

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 772 828**

51 Int. Cl.:

A01N 65/10 (2009.01)

A01P 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.04.2016 PCT/EP2016/058304**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.10.2016 WO16166262**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.04.2016 E 16719305 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.01.2020 EP 3282850**

54 Título: **Resistencia a Heterodera carotae y métodos de uso**

30 Prioridad:

17.04.2015 FR 1553449

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

08.07.2020

73 Titular/es:

**VILMORIN & CIE (100.0%)
4, quai de la Mégisserie
75001 Paris, FR**

72 Inventor/es:

BARROT, LAURE

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 772 828 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Resistencia a *Heterodera carotae* y métodos de uso

- 5 La presente descripción se refiere a una planta de la familia *Daucus carota* que presenta actividad nematocida contra el nemátodo de quiste *Heterodera carotae*, preferentemente no perteneciente a la subespecie de zanahorias cultivadas *Daucus carota* subsp. *sativus*. La presente invención también se refiere a los usos de dicha planta *Daucus carota* nematocida, en particular para reducir el nivel de infestación en un campo de cultivo infestado por el nemátodo de quiste *Heterodera carotae*.
- 10 Las zanahorias pertenecen a la gran familia de las apiáceas, anteriormente conocidas como umbelíferas. Esta planta herbácea García bianual se cultiva por su raíz carnosa y comestible que se llama zanahoria. Según las estadísticas de la Organización Mundial de la Alimentación (FAO), la producción mundial de zanahoria en 2007 fue de más de 26 millones de toneladas, la mitad proviniendo de tres países, China, Estados Unidos y Rusia.
- 15 La producción francesa es de aproximadamente 600.000 toneladas, de la cual una gran parte, 350.000 toneladas, se destinada al mercado de productos frescos (temprano y conservación), el resto se dedica a la producción de zanahorias para la industria. Aunque la producción de zanahorias se refiere a todo el territorio francés, se concentra principalmente en cuatro grandes zonas, Oeste de Francia (Normandía y Bretaña), Aquitania (Landas), la cuenca mediterránea y la región norte de la Picardía. Las dos primeras zonas son particularmente favorables, en particular debido a los suelos arenosos, que son favorables para el desarrollo armonioso de las raíces y la mecanización de la cosecha.
- 20 Por sí misma, la producción francesa para el mercado de productos frescos representa una superficie de más de 8.500 hectáreas. El cultivo de zanahorias es un cultivo de campo que se enfrenta muchos ataques. La protección fitosanitaria del cultivo de zanahoria sigue siendo el foco principal de los productores. Las principales dificultades surgen, por enfermedades y destrucciones telúricas de nemátodos, pitios, *Rhizoctonia solani* y mosca de la zanahoria (*Psila rosae*), y, por enfermedades y destrucciones aéreas del pulgón *cavaliella aegopodii* y de *Alternaria dauci*. El nemátodo de quiste, *Heterodera carotae* es responsable de pérdidas de rendimiento significativas relacionadas con la desaceleración de la producción, ya sea una reducción del tamaño de la raíz combinada con una fuerte producción de raicillas laterales, dando un aspecto peludo bastante característico pero devaluando fuertemente el producto que ya no se puede comercializar. En zonas de producción en suelo arenoso, las pérdidas relacionadas con *Heterodera carotae* puede ser aproximadamente 90 %.
- 25 Los métodos de control químico son hoy los métodos más eficaces para desinfectar campos. De este modo, el 1,3 dicloropropeno causa reducciones de población de nemátodos en suelos tratados en un promedio del 80 %. No obstante, en un contexto donde las condiciones de crecimiento son cada vez más respetuosas con el medio ambiente, estos tratamientos químicos fumigantes y/o nematocidas en el caso de nemátodos, plantean problemas medioambientales y su uso debería disminuir: el 1,3 dicloropropeno acaba de prohibirse a nivel europeo, dejando a los agricultores sin soluciones de control químico eficaces para la próxima siembra.
- 40 Además, se observa que aunque estos tratamientos químicos permiten el cultivo de zanahorias en tierras infestadas, sin embargo no causan una disminución estable de las poblaciones de nemátodos. En efecto, los individuos, principalmente en forma de quiste, después del tratamiento llegan a crear una nueva población infestante tan pronto como se establece un nuevo cultivo. Por tanto es necesario renovar continuamente estos tratamientos químicos, lo que resulta caro y nuevamente plantea problemas ambientales.
- 45 Hay otros medios de protección disponibles, por ejemplo desinfección de suelos con vapor o solarización. Con reducciones observadas del 50 % en las poblaciones de nemátodos, Estos métodos no son óptimos y con frecuencia resultan difíciles de usar. La rotación de cultivos es una posibilidad que puede considerarse para combatir ciertos patógenos, pero no es muy adecuada en el caso de nemátodos de quiste que tienen la particularidad, en ausencia de zanahorias, de conservarse durante muchos años en el suelo en un estado de vida ralentizado, en forma de quiste que eclosionará en cuanto se establezca un nuevo cultivo de zanahorias, después de la emisión de exudados de raíz. Se considera que se necesitan al menos ocho años sin cultivar zanahorias en una parcela infestada antes de alcanzar un umbral aceptable para un nuevo cultivo, que relanzará la infestación en los años siguientes.
- 50 Los métodos de cultivo como la técnica de trampa de zanahoria pueden reducir las poblaciones de nemátodos en los campos infectados. Los exudados de raíz de zanahorias plantadas en campos cuyas poblaciones de nemátodos se reducirán permitirán que las larvas eclosionen. Estas últimas migrarán a las raíces y la destrucción mecánica del cultivo, antes del final de un ciclo de cultivo completo, permitirá detener el desarrollo de las larvas. Sin embargo, esta técnica de cultivo tiene sus límites, porque todos los quistes que infectan un campo no eclosionan al mismo tiempo. Si el cultivo se destruye demasiado pronto, un número suficiente de quistes permanecen en el campo y causan pérdidas en la próxima producción. Si el cultivo se destruye demasiado tarde, se producen nuevas larvas, incluso nuevos quistes, que también causan pérdidas en la producción que sigue del uso de la trampa. Por tanto, es extremadamente difícil determinar el momento óptimo en el que se debe destruir el cultivo e incluso cuando la destrucción se realiza en ese momento, porque no todos los quistes eclosionaron simultáneamente, es casi imposible obtener un nivel de desinfestación similar al obtenido con los productos químicos.
- 60 Las variedades de zanahorias resistentes al nemátodo de quiste, *Heterodera carotae*, podrían ser una solución interesante, sin embargo, hasta la fecha y a pesar de los importantes esfuerzos de investigación en este campo, tales
- 65

