir los elevados costes de la recolección de la aceituna.

La presente invención va dirigida a solventar la necesidad del sector olivarero de un agente que favorezca la abscisión de la aceituna, sobre todo, en variedades de aceituna de mesa

(“Manzanilla Sevillana”) y en variedades de aceite que se recogen muy temprano (“Arbequina”) sin provocar daños en el olivo, como la desfoliación y la aceleración de la maduración del fruto, para así reducir los costes de la recolección de la aceituna. Se ha encontrado, sorprendentemente, que L-NAME a una determinada concentración tiene una acción favorable sobre la abscisión de la aceituna aplicada días antes de la recolección sin provocar daños en el olivo. La invención proporciona una solución a la necesidad existente mediante el empleo de L-NAME. Por lo que la presente invención tiene por objeto presentar un nuevo procedimiento para favorecer la abscisión de la aceituna, así como un nuevo producto que activa la abscisión del fruto, especialmente para variedades de aceituna de mesa y variedades de aceite de cosecha muy temprana. Además, se ha encontrado un producto para la abscisión de la aceituna que no presenta las desventajas arriba especificadas.

La aplicación de este producto permite que la recogida del fruto se efectúe en la época adecuada, por lo que al fruto está en óptimas condiciones para el consumo como aceituna de mesa, pudiéndose hacer escalonadamente la recolección, según vaya admitiéndola las almazaras. Este producto es totalmente inofensivo y su aplicación es facilísima, se puede efectuar en forma de lluvia con cualquiera de los aparatos utilizados en la pulverización de productos insecticidas.

Las principales ventajas de la presente invención son:

- Disminución notablemente de los costes de recolección, sobre todo, en variedades de aceituna de mesa y variedades de aceite que se cosechan muy temprano.
- Reducción de los daños al olivo (desfoliación).
- Permite cosechar en el momento óptimo.
- Reducción del tiempo de vibrado.
- Aumento de los porcentajes de derribo de aceituna.
- Aumento de la rentabilidad de la explotación.

BREVE DESCRIPCIÓN DEL CONTENIDO DE LAS FIGURAS

La figura 1 representa la estructura química de L-NAME

La figura 2 muestra las ramas de la variedad "Manzanilla Sevillana" donde:

- a) Ramas tratadas con agua (control) durante 3 días.
- b) Ramas tratadas con agua (control) durante 6 días.
- c) Ramas tratadas con 2500 ppm de L-NAME durante 3 días.
- 5 d) Ramas tratadas con 2500 ppm de L-NAME durante 6 días.

La figura 3 muestra las ramas de la variedad "Arbequina" donde:

- a) Ramas tratadas con agua (control) durante 3 días.
- b) Ramas tratadas con agua (control) durante 6 días.
- c) Ramas tratadas con 2500 ppm de L-NAME durante 3 días.
- 10 d) Ramas tratadas con 2500 ppm de L-NAME durante 6 días.

El procedimiento según la invención se caracteriza porque los olivos portadores de aceitunas se tratan antes de la recolección con L-NAME. La utilización de L-NAME según la invención posibilita que tales frutos se desprendan con escaso auxilio manual o mecánico debido a la
15 disminución de la fuerza de retención del fruto y por ello, puede recolectarse económicamente sin provocar caída de la hoja en el olivo.

L-NAME puede aplicarse mediante atomización de los árboles con una solución acuosa que contiene L-NAME según la invención a la concentración 2500 ppm (partes por millón). Se
20 preparan disoluciones acuosas de L-NAME con concentración de 2500 ppm. El tratamiento de los olivos con disoluciones de L-NAME se efectúa de 3 a 6 días antes de la recolección y origina una disminución de la fuerza de retención del fruto, facilitando el desprendimiento de la aceituna. Es ventajoso el rociado o pulverizado de las hojas y frutos de los olivos a razón de unos 5-10 L/árbol. Transcurridos 3-6 días desde el tratamiento, se agitan las ramas del
25 árbol, manual o mecánicamente, para provocar la caída de los frutos.

De aquí se desprende que la invención reúne todas las características y propiedades necesarias, para que de forma natural caiga el fruto en el tiempo previsto de antemano. Descrita suficientemente la naturaleza y alcance del presente invento, así como la manera de poderlo llevar a la práctica, se hace constar que los términos en que queda redactada esta

memoria son ciertos y fiel reflejo del objeto descrito, debiéndose tomar con carácter amplio y nunca en forma limitativa.

