

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 616 141**

21 Número de solicitud: 201631565

51 Int. Cl.:

A01N 43/16 (2006.01)

A01N 65/12 (2009.01)

A01N 65/20 (2009.01)

A01P 5/00 (2006.01)

A01P 5/00 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

09.12.2016

43 Fecha de publicación de la solicitud:

09.06.2017

71 Solicitantes:

**UNIVERSITAT D'ALACANT / UNIVERSIDAD DE
ALICANTE (100.0%)**

**Edificio Torre de Control. Crta. San Vicente del
Raspeig, s/n**

03690 SAN VICENTE DEL RASPEIG (Alicante) ES

72 Inventor/es:

LOPEZ MOYA, Federico y

LOPEZ LLORCA, Luis Vicente

74 Agente/Representante:

TEMIÑO CENICEROS, Ignacio

54 Título: **COMPOSICIONES SINÉRGICAS DE QUITOSANO**

57 Resumen:

Composiciones sinérgicas de quitosano.

La presente invención se refiere a una composición sinérgica de quitosano y un extracto vegetal con actividad nematocida para uso fitosanitario en el tratamiento de infecciones producidas por nematodos.

ES 2 616 141 A1

DESCRIPCIÓN

COMPOSICIONES SINÉRGICAS DE QUITOSANO

Campo de la invención

La presente invención se encuadra en el campo general de la agricultura y en particular, se refiere a composiciones sinérgicas de quitosano con extractos vegetales para el control de nematodos fitopatógenos.

Estado de la técnica

Los nematodos son uno de los grupos de organismos que causan mayor número de pérdidas económicas en cultivos hortícolas. Las pérdidas de cosecha anuales estimadas debidas a nematodos parásitos de plantas en la producción agrícola mundial se aproxima al 11% y en términos absolutos las pérdidas económicas anuales se calculan en torno a los 80 billones de dólares (Agrios, G.N. 1991. Fitopatología. Editorial Limusa. México. pp. 678-681).

Ante la enorme problemática que presentan estos organismos y ante el creciente aumento en las restricciones nacionales y europeas en el uso de compuestos antagonistas para estos organismos, surge la necesidad de desarrollar nuevas moléculas de procedencia natural para disminuir el impacto que causan estos nematodos. Para ello se proponen nuevas moléculas procedentes de extractos vegetales ("botanicals") u originales de fuentes naturales, como es el caso del quitosano.

El quitosano es un compuesto de origen natural (derivado de la quitina) que se genera en los organismos vivos por desacetilación enzimática de la quitina. En la actualidad el quitosano es un compuesto con un enorme potencial que ha permitido lograr importantes avances en diferentes áreas de conocimiento, destacando de forma significativa en agricultura. El quitosano es además, un compuesto que presenta un gran potencial, por su actividad antimicrobiana y antifúngica en particular. Este compuesto se caracteriza por desestabilizar las membranas celulares en hongos fitopatógenos (*Fusarium oxysporum*; *Gaeumannomyces graminis*; etc) (Palma-Guerrero, J., López-Jimenez, J. A., Pérez-Berná, A.J., Huang, I.-C., Jansson, H.-B., Salinas, J., Villalaín, J., Read N.D., López Llorca, L.V. (2010). Membrane fluidity determinates sensitivity of filamentous fungi to chitosan. Molecular Microbiology 75 (4), pp. 1021-1032) es capaz de provocar un aumento significativo de las especies reactivas de oxígeno en hongos expuestos a quitosano, provocando la muerte (Lopez-Moya F, Maria F. Colom-Valiente, Pascual Martinez-Peinado, Jesus E. Martinez-Lopez, Eduardo Puelles, Jose M. Sempere-Ortells and Luis V. Lopez-Llorca. (2015). Carbon and nitrogen limitation increase chitosan antifungal activity in *Neurospora crassa* and fungal human pathogens. Fungal Biology. 119 (2-3) 154-169). Esta característica ha permitido tener

en cuenta el quitosano como producto natural para el tratamiento de enfermedades en agricultura. Surgiendo en los últimos años algunas patentes que se refieren al uso del quitosano en este sentido, como por ejemplo, la patente ES 2521990 describe el uso de quitosano para aumentar la formación de apresorios en *Pochonia chlamydosporia* y/o
 5 aumentar la patogenicidad de *Pochonia chlamydosporia* sobre huevos de nematodos y para aumentar la colonización de raíces de plantas por *Pochonia chlamydosporia* sin afectar al desarrollo de las mismas.

Y la patente ES 2574588, que describe el uso del quitosano para incrementar la esporulación de hongos entomopatógenos y nematófagos.

10 Sin embargo, a pesar del reciente uso del quitosano en agricultura, aun es necesario proporcionar composiciones naturales a base de este compuesto que sean más efectivas a menor cantidad de principio activo, que tengan una forma de producción y aplicación más fácil y por supuesto, que no sean tóxicas ni para el cultivo en cuestión, ni para el medio ambiente en general.

15 **Breve descripción de la invención**

La presente invención soluciona los problemas descritos en el estado de la técnica ya que proporcionan una composición sinérgica a base de quitosano y extractos vegetales frente a nematodos fitopatógenos que causan graves pérdidas en los cultivos de enorme importancia económica.

20 Así pues, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a una composición sinérgica de quitosano y un extracto vegetal con actividad nematocida (de aquí en adelante, composición de la presente invención) para uso en el tratamiento de infecciones producidas por nematodos.

En una realización preferente, los nematodos son del género *Meloidogyne*, preferentemente,
 25 los nematodos son *M. javanica* y *M. incognata* y del género *Caenorhabditis*, preferentemente *C. elegans*.

En una realización particular, el extracto vegetal con actividad nematocida de la composición de la presente invención es seleccionado de entre el extracto de tagetes (TAC)), extracto de gliricidia (GS), y extracto de artemisa (AJ))

30 En una realización en particular, el quitosano se encuentra en una concentración comprendida entre 5-100 µg/ml. En una realización particular, la concentración de quitosano es de al menos 50 µg/ml. En otra realización particular, la concentración de quitosano está

comprendida entre 75-100 µg/ml.

En una realización en particular, la concentración de los extractos de tagetes (TAC), gliricidia (ExG) y artemisa (AJ) con actividad nematocida se encuentra en una dilución 1/100.

5 El extracto de tagetes usado en la presente invención se obtuvo mediante percloración con glicol, a partir de plantas enteras de tagete (*Tagete erecta*) (partes verdes, y pétalos). La metodología para obtener el extracto de artemisa (AJ) y gliricidia (GS), fue la misma que la utilizada para el extracto de tagetes (TAC).

10 En una realización en particular, el quitosano y el compuesto nematocida de la presente invención se aplican de forma conjunta. Más en particular, los compuestos de la composición sinérgica de la presente invención se aplican de forma simultánea o de forma secuencial. Independientemente del orden de aplicación de cada compuesto.

En una realización en particular, los compuestos de la presente invención se aplican en forma líquida.

Descripción de las figuras

15 La figura 1 muestra el efecto del quitosano sobre la mortalidad de *C. elegans* en su aplicación en líquido.

La figura 2 muestra el efecto de extracto de tagetes (TAC) sobre la mortalidad de *C. elegans* en su aplicación en líquido.

La figura 3 muestra el efecto sinérgico del quitosano y el extracto de tagetes (TAC).

20 La figura 4 muestra el efecto del quitosano sobre la mortalidad de *C. elegans* en su aplicación en líquido. Evaluación en tubos Eppendorf.

La figura 5 muestra el efecto de extracto de tagetes (TAC) sobre la mortalidad de *C. elegans* en su aplicación en líquido. Evaluación en tubos Eppendorf.

25 La figura 6 muestra la evaluación del efecto nematocida del quitosano sobre nematodos de la especie *M. incognita*.

La figura 7 muestra la evaluación del efecto nematocida del extracto de gliricidia (GS) (1/100) y el quitosano sobre nematodos de la especie *M. incognita*.

La figura 8 muestra la evaluación del efecto nematocida del quitosano sobre nematodos de la especie *M. incognita*.

30 La figura 9 muestra la evaluación del efecto nematocida del extracto de tagetes (TAC)

(1/100) y el quitosano sobre nematodos de la especie *M.incognita*.

La figura 10 muestra la evaluación del efecto nematocida del extracto de tagetes (TAC) (1/1000) y el quitosano sobre nematodos de la especie *M.incognita*.

La figura 11 muestra la evaluación del efecto nematocida del extracto de tagetes (TAC) (1/10000) y el quitosano sobre nematodos de la especie *M.incognita*.

La figura 12 muestra la eclosión de huevos de *M.javanica* en contacto durante 3 días con quitosano.

La figura 13 muestra la eclosión de huevos de *M.javanica* en contacto durante 3 días con quitosano y el extracto de artemisa (AJ) a una dilución 1/100.

La figura 14 muestra la eclosión de huevos de *M.javanica* en contacto durante 3 días con quitosano y el extracto de gliricidia (GS) a una dilución 1/1000.

La figura 15 muestra la eclosión de huevos de *M.javanica* en contacto durante 3 días con quitosano y el extracto de tagetes (TAC) a una dilución 1/100.

La figura 16 muestra la medida de la longitud máxima aérea de plantas de tomate infectadas con nematodos agalladores y tratadas con las formulaciones experimentales (Control+Nematodos (RKN); (AJ)+T8+RKN; ExT+T8+RKN; Nemagold+RKN; Oxamyl+RKN y T8+RKN).

La figura 17 muestra la medida del peso aéreo de plantas de tomate infectadas con nematodos agalladores y tratadas con las formulaciones experimentales Control+Nematodos (RKN); (AJ)+T8+RKN; ExT+T8+RKN; Nemagold+RKN; Oxamyl+RKN y T8+RKN).

La figura 18 muestra la medida de la longitud máxima radicular de plantas de tomate infectadas con nematodos agalladores y tratadas con las formulaciones Control+Nematodos (RKN); (AJ)+T8+RKN; ExT+T8+RKN; Nemagold+RKN; Oxamyl+RKN y T8+RKN).

La figura 19 muestra la medida del peso máximo radicular de plantas de tomate infectadas con nematodos agalladores y tratadas con las formulaciones experimentales Control+Nematodos (RKN); (AJ)+T8+RKN; ExT+T8+RKN; Nemagold+RKN; Oxamyl+RKN y T8+RKN.