variedades no existen. El documento US 4.442.092 describe una alternativa a los productos químicos, es decir, el uso de un extracto de sésamo o semillas de sésamo. Sin embargo no se ha demostrado ningún efecto en el nemátodo *Heterodera carotae* o en el cultivo de zanahorias.

El documento WO2005/063989 describe plantas transgénicas transformadas para expresar, por ejemplo, una toxina nematicida bajo el control de un promotor inducible durante la infección por nemátodos. No se divulga la aplicación a la zanahoria ni la desinfección de un medio de cultivo. De este modo, no existe un método no químico eficaz para controlar el nemátodo de quiste, *Heterodera carotae*. Los presentes inventores han desarrollado con éxito una técnica original utilizando plantas *Daucus carota* nematicidas para reducir suficientemente el nivel de infestación de un campo de cultivo con el nemátodo de quiste *Heterodera carotae* para permitir un cultivo de zanahoria.

La clase de nemátodos comprende más de 15.000 especies que se encuentran en el suelo, aguas y que para algunos de ellos han adoptado un modo de vida particular, el parasitario, ya sea a expensas de animales o plantas. La especie *Heterodea carotae* fue identificada por Jones en 1950, en Inglaterra y desde entonces se ha encontrado en la mayoría de los países europeos donde causa pérdidas de producción significativas. Es un endoparásito sedentario cuyo desarrollo tiene lugar dentro de los tejidos vegetales de la zanahoria. Los síntomas en los campos se traducen en zonas con vegetación irregulares, el follaje pierde su vitalidad, su color cambia a amarillo-rojo con necrosis. Las plantas no son muy vigorosas. El tamaño de la raíz se reduce, simultáneamente con una intensa producción de raicillas que dan un aspecto peludo a la raíz. La lignificación ocurre más rápidamente y el crecimiento es irregular, provocando distorsiones y deformaciones de la raíz. El propio ápice se necrosa. El ataque del nemátodo provoca un fuerte estrés hídrico en la planta, las pérdidas de rendimiento pudiendo ser limitadas opcionalmente al regar el cultivo y al añadir fertilizante.

El ciclo biológico del nemátodo de quiste *Heterodera carotae* se caracteriza por cuatro fases, comenzando con la eclosión de quistes en presencia de exudados de raíz emitidos por el cultivo de zanahorias. Las larvas infestantes denominadas segunda etapa "J2" se mueven y penetran en las raíces para migrar hacia el cilindro central, formar un sincitio y comenzar a desarrollarse, pasar por las etapas J3 y J4 para llegar a la etapa adulta. La tercera etapa juvenil "J3" se desarrolla dentro de la cutícula de la etapa J2. Los jóvenes macho de la tercera etapa aparecen formados el decimoquinto día después de la penetración en los tejidos, mientras que las hembras aparecen entre los días once y dieciséis. Los jóvenes de la etapa 4, "J4" muestran un marcado dimorfismo sexual entre machos y hembras. Se observará que el desarrollo en la etapa adulta pasa por un determinismo sexual particular, epigenético, 25 % de las larvas dan machos, 25 % dan hembras, el 50 % restante determina su género según las condiciones de los recursos alimenticios disponibles, el sexo femenino se elige preferentemente si las condiciones alimentarias son satisfactorias. Los machos filiformes dejarán las raíces mientras que las hembras permanecen fijas allí, apareciendo a través de los tejidos desgarrados, hinchados, llenados por los ovarios y fertilizados en cuanto alcanzan la madurez. Se considera que la hembra adulta aparece aproximadamente 24 días después de la penetración. Las hembras producen dos tipos de huevos, huevos externos en donde se forman jóvenes de primera etapa "J1" que maduran en larvas de segunda generación "J2" para eclosionar rápidamente, infestando nuevamente la cosecha y los huevos internos. Cuando la hembra muere, su cutícula se vuelve marrón y se endurece, su cuerpo forma un nuevo quiste que aloja los huevos internos. Este quiste puede permanecer en el suelo durante diez años en ausencia de un nuevo cultivo de zanahoria. El umbral de aparición de daños en el cultivo se considera generalmente alcanzado cuando se observa la presencia de una larva de nemátodo J2 por gramo de suelo.