EJEMPLO DE REALIZACIÓN DE LA INVENCION

5 Ejemplo 1.

“PROCEDIMIENTO PARA FOMENTAR LA ABSCISION DE LA ACEITUNA Y FACILITAR SU RECOLECCION MEDIANTE LA APLICACION DE N-NITRO-L-ARGININA METIL ÉSTER (L-NAME)” en olivos de la variedad “Manzanilla Sevillana”.

10 Para determinar la acción de L-NAME sobre la abscisión de las aceitunas se realizó el siguiente ensayo en el campo:

El ensayo en campo se realizó en árboles de 20-25 años de la variedad de olivo “Manzanilla Sevillana” cultivados bajo riego por goteo y riego con fertilizantes adecuados en solución en una explotación de Olivenza (Badajoz). El tratamiento se realizó sobre un total de 20 olivos
15 de la variedad “Manzanilla Sevillana”, seleccionados por uniformidad de tamaño y carga de fruto.

Para la preparación del tratamiento de la disolución acuosa de 2500 ppm de L-NAME se disolvieron 5 g de L-NAME (Sigma-Aldrich) en agua hasta un volumen de 2000 mL.

20 Se pulverizan los olivos en forma de disolución acuosa (2000 mL por rama) una vez a los 6 días antes de la recolección de la aceituna. Es ventajoso el rociado o pulverizado de la disolución acuosa de las hojas y frutos de los árboles. En cada olivo, se seleccionaron dos ramas uniformes: una rama control (aplicación de 2000 mL de agua) y una rama tratada (aplicación de 2000 mL de 2500 ppm de L-NAME) en un total de 20 olivos de la variedad
25 “Manzanilla Sevillana”.

Con objeto de conseguir una idea medible del proceso de abscisión del fruto a los 3 y 6 días del tratamiento, se midió la fuerza de retención del fruto (FRF), en kg fuerza (kgf), mediante un dinamómetro (Correx, Suiza). Para ello, las medidas de FRF se realizaron a 50 frutos por
30 cada rama de los 20 árboles seleccionados a los 3 días y a los 6 días del tratamiento. Por consiguiente, los frutos control se trataron con agua a los 6 días, y se recogieron de las ramas de los mismos árboles tratados con L-NAME a los 3 y 6 días del tratamiento. En la Figura 2 se muestra las ramas de la variedad “Manzanilla Sevillana”, donde a) son las ramas tratadas con agua (control) durante 3 días; b) las ramas tratadas con agua (control) durante 6 días de
35 tratamiento; c) las ramas tratadas con 2500 ppm de L-NAME durante 3 días y d) las ramas tratadas con 2500 ppm de L-NAME durante 6 días de tratamiento.

En la siguiente tabla, se indica el valor medio de la FRF medida en los frutos de las ramas controles (tratamiento con agua) y las ramas tratadas (tratamiento con 2500 ppm L-NAME) de la variedad “Manzanilla Sevillana” a los 3 y 6 días del tratamiento (100 frutos/árbol). La aplicación de de L-NAME disminuyó la FRF de las aceitunas de la variedad “Manzanilla Sevillana” y no provocó defoliación en el olivo.

Tabla 1. Fuerza de retención del fruto y % defoliación en olivos de la variedad “Manzanilla Sevillana” a los 3 y 6 días después del tratamiento con 2500 ppm de L-NAME y con agua (control). Los resultados son media $\pm$ DE (n=1000).

	Tiempo de tratamiento (días)	Fuerza de retención del fruto (kgf)	Defoliación (%)
Control	3	0.70 $\pm$ 0.04	0
	6	0.68 $\pm$ 0.06	0
2500 ppm L-NAME	3	0.32 $\pm$ 0.08	0
	6	0.30 $\pm$ 0.08	0

Transcurridos 3-6 días desde el tratamiento, se agitan las ramas del árbol, manual o mecánicamente, para provocar la caída del fruto y se recoge la aceituna.

Ejemplo 2.

“PROCEDIMIENTO PARA FOMENTAR LA ABSCISIÓN DE LA ACEITUNA Y FACILITAR SU RECOLECCIÓN MEDIANTE LA APLICACIÓN DE N-NITRO-L-ARGININA METIL ÉSTER (L-NAME)” en olivos de la variedad “Arbequina”.