La figura 20 muestra los valores de severidad de plantas de tomate infectadas con nematodos agalladores y tratadas con las formulaciones experimentales según el índice de agallamiento establecido por Bridge and Page (1980).

La figura 21 muestra la cuantificación final del número de tomates por tratamiento (Control+Nematodos (RKN); (AJ)+T8+RKN; ExT+T8+RKN; Nemagold+RKN; Oxamyl+RKN y T8+RKN).

La figura 22 muestra el peso total de tomates por tratamiento al final del experimento,
5 Control+Nematodos (RKN); (AJ)+T8+RKN; ExT+T8+RKN; Nemagold+RKN; Oxamyl+RKN y T8+RKN).

La figura 23 muestra la evolución temporal en el número de tomates por tratamiento, Control+Nematodos (RKN); (AJ)+T8+RKN; ExT+T8+RKN; Nemagold+RKN; Oxamyl+RKN y T8+RKN.

10 La figura 24 muestra la evolución temporal en el peso de tomates por tratamiento (Control+Nematodos (RKN); (AJ)+T8+RKN; ExT+T8+RKN; Nemagold+RKN; Oxamyl+RKN y T8+RKN).

Descripción detallada de la invención

*Ejemplo 1: Efecto sinérgico del quitosano junto con el compuesto extracto de plantas de
15 tagetes (TAC) sobre la mortalidad de C. elegans.*

Para comprobar el efecto del quitosano (T8) sobre el nematodo *C. elegans*, se prepararon distintas composiciones de quitosano con una concentración comprendida entre 0-100 µg/ml.

20 Tal y como muestra la figura 1, se observó una disminución del porcentaje de supervivencia del nematodo con la concentración de quitosano a partir de una concentración de 10 µg/ml hasta alcanzar un 32% de reducción de la supervivencia con respecto al control a la mayor concentración de quitosano ensayada.

A continuación, se comprobó el efecto del extracto de tagetes (*TAC*) sobre la mortalidad de *C. elegans* en su aplicación en líquido. Para ello se prepararon distintas disoluciones del
25 extracto de tagetes (*TAC*) (diluciones comprendidas entre 0-1/10000). Tras realizar una evaluación de la efectividad del extracto (*TAC*) sobre *C. elegans* en aplicación en líquido se determinó que la supervivencia de los nematodos se vio afectada de manera significativa por la presencia del extracto, observándose una disminución de la supervivencia del 40% a una concentración 1/100 del mismo, que se mantuvo de manera significativa con las
30 diluciones del producto, haciéndose menos efectiva a mayor dilución del mismo (FIG. 2).

Una vez comprobado el efecto de cada compuesto por separado sobre *C. elegans*, se procedió a comprobar el efecto que tenían los dos compuestos combinados.

Cuando realizamos el análisis de los resultados de la aplicación conjunta del extracto de tagetes (*TAC*) y el quitosano observamos (FIG.3) un efecto sinérgico del quitosano y el extracto tagetes (*TAC*).

5 Con el producto tagetes (*TAC*) altamente diluido (1/100) se observó sinergismo entre el extracto tagetes (*TAC*) y el quitosano hasta una concentración de 50 µg/ml, a dicha concentración de quitosano, independiente de la dilución del extracto tagetes (*TAC*), se observaron reducciones de la supervivencia respecto al control (sin quitosano) de 50% o más en algunos casos.

10 Estos experimentos fueron realizados en placas multipocillo y para confirmar dicho efecto, fueron repetidos en tubos desechables independientes (tipo Eppendorf), sobre todo para confirmar el efecto del quitosano sobre la supervivencia de *C. elegans* que se repitió en estas condiciones (FIG. 4). En esta gráfica se observan resultados muy similares a su equivalente en placas multipocillo (FIG. 1).

15 De nuevo se repitió el efecto inhibitorio del extracto tagetes (*TAC*) sobre la supervivencia de *C. elegans* (FIG. 5), observándose una reducción máxima de la supervivencia con el producto de un 20% a una dilución 1/100 del dicho extracto.

Ejemplo 2: Efecto del quitosano en combinación con extracto de plantas de gliricidia (Gliricidia (GS)) en aplicación líquida sobre M. incognita.

20 De nuevo se observó una reducción en el porcentaje de supervivencia de *M. incognita* debido al quitosano, que varió entre un 10 y 15% a 5 y 100 µg/ml, respectivamente Fig. 6). Cuando el extracto de gliricidia (GS) se utilizó en combinación con el quitosano, se observó, especialmente a la dilución 1/100 (FIG.7), un elevado efecto sinérgico dependiente de la concentración de quitosano entre los dos compuestos. Se apreciaron reducciones en la supervivencia entre casi un 10% a 5 µg/ml y más de un 20 % a la máxima concentración
25 (100 µg/ml) de este compuesto.

Ejemplo 3: Evaluación de la acción nematocida del extracto de tagetes (TAC) en combinación con el quitosano en aplicación líquida sobre M. incognita.

30 Como en los dos controles anteriores sin extracto vegetal, en esta ocasión (FIG 8), se apreció que el quitosano a 50 y a 100 µg/ml redujo por sí solo la supervivencia de *M. incognita*, en aproximadamente un 20%. Como en el caso del extracto Gliricidia (GS), cuando el extracto de tagetes (*TAC*) se combinó con el quitosano, se observó un efecto sinérgico de los dos compuestos en la reducción de la supervivencia de *M. incognita* (FIG 9).

Las mayores reducciones de la supervivencia, se produjeron a 75 y 100 µg/ml, de entre un 40 y un 50% respectivamente, observándose un claro efecto sinérgico entre el extracto de tagetes (TAC) y el quitosano. De nuevo, al diluir el extracto vegetal, no se apreció el efecto descrito anteriormente (FIG 10 y 11).

- 5 *Ejemplo 4: Evaluación de la eclosión de huevos de M. javanica tras estar en contacto con las formulaciones a base de quitosano y los extractos de Artemisa (AJ), Gliricidia (GS) y extracto de tagetes (TAC) de Atlántica Agrícola.*

Los ensayos para evaluar la eclosión de huevos de *M. javanica* se realizaron utilizando “tap water/agua corriente del grifo” ya que resulta el medio idóneo para llevar a cabo este tipo de experimentos (Greenway, 1970). Los experimentos de eclosión se evaluaron a las 24 y 72 horas.

La evaluación de la eclosión de los huevos de *M. javanica* en presencia únicamente de quitosano, se vio sensiblemente aumentada a concentraciones mayores de dicho compuesto, indicando un ligero efecto contraproducente sobre la eclosión de los mismo en su aplicación de manera independiente (FIG.12).

Evaluación de Artemisa (AJ) y quitosano sobre la eclosión de huevos de *M. javanica*.

En los ensayos, se ha evaluado el efecto combinado de Artemisa (AJ) y quitosano sobre la eclosión de los huevos de *M. javanica*. En este estudio se observaron diferencias en los ensayos de eclosión de huevos exponiendo a éstos a concentraciones del extracto (1/100) y concentraciones crecientes de quitosano. Observándose una reducción en la eclosión del 18% en los huevos de *M. javanica* tratados con Artemisa (AJ) 1/100 y 100 µg/ml de quitosano, con respecto a los huevos tratados con la misma concentración del extracto, pero sin quitosano. Se observó una eclosión inversamente proporcional a la concentración de quitosano en presencia de una dilución del extracto a 1/100 (FIG.13). Diluciones mayores de este extracto atenúan el efecto nematocida de ambos compuestos actuando de manera conjunta

Evaluación de Tagetes (TAC) y quitosano sobre la eclosión de huevos de *M. javanica*.

En este caso, se observaron diferencias muy significativas en los ensayos de eclosión de huevos exponiendo a éstos a concentraciones del extracto (1/100) y concentraciones crecientes de quitosano. Se observó una reducción en la eclosión total (inhibición del 100%) en los huevos de *M. javanica* tratados con extracto de tagetes (TAC) 1/100 y todo el rango de concentraciones de quitosano. Se observó una inhibición de la eclosión total en

presencia de una dilución del extracto a 1/100 (FIG. 15). A mayores diluciones de este extracto se observa un ligero aumento de la eclosión cuando se aplican conjuntamente los dos compuestos (extracto y quitosano).

La combinación con quitosano de los extractos vegetales Artemisa (AJ), pero sobretudo
5 *Tagetes* (TAC) produjo una reducción drástica de la eclosión de los huevos de *M. javanica*. En el caso de *Tagetes* (TAC) la combinación de dicho compuesto diluido 1/100 con concentraciones moderadas y altas de quitosano (50-100 µg/ml) inhibió completamente la eclosión de dicho nematodo.

En resumen, los ensayos mostraron lo siguiente:

- 10 – El quitosano en su aplicación en líquido aumentó de manera significativa la mortalidad de nematodos de la especie *Caenorhabditis elegans* a concentraciones superiores a 10 µg/ml.
- El extracto *Tagetes* (TAC) en su aplicación en líquido sobre poblaciones de *Caenorhabditis elegans* aumentó la mortalidad de las larvas de esta especie de
15 manera directamente proporcional a la concentración del extracto.
- Se observó sinergismo entre el extracto *Tagetes* (TAC) altamente diluido (1/100) y el quitosano hasta una concentración de 50 µg/ml.
- El quitosano aplicado de manera independiente (75-100 µg/ml) presenta cierta actividad nematicida sobre nematodos fitopatógenos de la especie *Meloidogyne*
20 *incognita*.
- En combinación con Artemisa (AJ) el quitosano redujo la supervivencia respecto al control especialmente en el rango de concentraciones entre y 5-10 µg/ml de quitosano.
- La combinación del producto Gliricidia (GS) especialmente a la dilución 1/100, con el
25 quitosano, produjo un elevado efecto sinérgico dependiente de la concentración de quitosano entre los dos compuestos.
- El extracto *Tagetes* (TAC) en combinación con el quitosano presentó un efecto sinérgico sobre la supervivencia de *M. incognita*, se produjeron a 75 y 100 µg/ml, de entre un 40 y un 50% de mortalidad sobre nematodos, respectivamente.
- 30 – Se determinó un efecto sinérgico de Artemisa (AJ) y quitosano observándose una reducción en la eclosión del 18% en los huevos de *M. javanica* tratados con Artemisa (AJ) 1/100 y 100 µg/ml de quitosano.
- El extracto Gliricidia (GS) y quitosano actúan de manera sinérgica observándose

valores de reducción de la eclosión de huevos de *M. javanica* del 10% a concentraciones altas de quitosano.

- El extracto *Tagetes* (TAC) y quitosano suprimen (reducción del 100%) la eclosión de huevos de *M. javanica* en presencia de bajas (50 µg/ml) concentraciones de quitosano.

Ejemplo 5: Efecto de la combinación del quitosano con los extractos Artemisa (AJ), Gliricidia (GS) y Tagetes (TAC), sobre los nematodos fitopatógenos en cultivos de tomate.

Para comprobar el efecto de las combinaciones de la presente invención en cultivos de tomate se diseñó un experimento en dos bloques con distribución aleatoria, en el que se utilizaron 10 plantas por tratamiento en maceteros de 12 litros, utilizando arena de sílice inerte como sustrato.

Los tratamientos ensayados fueron los siguientes:

- control
- nematodos (RKN): inoculación con J2 de *M. javanica*,
- Extracto de *tagetes* (TAC) + quitosano (T8): dilución 1/100 TAC + 100 µg/ml quitosano,
- Extracto de artemisa (AJ)+ T8 dilución 1/100 (AJ) + 100 µg/ml quitosano,
- Oxamilo
- Nemagold
- T8: 100 µg/ml quitosano.

Se realizaron tres aplicaciones de los extractos en combinación con quitosano. Las plantas se regaron según sus necesidades y se realizó fertilización con NPK(10-52-20).

Una vez alcanzada la madurez del cultivo (4 meses), se procedió al desmontaje del experimento y procesamiento de las plantas para la evaluación del efecto de las formulaciones experimentales sobre el desarrollo del tomate, así como sobre las poblaciones del nematodo. Se separaron la parte aérea y radicular de las plantas y se midieron los siguientes parámetros: peso fresco aéreo, longitud máxima aérea, peso fresco radicular y longitud máxima radicular.

Una vez procesada la parte aérea se retiraron los tomates presentes en las plantas con el fin de obtener una cuantificación del efecto de los tratamientos sobre la producción. Adicionalmente, se procedió al enjuague y lavado de las raíces con el fin de obtener dicha estructura de la planta lo más limpia posible y así poder cuantificar su peso y longitud. Del

mismo modo, se procedió a la evaluación de la severidad de la infección causada por los nematodos agalladores (*M. javanica*) siguiendo el índice de agallamiento propuesto por Bridge y Page en 1980. Con el fin de evitar el desprendimiento de las masas de huevos de la raíz, éstas se lavaron en un recipiente con agua evitando el contacto directo de un amplio caudal de agua que pudiera propiciar la pérdida de dichas masas.

La severidad de la infección causada por los nematodos agalladores en raíces de tomate se estimó a partir de la cuantificación de huevos provenientes de masas de huevos.

Con el fin de evaluar la evolución de la infección causada por nematodos agalladores se procedió a la cuantificación y recuento de huevos de nematodos de todas las raíces de cada uno de los tratamientos experimentales. Para dicha cuantificación se fragmentaron las raíces en secciones, éstas se dispusieron en hipoclorito sódico (1%) durante 5 min, transcurrido este tiempo los fragmentos de raíz, así como la suspensión de huevos se pasaron por tamices de diferente tamaño de malla (100, 25 y 10 micras) para retirar restos de raíz y del sustrato de crecimiento vegetal. Las muestras se recogieron de los tamices con 100 ml aproximadamente de agua destilada. Para cuantificar el número de huevos por raíz y para cada uno de los tratamientos se agitaron las muestras para conseguir su homogenización. A continuación, se tomaron submuestras de cada una de las suspensiones de huevos provenientes de raíces independientes. Se contaron 3 alícuotas de cada una de las muestras con el fin de obtener un número de mediciones suficiente que permitiera obtener valores de cuantificación robustos y que permitiera disminuir la variabilidad intra- e intermuestral.

Tras la realización y evaluación del efecto de los extractos experimentales sobre plantas de tomate se observó que ninguno de los extractos presentaba efectos perjudiciales para el desarrollo de las plantas, indicando la idoneidad de su uso en condiciones de invernadero.

Se observó como todas las plantas inoculadas con nematodos (Control+Nematodos (RKN); extracto de artemisa (AJ)+T8+RKN; *extracto de tagetes* (TAC)+T8+RKN; Nemagold+RKN; Oxamyl+RKN y T8+RKN) presentaban mayor porte que las plantas sin infectar con nematodos (FIG.16). Se observó en los resultados como las plantas tratadas con quitosano únicamente para el control de nematodos, fueron las que alcanzaron una taya superior (> 2,5 metros). Cuando evaluamos otro parámetro del desarrollo cómo fue el peso de la parte aérea se observó que las plantas tratadas con oxamyl y quitosano (T8), presentaron un peso mayor que las plantas control (sin nematodos; FIG.17). Estos resultados confirmaron que la aplicación de ambos compuestos propicia un mayor desarrollo de la parte aérea.

Observamos igualmente que ninguno de los extractos afectó al desarrollo de la raíz. Cabe destacar que las plantas tratadas con Nemagold son las que presentaron una longitud mayor, siendo dicha longitud, mayor que las del control (sin nematodos) (FIG.18). Adicionalmente, cabe señalar que teniendo en cuenta el peso fresco radicular, se destaca el oxamilo como el compuesto que ha propiciado una mayor cantidad de raíz por planta (FIG. 19). Este hecho sería debido a la mayor efectividad que muestra este compuesto para controlar nematodos y por tanto disminuir la afección de la misma por los nematodos. Todos los extractos presentaron mayores longitudes de raíz que el control, esto indicaría una buena efectividad contra los nematodos.

- 10 Evaluación del efecto de los tratamientos experimentales sobre la evolución de nematodos agalladores en plantas de tomate en condiciones de invernadero.

Tras realizar una evaluación de las raíces de tomate infectadas con nematodos y tratadas con las formulaciones experimentales, observamos como las plantas tratadas con el nematicida químico oxamyl presenta una menor infección por los nematodos. Está probada la alta efectividad de este compuesto para el control de nematodos, pero no es aconsejable su uso debido a su elevada toxicidad en mamíferos.

A continuación, cabe destacar el efecto de la combinación del extracto artemisa (AJ) y el quitosano, se observa un índice de agallamiento un punto inferior que el control (FIG.20), indicando una efectividad alta para el control de nematodos. A continuación, destaca el efecto que tiene la combinación del extracto de *tagetes* (TAC) y quitosano, obteniendo una reducción en la afección por nematodos de 0.4 puntos respecto a las plantas infectadas por nematodos y sin tratar con ningún extracto experimental (Control+RKN).

Tras la cuantificación de nematodos en las raíces de tomate post aplicación de los diferentes productos experimentales se observó como el tratamiento que presentó mayor efectividad fue el oxamyl. Se observó cómo este compuesto redujo en más del 50% la presencia de huevos de nematodos en las raíces de dicho tratamiento. Obteniendo valores de cuantificación de huevos de $127,879 \pm 8,957$ huevos en las plantas tratadas con oxamyl respecto al control (inoculado sólo con nematodos y sin aplicación de ningún tratamiento) que alcanzó valores de $244,932 \pm 17,500$ huevos por planta. Cabe destacar el efecto de los tratamientos artemisa (AJ) +T8 y *tagetes* (TAC) +T8 los cuales propiciaron una ligera reducción del número de huevos de nematodos por planta, alcanzando valores de $223,284 \pm 60,699$ y $240,938 \pm 11,138$ huevos por raíz. Estos resultados indicaron el efecto que presentan estos compuestos para el control de nematodos en las dosis aplicadas.

Evaluación de la evolución en la producción de tomates en plantas infectadas con nematodos agalladores y tratadas con las formulaciones experimentales.

Tras la cuantificación de la producción de tomates en las plantas tratadas con los diferentes productos experimentales se observó una mayor producción total de tomates en las plantas tratadas con los extractos experimentales artemisa (AJ) +T8, *tagetes* (TAC) +T8 y T8 (FIG. 21). Alcanzando valores de obtención de tomates notablemente superiores al control (sin infectar por nematodos). Estos resultados indicaron una elevada compatibilidad de dichos extractos experimentales para el aumento de la producción y rendimiento de los cultivos. Adicionalmente, se observó que las plantas tratadas con artemisa (AJ) +T8 y *tagetes* (TAC) +T8 presentaron un mayor peso total de tomates que el resto de tratamientos (FIG. 22), este hecho propiciaría el uso de estas formulaciones experimentales para mejorar y optimizar la fructificación en el cultivo de tomate.

A su vez se observó en un estudio temporal como se produjo un inicio mayoritario en la producción de tomates a partir del tercer mes de duración del cultivo para todos los tratamientos ensayados. Se obtuvo una producción más temprana, aunque no muy abundante en los tratamientos Control, artemisa (AJ) +T8 y *tagetes* (TAC) +T8 (FIG. 23). Cabe destacar que, aunque la producción de tomate se inició 4 semanas más tarde, se obtuvo un rendimiento en la producción de tomates muy significativo en el tratamiento sólo con T8 (quitosano) alcanzando valores de producción en cuanto al número de tomates superiores al control, indicando que este compuesto puede actuar como inductor tardío de la fructificación.

En cuanto a la evolución en peso de los tomates recolectados cabe destacar que los extractos *tagetes* (TAC) +T8 así como artemisa (AJ) +T8, presentaron mayor peso de tomates desde el principio del experimento alcanzando valores incluso superiores a los del control. Estos resultados indicaron que estas combinaciones fueron efectivas no sólo para el manejo y control de nematodos, sino que también para el aumento del rendimiento y productividad del cultivo de tomate (FIG.24).

El experimento de invernadero presentó una evolución satisfactoria desde el momento del trasplante hasta la completa madurez del cultivo, con las siguientes conclusiones:

Los extractos vegetales experimentales en combinación con el quitosano no presentaron ninguna toxicidad en plantas de tomate adultas.

Todas las plantas infectadas con nematodos fitopatógenos y tratadas con las diferentes combinaciones experimentales presentaron un aumento en el porte de las mismas viéndose

traducido en un aumento en parámetros con el peso fresco aéreo y la longitud máxima radicular.