El ensayo en campo se realizó en árboles de 20-25 años de la variedad de olivo “Arbequina” cultivados bajo riego por goteo y riego con fertilizantes adecuados en solución en una explotación de Olivenza (Badajoz). El tratamiento se realizó sobre un total de 20 olivos de la variedad “Arbequina”, seleccionados por uniformidad de tamaño y carga de fruto.

Para la preparación del tratamiento de la disolución acuosa de 2500 ppm de L-NAME se disolvieron 5 g de L-NAME (Sigma-Aldrich) en agua hasta un volumen de 2000 mL.

Se pulverizan los olivos en forma de disolución acuosa (2000 mL por rama) una vez a los 6 días antes de la recolección de la aceituna. Es ventajoso el rociado o pulverizado de la disolución acuosa de las hojas y frutos de los árboles. En cada olivo, se seleccionaron dos ramas uniformes: una rama control (aplicación de 2000 mL de agua) y una rama tratada

(aplicación de 2000 mL de 2500 ppm de L-NAME) en un total de 20 olivos de la variedad “Arbequina”.

Con objeto de conseguir una idea medible del proceso de abscisión del fruto a los 3 y 6 días del tratamiento, se midió la fuerza de retención del fruto (FRF), en kg fuerza (kgf), mediante un dinamómetro (Correx, Suiza). Para ello, las medidas de FRF se realizaron a 50 frutos por cada rama de los 20 árboles seleccionados a los 3 días y a los 6 días del tratamiento. Por consiguiente, los frutos control se trataron con agua a los 6 días, y se recogieron de las ramas de los mismos árboles tratados con L-NAME a los 3 y 6 días del tratamiento. En la Figura 3 se muestra las ramas de la variedad “Arbequina”, donde a) son las ramas tratadas con agua (control) durante 3 días; b) las ramas tratadas con agua (control) durante 6 días de tratamiento; c) las ramas tratadas con 2500 ppm de L-NAME durante 3 días y d) las ramas tratadas con 2500 ppm de L-NAME durante 6 días de tratamiento.

En la siguiente tabla, se indica el valor medio de la FRF medida en los frutos de las ramas controles (tratamiento con agua) y las ramas tratadas (tratamiento con 2500 ppm L-NAME) de la variedad “Arbequina” a los 3 y 6 días del tratamiento (100 frutos/árbol). La aplicación de L-NAME disminuyó la FRF de las aceitunas de la variedad “Arbequina” y no provocó defoliación en el olivo.

Tabla 2. Fuerza de retención del fruto y % defoliación en olivos de la variedad “Arbequina” a los 3 y 6 días después del tratamiento con 2500 ppm de L-NAME y con agua (control). Los resultados son media $\pm$ DE (n=1000).

	Tiempo de tratamiento (días)	Fuerza de retención del fruto (kgf)	Defoliación (%)
Control	3	0.64 $\pm$ 0.10	0
	6	0.62 $\pm$ 0.08	0
2500 ppm L-NAME	3	0.40 $\pm$ 0.06	0
	6	0.38 $\pm$ 0.04	0

Transcurridos 3-6 días desde el tratamiento, se agitan las ramas del árbol, manual o mecánicamente, para provocar la caída del fruto y se recoge la aceituna.

REIVINDICACIONES

- 5 1. PROCEDIMIENTO PARA FOMENTAR LA ABSCISIÓN DE LA ACEITUNA Y FACILITAR
SU RECOLECCIÓN MEDIANTE LA APLICACIÓN DE N-NITRO-L-ARGININA METIL ÉSTER
(L-NAME), caracterizado porque los olivos se tratan, de 3 a 6 días antes de la recolección de
las aceitunas, mediante pulverización o atomización foliar con una disolución acuosa de L-
NAME, que origina una disminución de la fuerza de retención de la aceituna al árbol,
10 procediéndose posteriormente a la agitación manual o mecánica del árbol.
2. Un procedimiento, según reivindicación 1, caracterizado porque la concentración de L-
NAME en la disolución es 2500 partes por millón.
3. Un procedimiento, según reivindicación 1, en donde los olivos son los olivos de la variedad
"Manzanilla Sevillana".
- 15 4. Un procedimiento, según reivindicación 1, en donde los olivos son los olivos de la variedad
"Arbequina".