Las plantas infectadas con nematodos agalladores y tratadas con el producto de Atlántica Agrícola NemaGold presentaron raíces de mayor longitud respecto al control.

- 5 Tras aplicar los criterios determinados por el Índice de agallamiento de Bridge and Page se determinó que el oxamilo fue el compuesto con mayor actividad nematicida de todos los evaluados.

- 10 El extracto de Artemisa (AJ) +T8 fue la formulación experimental con mejores resultados mostrando valores de afección por nematodos, según mencionado índice, 1 punto menores que el control.

Las plantas tratadas con el nematicida oxamilo presentaron menor número de huevos de nematodos en sus raíces que el resto de formulaciones experimentales.

- 15 Los extractos de artemisa (AJ) y *de tagetes* (TAC) en combinación con el quitosano (T8) favorecieron una reducción de la proliferación de nematodos fitopatógenos en la raíz disminuyendo el número de huevos presentes en la misma respecto al control.

Las formulaciones experimentales *tagetes* (TAC) +T8, artemisa (AJ) +T8 y T8 favorecieron la fructificación de tomates aumentando el número de frutos recolectados a lo largo del experimento (4 meses).

- 20 Las formulaciones *de extracto de agetes* (TAC) y extracto de artemisa (AJ) en combinación con el quitosano (T8) favorecieron el desarrollo de tomates alcanzando valores de peso superiores al control.

Los extractos de artemisa (AJ) +T8 y *de tagetes* (TAC) +T8 pese a la infección con nematodos obtienen una producción de frutos similar a la observada en el control.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición sinérgica de quitosano y un extracto vegetal con actividad nematicida para uso fitosanitario en el tratamiento de infecciones producidas por nematodos.
2. Composición sinérgica para su uso según la reivindicación 1, donde el extracto vegetal nematicida es seleccionado de entre el extracto de tagetes, el extracto de gliricidia o el extracto de artemisa.
- 10 3. Composición sinérgica para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el quitosano se encuentra en una concentración comprendida entre 5-100 µg/ml.
4. Composición sinérgica para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la concentración del extracto vegetal nematicida se encuentra en una dilución 1/100.
5. Composición sinérgica para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el quitosano y el extracto vegetal nematicida se aplica de forma conjunta.

FIG. 1

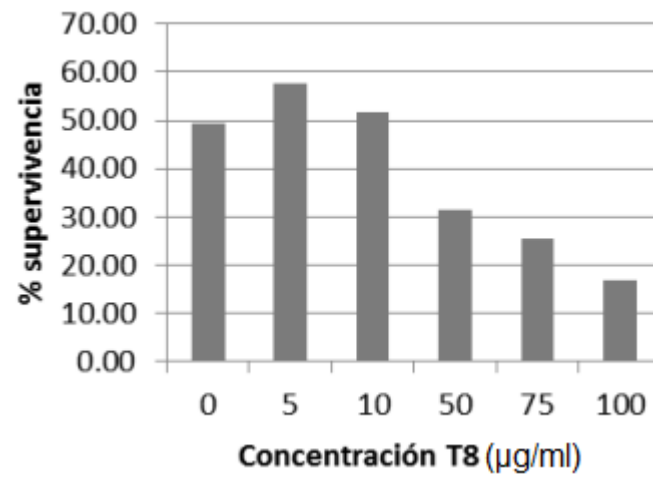


FIG. 2

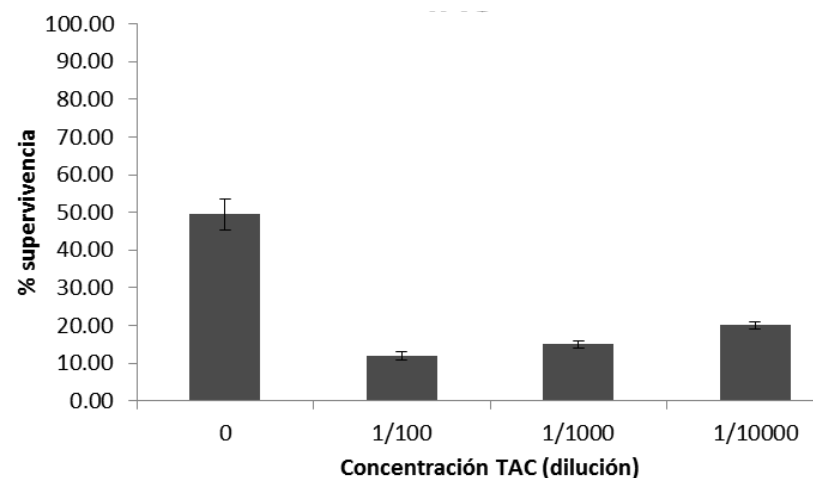


FIG. 3

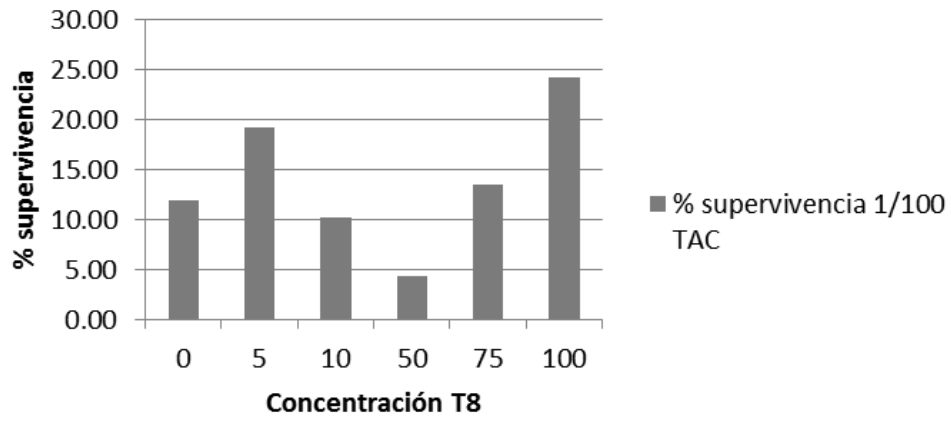


FIG.4

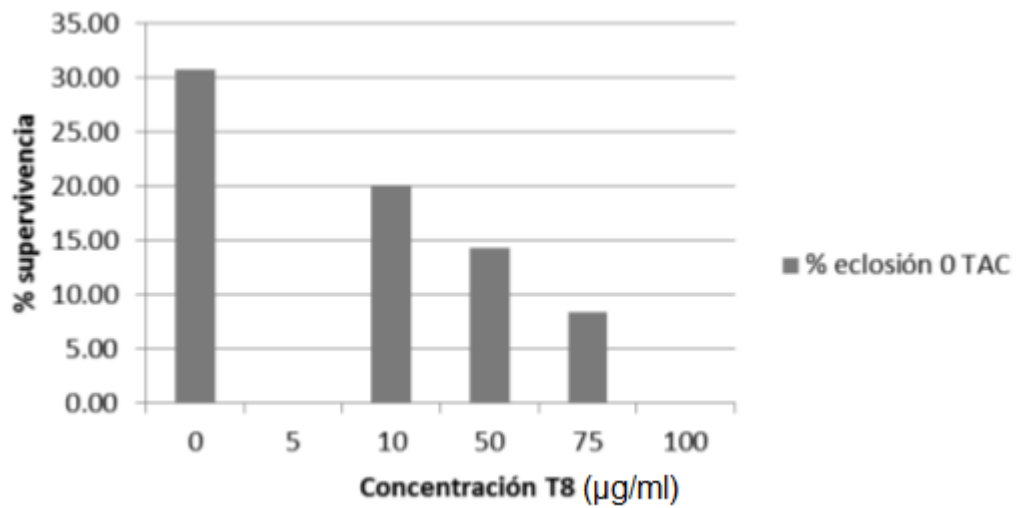


FIG. 5

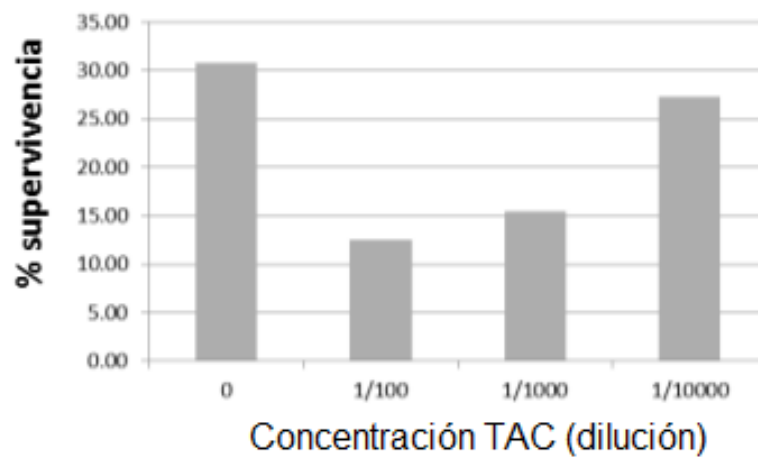


FIG.6

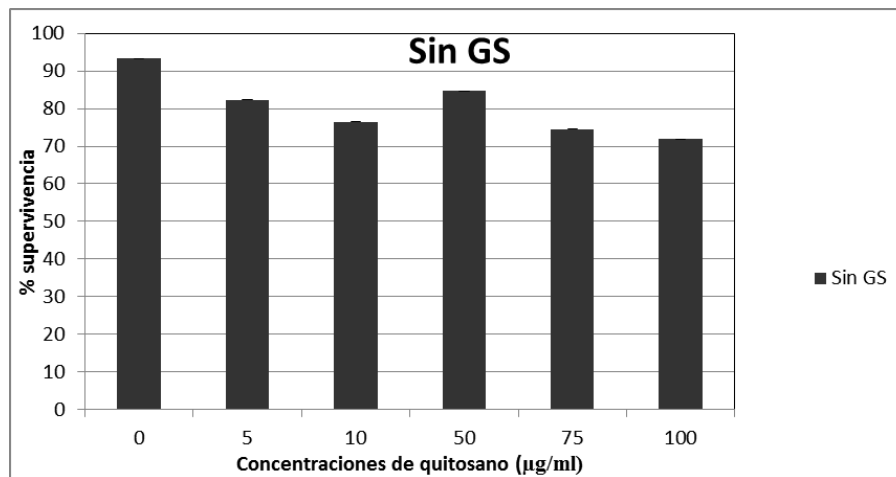


FIG.7

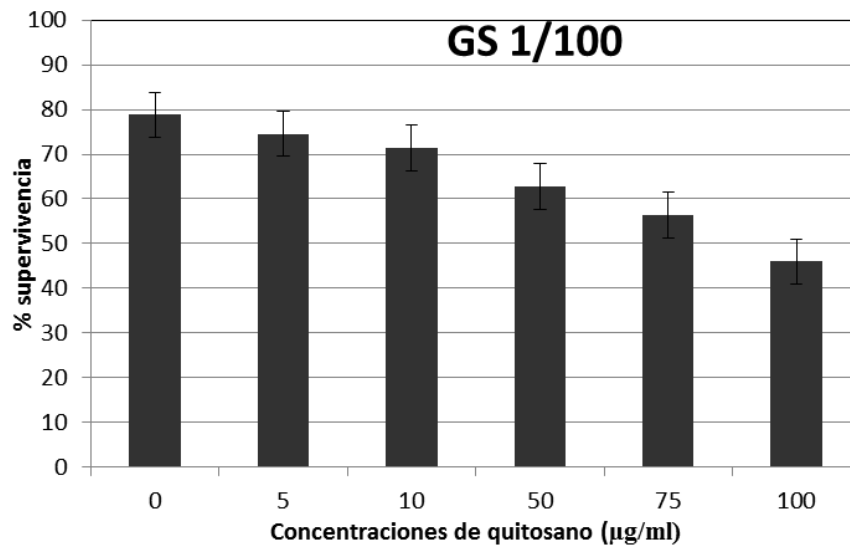


FIG. 8

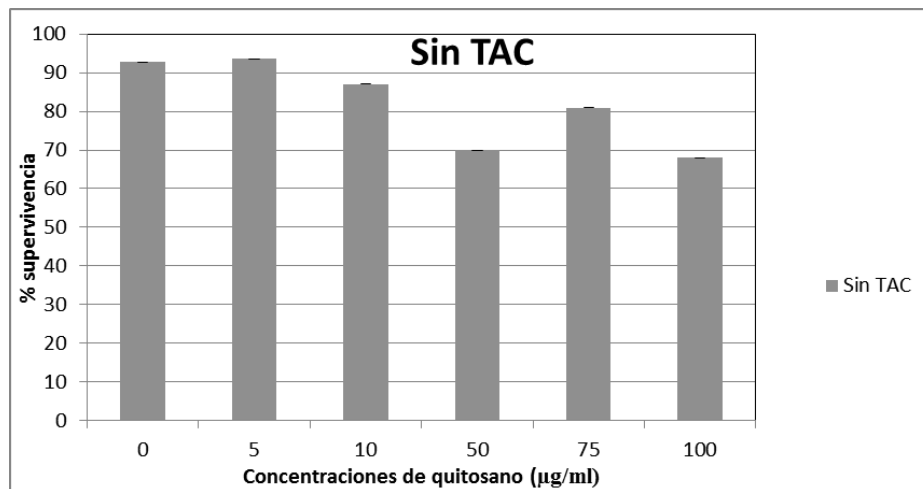


FIG. 9

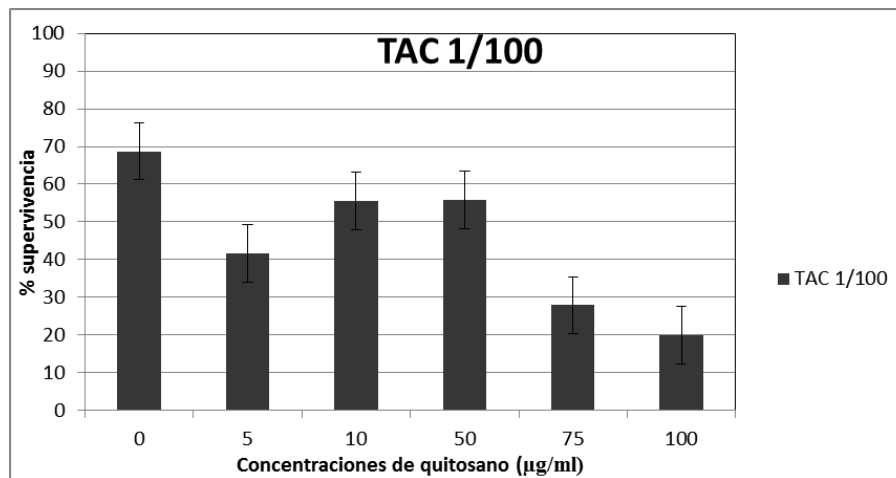


FIG. 10

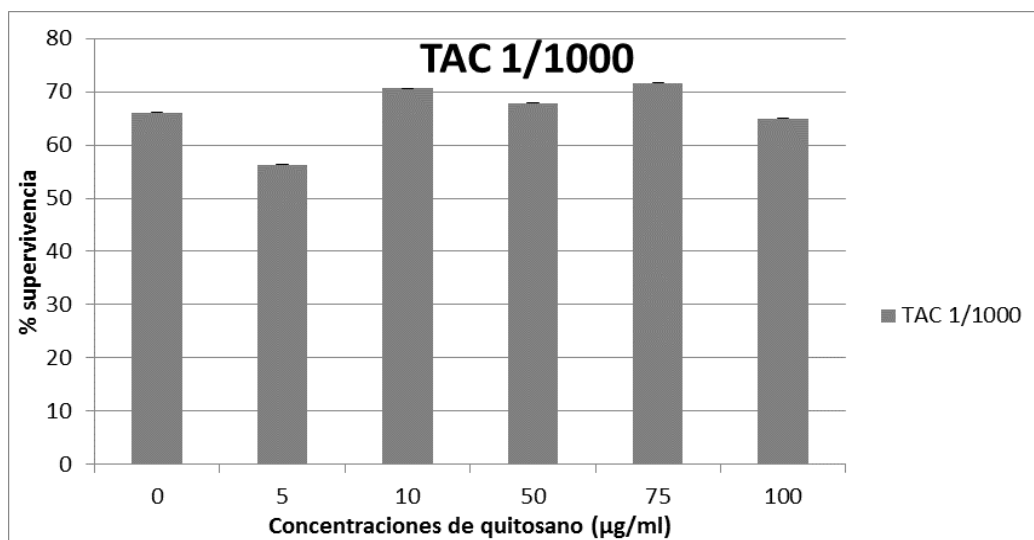


FIG. 11

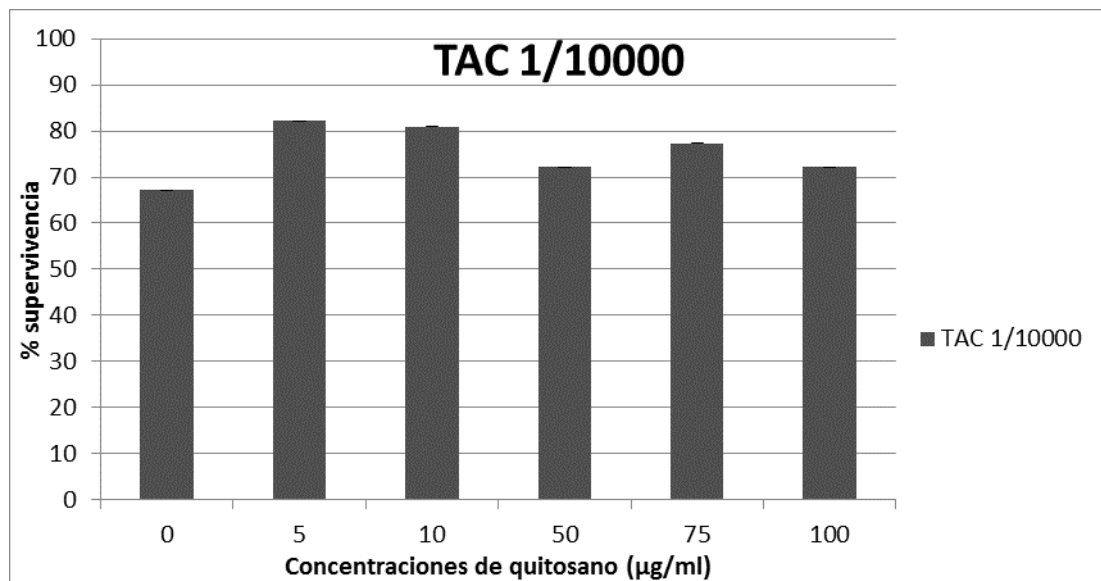


FIG. 12

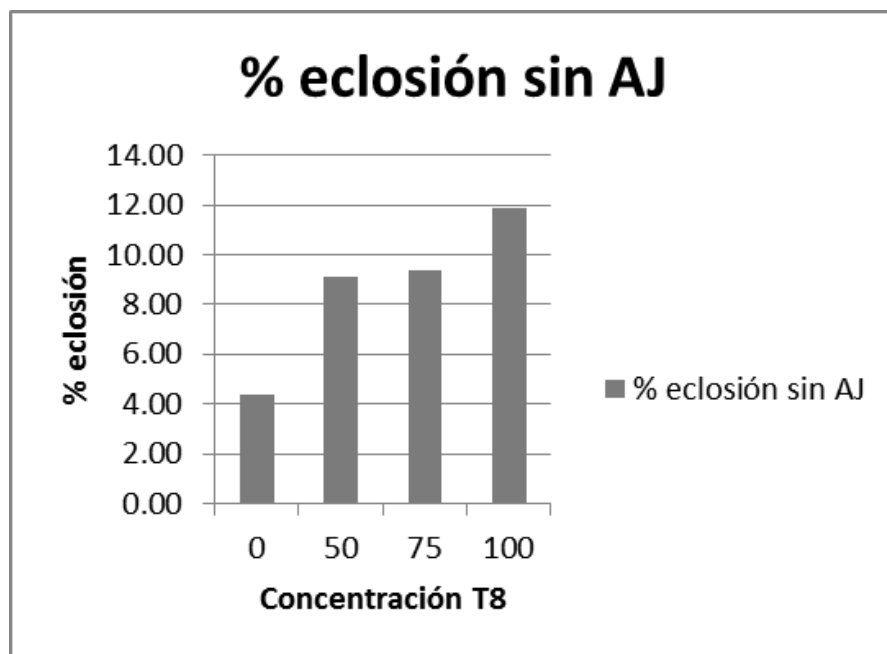


FIG.13

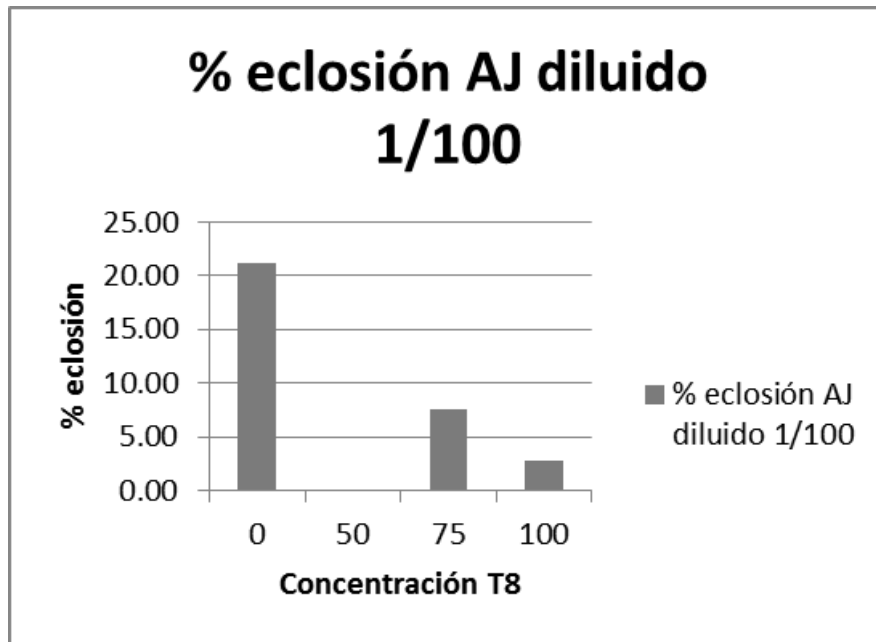


FIG.14

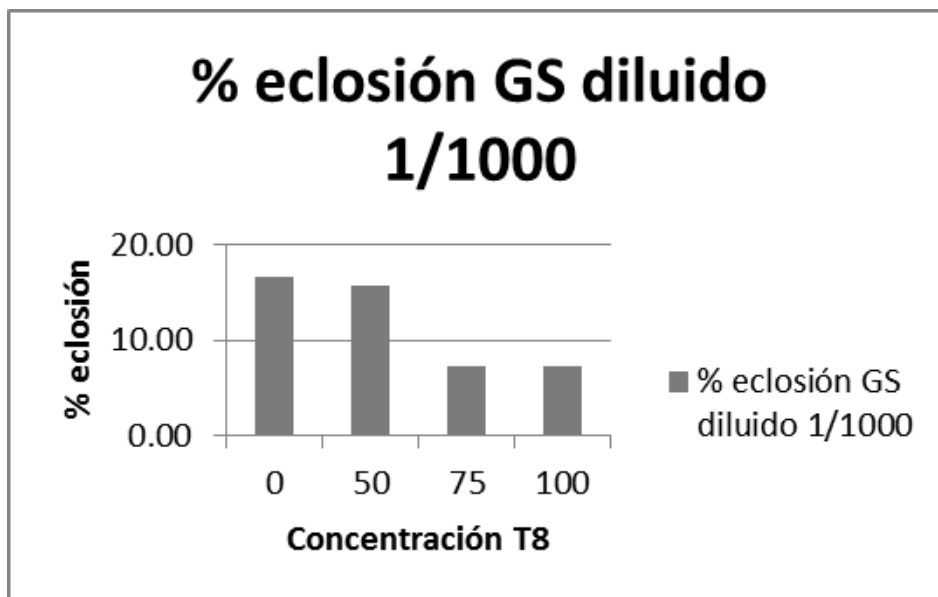


FIG.15

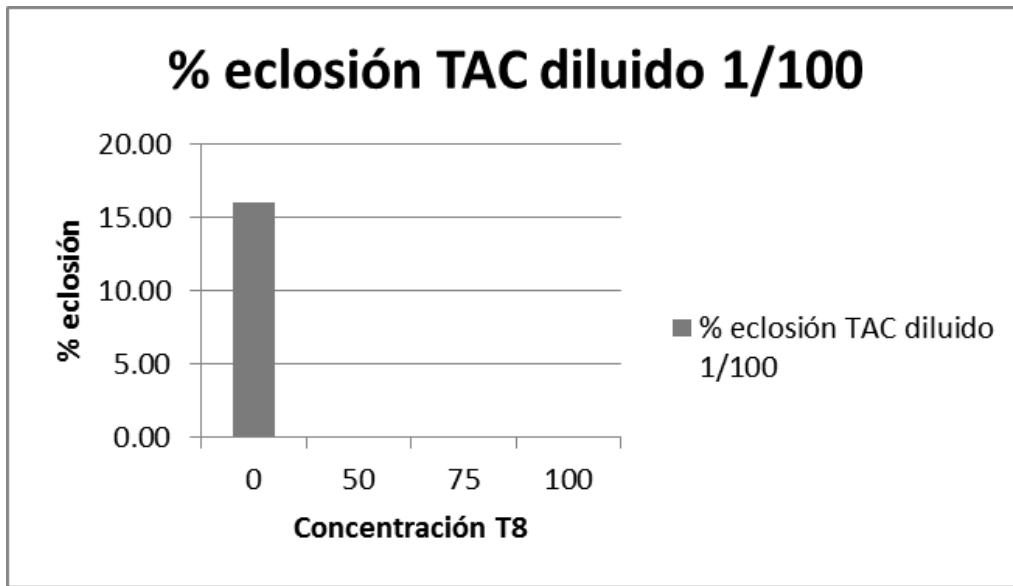


FIG. 16

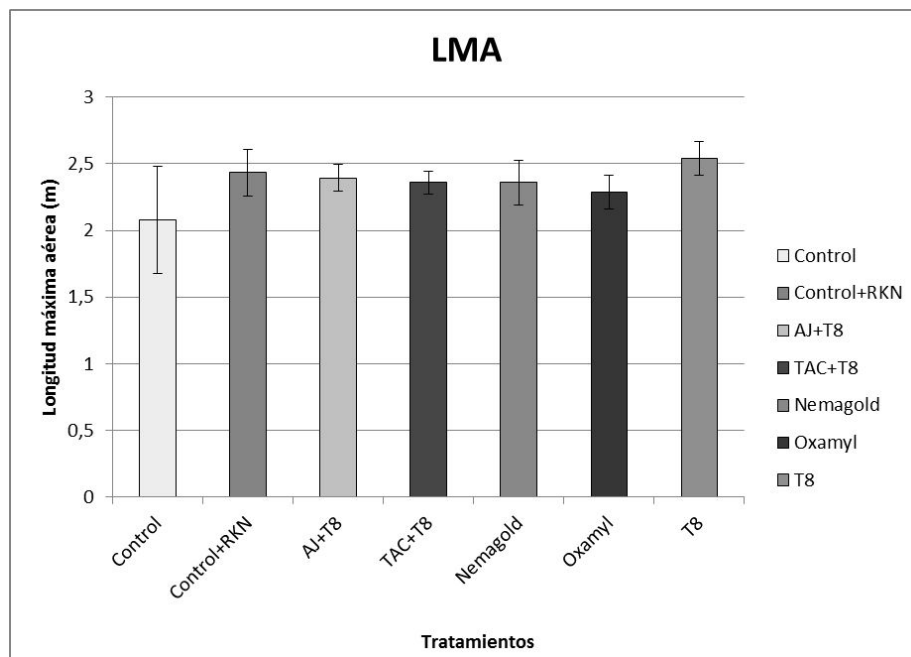


FIG. 17

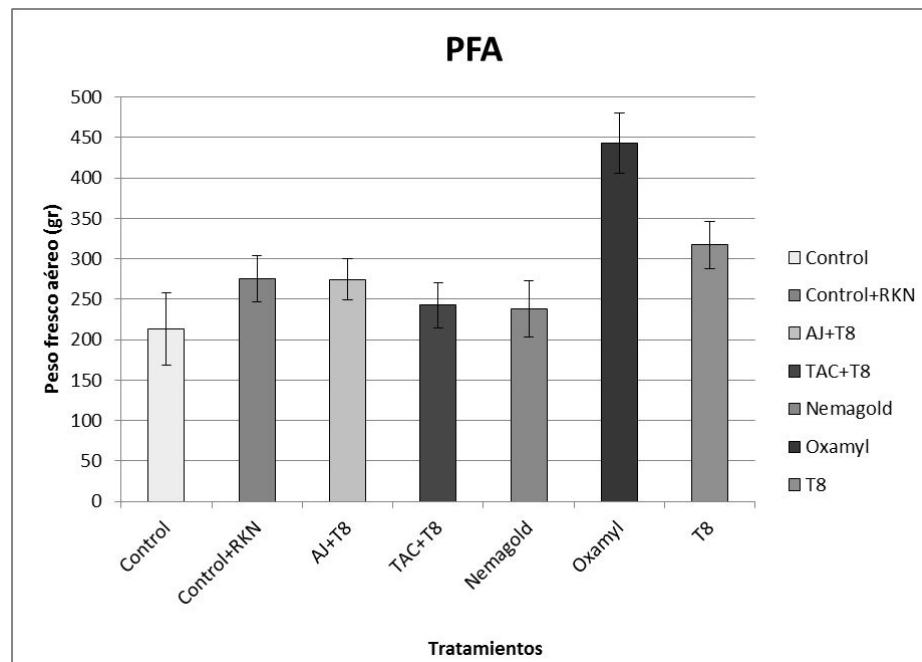


FIG.18

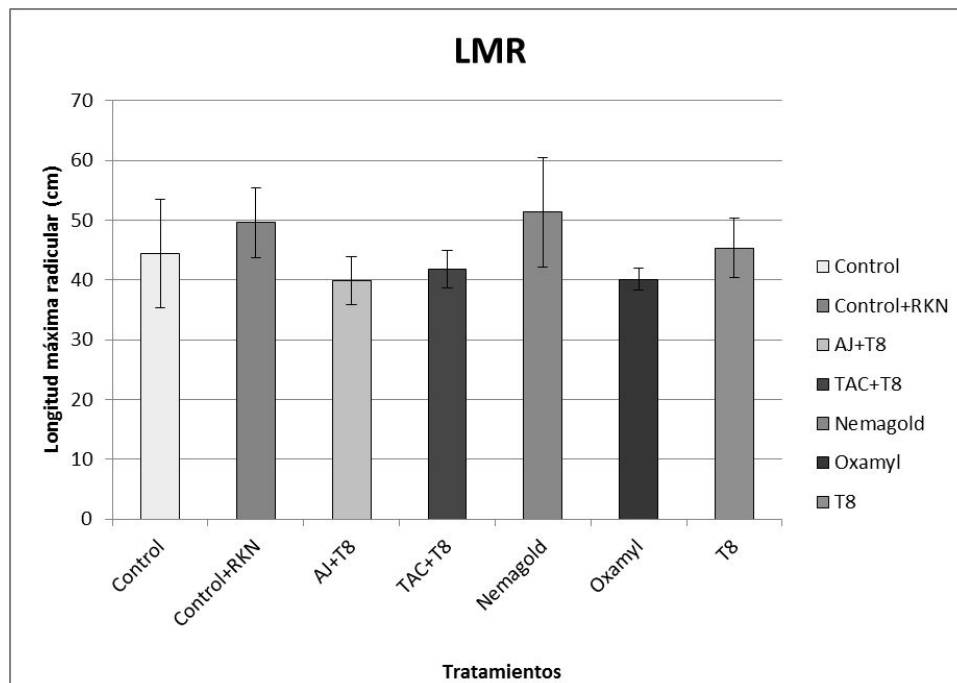


FIG.19

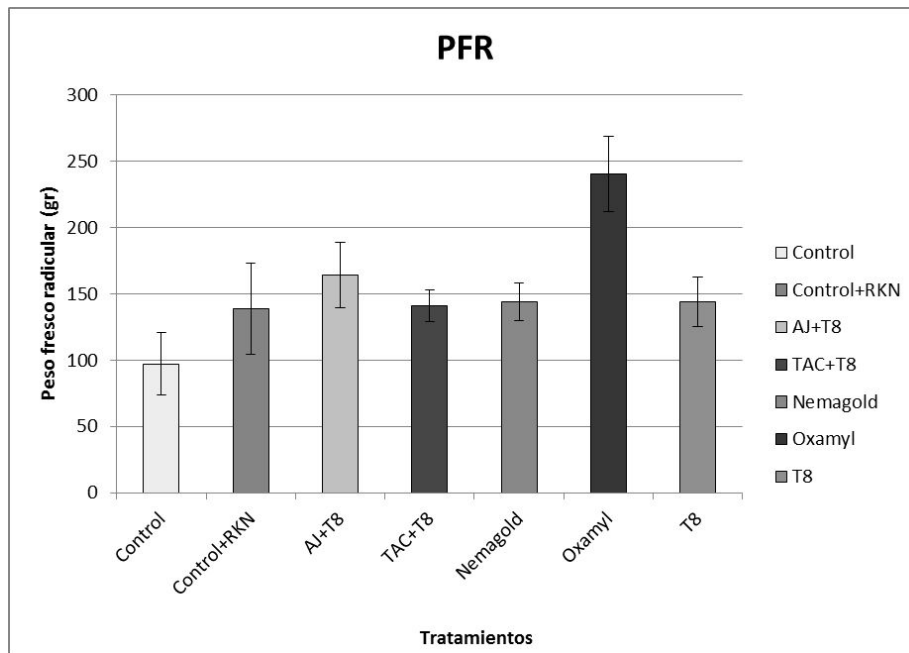


FIG. 20

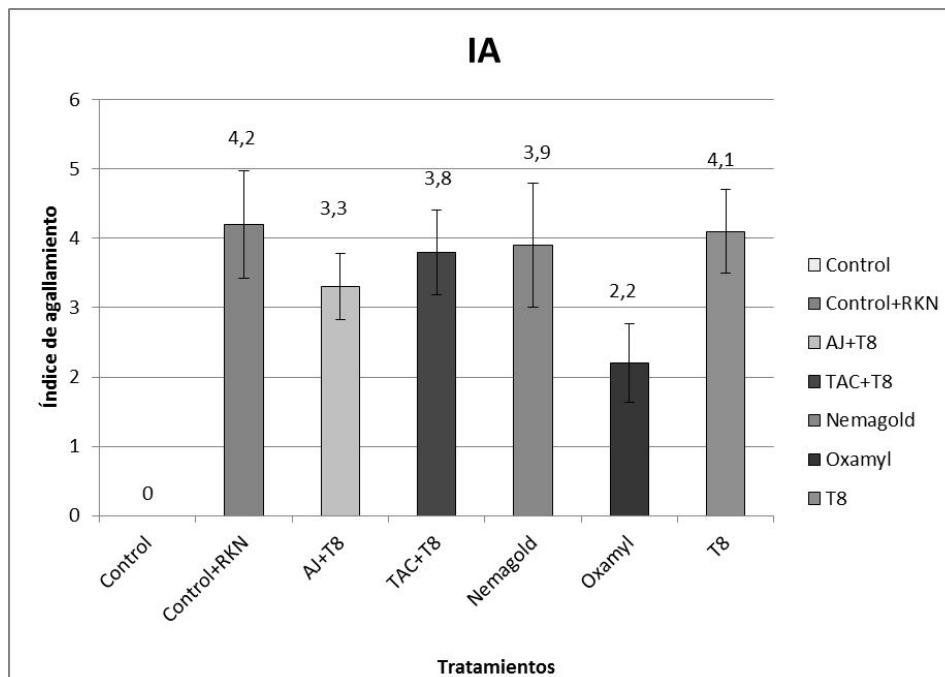


FIG.21

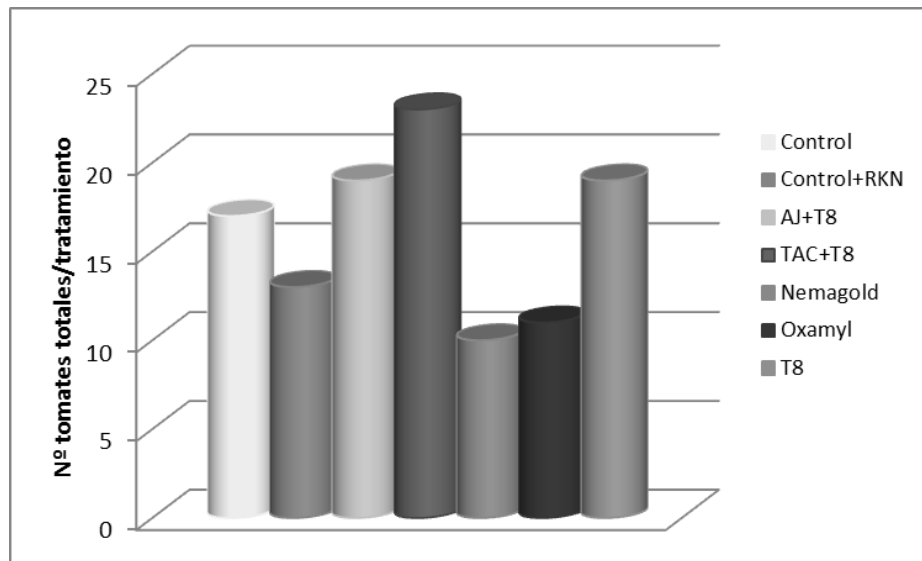


FIG. 22

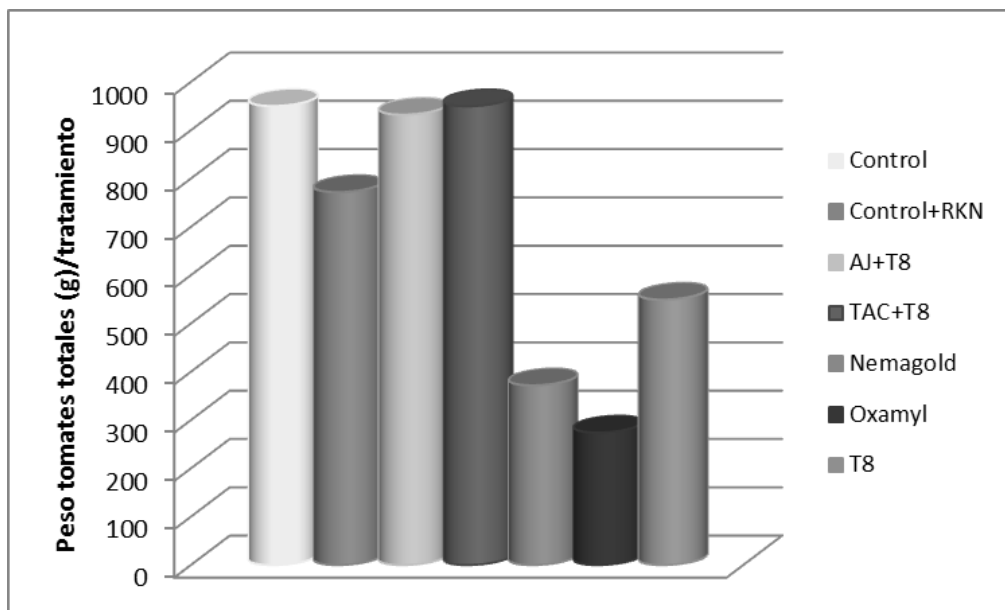


FIG.23

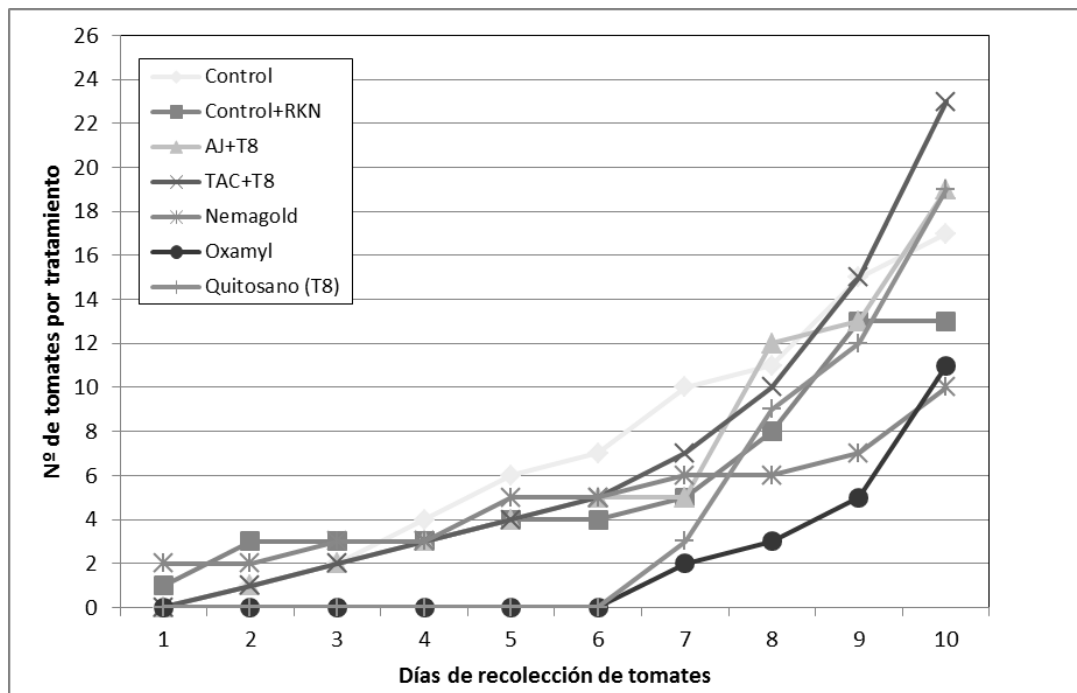
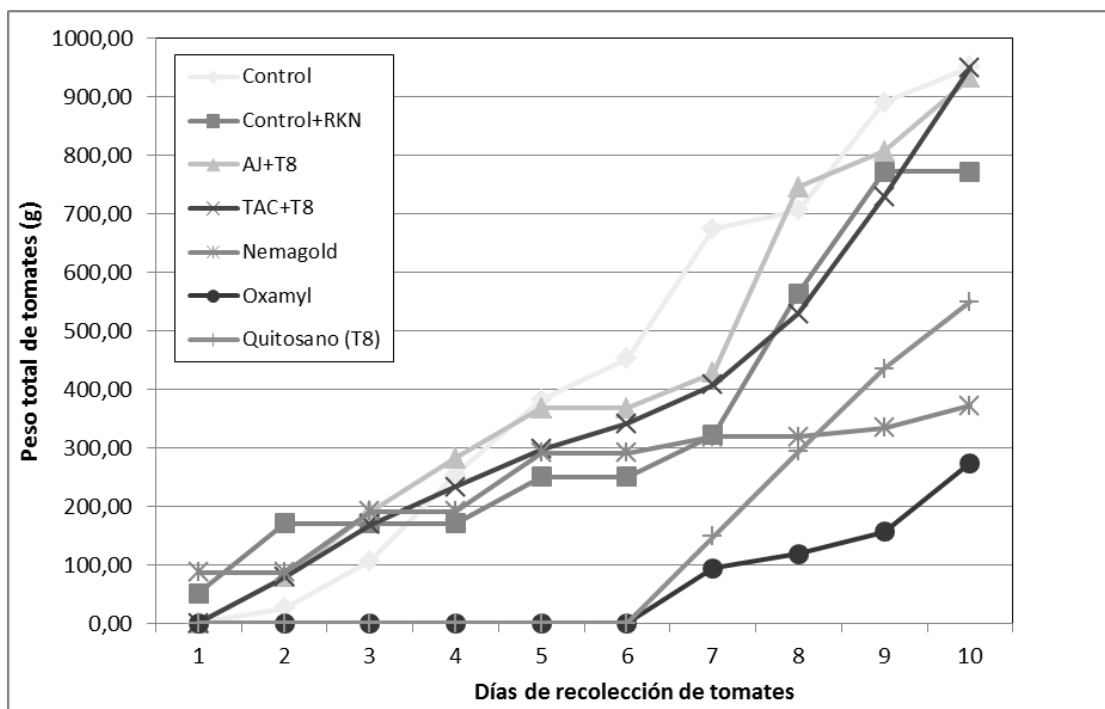


FIG.24





- ②① N.º solicitud: 201631565
②② Fecha de presentación de la solicitud: 09.12.2016
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
X	CN 103190451 A (HAINAN ZHENGYE ZHONGNONG HIGH TECHNOLOGY CO LTD) 10/07/2013, Resumen de la base de datos EPODOC. Recuperado de EPOQUE.	1-5
X	LIRA-SALDIVAR, R.H., HERNANDEZ-SUAREZ, M. Extractos de <i>Larrea tridentata</i> , soluciones de quitosán y bacterias antagonistas: Opciones contra microorganismos patógenos. IV congreso internacional XV congreso nacional de ingeniería bioquímica (abril 2006). Recuperado de internet URL: < http://www.informatica.sip.ipn.mx/colmex/congresos/morelia/MEMORIAS%202006/PONENCIAS/18.pdf >	1,5