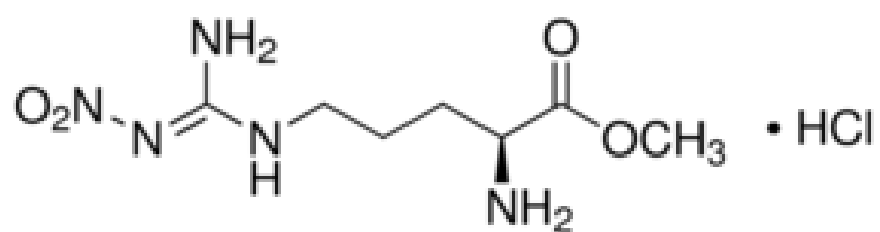


FIG. 1

a)



b)



c)



d)



FIG. 2

a)



b)



c)



d)



FIG. 3



- ②① N.º solicitud: 201631636
②② Fecha de presentación de la solicitud: 21.12.2016
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **A01D46/00** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	Burns Jacqueline K et al. Screening fruit loosening agents for black ripe processed table olives. <i>HortScience</i> . 31/07/2008, Vol. 43, Páginas 1449-1453, ISSN 0018-5345, resumen	1-4
A	Sessiz A et al. Olive removal with pneumatic branch shaker and abscission chemical. <i>Journal of food engineering</i> . 31/08/2006, Vol. 76, Páginas 148-153, ISSN 0260-8774, resumen	1-4
A	Barranco Diego et al. Monopotassium phosphate for olive fruit abscission. <i>HortScience</i> . 30/09/2004, Vol. 39, Páginas 1313-1314, ISSN 0018-5345 (ISSN print), resumen	1-4
A	Banno Kiyoshi et al. The role of phosphorus as an abscission-inducing agent for olive leaves and fruit. <i>J. Amer. Soc. Hort. Sci.</i> 1993, Vol. 118, Páginas 599-604, ISSN 0003-1062, resumen	1-4

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
09.05.2017

Examinador
I. Rueda Molíns

Página
1/4

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

A01D

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, XPESP

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 09.05.2017

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-4	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-4	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	Burns Jacqueline K et al.Screening fruit loosening agents for black ripe processed table olives. <i>HortScience</i> . Vol. 43, Páginas 1449-1453, ISSN 0018-5345.	31.07.2008
D02	Sessiz A et al.Olive removal with pneumatic branch shaker and abscission chemical. <i>Journal of food engineering</i> . Vol.76, Páginas 148-153, ISSN 0260-8774	31.08.2006
D03	Barranco Diego et al.Monopotassium phosphate for olive fruit abscission. <i>HortScience</i> . Vol. 39, Páginas 1313-1314, ISSN 0018-5345 (ISSN print)	30.09.2004
D04	Banno Kiyoshi et al.The role of phosphorus as an abscission-inducing agent for olive leaves and fruit.. <i>J.Amer.Soc. Hort. Sci.</i> Vol. 118, Páginas 599-604, ISSN 0003-1062	1993

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)**

Se considera que los documentos D01-D04 son los documentos del estado de la técnica más próximos al objeto de la solicitud. Estos documentos no afectan a la patentabilidad de las reivindicaciones tal y como se expone a continuación:

Reivindicaciones 1-4

En los documentos D01 y D02 se divulga como el ácido 2-cloroetilfosfónico fomenta la abscisión de la aceituna.

El documento D03 muestra el uso de fosfato monopotásico para facilitar la abscisión de la aceituna.

En el documento D04 se estudia el papel del fósforo como agente inductor de la abscisión, tanto en hojas de olivo como en aceitunas.

En ninguno de los documentos citados se divulga un método para fomentar la abscisión de la aceituna y facilitar su recolección mediante la aplicación de N-nitro-L-arginina metil ester. Teniendo en cuenta cualquiera de los documentos citados, no resultaría evidente, para un experto en la materia el uso de N-nitro-L-arginina metil ester para mejorar la abscisión de la aceituna y su recolección. Por tanto, se considera que las reivindicaciones 1-4 de la solicitud de patente presentan novedad y actividad inventiva, según lo establecido en los artículos 6 y 8 de la LP11/86.

En conclusión, se considera que las reivindicaciones 1-4 de la solicitud de patente satisfacen los requisitos de patentabilidad establecidos en el artículo 4.1 de la LP11/86.