Y		2-4
Y	OLABIYI, T.I Pathogenicity Study and Nematotoxic Properties of Some Plant Extracts on the Root-Knot Nematode Pest of Tomato, (L.) Mill. Plant Pathology Journal (2008), Vol 7, páginas 45-49.	2-4
A	WO 2006060582 A2 (REDOX CHEMICALS INC et al.) 08/06/2006, páginas 3-4, párrafos [0056], [0057]	1-5

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
30.05.2017

Examinador
A. Barrios de la Fuente

Página
1/5



- (21) N.º solicitud: 201631565
(22) Fecha de presentación de la solicitud: 09.12.2016
(32) Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

(51) Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	(56) Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	KHALIL, M.S. Bright Future with Nematicidal Phytochemicals. Biology and Medicine (2014), Vol 6, Nº 2, doi:10.4172/0974-8369.1000e104	1-5
A	ADEKUNLE, O.K, AKINLUA, A. Nematicidal effects of <i>Leucaena leucocephala</i> and <i>Gliricidia sepium</i> extracts on <i>Meloidogyne incognita</i> infecting okra. Journal of Agricultural Sciences (2007) Vol. 52, Nº 1, Páginas 53-63.	1-5

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
30.05.2017

Examinador
A. Barrios de la Fuente

Página
2/5

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A01N43/16 (2006.01)

A01N65/12 (2009.01)

A01N65/20 (2009.01)

A01P5/00 (2006.01)

A01P5/00 (2006.01)

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

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, WPIAP, TCM, TXPE, TXPCN, TXPUS, TXPSP, TXPWOEA, BIOSIS, XPESP, XPESP2, NPL, CAPLUS, FSTA, AGRICOLA, CABA, INTERNET.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 30.05.2017

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 3,4	SI
	Reivindicaciones 1,2,5	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-5	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	CN 103190451 A (HAINAN ZHENGYE ZHONGNONG HIGH TECHNOLOGY CO LTD)	10.07.2013
D02	LIRA-SALDIVAR, R.H., HERNANDEZ-SUAREZ, M.	2006
D03	OLABIYI, T.I	2006
D05	WO 2006060582 A2 (REDOX CHEMICALS INC et al.)	08.06.2006

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 (Art. 6.1 Ley 11/86)**

D01 divulga composiciones sinérgicas para uso fitosanitario de quitosano y extractos vegetales. Entre los extractos vegetales se encuentran extractos vegetales con actividad nematocida como los obtenidos de *Tagetes erecta* y *Artemisia* (resumen Epodoc-WPI).

Sobre la base de lo divulgado en D01 el objeto de las reivindicaciones 1, 2 y 5 no es nuevo, según el artículo 6.1 de la Ley de patentes 11/86.

D02 divulga composiciones sinérgicas para uso fitosanitario de quitosano y un extracto vegetal con actividad nematocida, concretamente extractos de *Larrea tridentata* (Véase resultados y discusión).

Sobre la base de lo divulgado en D02 el objeto de las reivindicaciones 1 y 5 no es nuevo, según el artículo 6.1 de la Ley de patentes 11/86.

ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 8.1 de la Ley 11/86)**Reivindicación 2**

La composición divulgada en D02 es una composición de quitosano y un extracto vegetal con actividad nematocida (*Larrea tridentata*).

La diferencia entre las composiciones objeto de la reivindicación 2 y D02 es que se utilizan otros extractos vegetales con actividad nematocida diferentes, concretamente *Tagetes erecta*, *Artemisa* o *Gliricidia*.

Ya se conoce en el estado de la técnica que los extractos vegetales de *Tagetes erecta*, *Artemisa* o *Gliricidia* presentan actividad nematocida (véase D03 *Tagetes erecta* y *Artemisa*, D05 *Tagetes* y D06 *Gliricidia*).

Sobre la base de lo ya expuesto y teniendo en cuenta que es habitual en el estado de la técnica y en este contexto, combinar diferentes agentes que por separado tienen un determinado efecto para para lograr composiciones que presenten un efecto mejorado o sinérgico (Véase D04, párrafos [0056],[0057] o D01), un experto en la materia intentaría, con unas probabilidades razonables de éxito, sustituir el extracto vegetal nematocida de la composición divulgada en D02 por otros extractos vegetales de conocida actividad nematocida para lograr diversas composiciones con un efecto nematocida mejorado o sinérgico.

Así, se considera por tanto, que a la luz de la combinación de las enseñanzas técnicas de D02 y por ejemplo, D03, el objeto de la reivindicación 2 no implicaría actividad inventiva para el experto en la materia según el artículo 8.1 de la ley de patentes 11/86.

Reivindicaciones 3, 4

No se especifica en D01 y D02 la concentración de quitosano ni la dilución del extracto con actividad nematocida utilizado.

No obstante, se considera que el experto en la materia, en el ejercicio de su práctica rutinaria, sería capaz de determinar a qué concentraciones de quitosano y a que dilución para un extracto vegetal con actividad nematocida determinado se obtienen al combinarlos composiciones con efecto sinérgico. Por lo tanto, sobre la base de lo expuesto, se considera que el objeto de las reivindicaciones 3 y 4 no implicaría actividad inventiva para el experto en la materia según el artículo 8.1 de la Ley 11/86.

PATENTABILIDAD (ART. 4.1)

En conclusión, se considera que el objeto de las reivindicaciones 1-5 no satisface los requisitos de patentabilidad, según el artículo 4.1 de la Ley de patentes 11/86.