La zanahoria es una especie con gran variabilidad, no solo dentro de la zanahoria cultivada *Daucus carota* subsp. *sativus*, sino también dentro de las doce especies silvestres *Daucus carota*. La zanahoria silvestre es una planta espontánea en muchas regiones del mundo (América, África, Australia...) pero que se encuentra principalmente en toda Europa y buena parte de Asia.

Las zanahorias cultivadas pertenecen a la subespecie *sativus* (*Daucus carota* subsp. *sativus*). Entre estos dos tipos principales generalmente se admiten, las zanahorias orientales denominadas zanahorias asiáticas, rojo púrpura, violeta (con antocianinas) o amarillentas y zanahorias con carotenos denominadas zanahorias occidentales o zanahorias europeas, de color naranja, amarillo o blanco. Las zanahorias que se cultivan actualmente se originaron probablemente en Afganistán, donde se conocen desde el siglo IX. A partir de este centro primario de origen, su extensión habría tenido lugar por un lado hacia el Medio Oriente y China, por otro lado al resto de Europa occidental. La zanahoria se introdujo en Francia, desde Italia en el siglo XIV. Las zanahorias con carotenos aparecieron en el siglo XVII en los Países Bajos.

Las zanahorias silvestres se cruzan fácilmente con las zanahorias cultivadas y dan híbridos fértiles. Sin embargo aunque esta variabilidad parece estar disponible, está lejos de ser explotada hasta la fecha porque el regreso a una tipología de zanahoria cultivada, es decir, hacia una planta *Daucus carota* subsp. *sativus* es extremadamente difícil y requiere mucho tiempo.

Los inventores desarrollaron una nueva estrategia para la desinfección o desinfestación de suelos contaminados por el nemátodo de quiste *Heterodera carotae*, haciendo posible obtener tasas de desinfección que son sensiblemente idénticas o incluso más altas que las obtenidas por desinfección química. Para ello, los inventores desarrollaron nuevas plantas *Daucus carota*, resistentes al nemátodo de quiste *Heterodera carotae*; también demostraron que al cultivar dichas plantas, era posible aprovechar su resistencia para desinfectar un campo contaminado con *Heterodera carotae*; en efecto, de una manera perfectamente original, los inventores usaron plantas resistentes no para cosecharlas, ni introducir el rasgo relacionado con la resistencia, sino para limitar la multiplicación del nemátodo de quiste *Heterodera carotae*, es decir, explotaron el efecto nematicida subyacente a la resistencia de estas plantas, que no son comerciales, es decir, no están destinadas a cosecha y luego comercializarlas para alimentos, particularmente alimentación

humana. Este enfoque va en contra de los métodos habituales de los seleccionadores, que generalmente apuntan a identificar en el germoplasma silvestre plantas resistentes a una plaga dada y luego introducir esta resistencia en el patrimonio genético de las plantas comerciales, para obtener variedades comerciales resistentes. A diferencia de estos métodos, los presentes inventores no buscaron introducir la resistencia identificada, sino estabilizarla y aprovecharla para desinfectar suelos o medios de cultivo, según los diferentes usos o métodos de la invención. Inesperadamente, los inventores demostraron así que las plantas no comerciales resistentes, es decir, que no están destinadas a su cosecha y luego comercializarlas para alimentos, especialmente alimentación humana, podrían considerarse como productos fitosanitarios no químicos, que permiten desinfectar o descontaminar suelos infestados con el nemátodo *Heterodera carotae*.

De hecho parece que las plantas resistentes obtenidas por los inventores causan un bloqueo del ciclo del nemátodos y, por tanto, a lo largo del tiempo, reducen la infestación en los campos. Sin querer quedar ligados a la teoría, parecería que *Daucus carota* nematocidas según la presente invención tienen una doble acción, no solo en el sincitio, provocando el bloqueo de su desarrollo, sino también a nivel de machos y larvas J2 de *Heterodera carotae* que aparecen bloqueados en las raíces (necrosis).

El determinismo sexual es epigenético en el nemátodo de quiste *Heterodera carotae*, un bloqueo del sincitio favorecerá la aparición de nemátodos masculinos en detrimento de la aparición de nemátodos femeninos. La población femenina disminuye drásticamente, por tanto, la posibilidad de formar nuevos quistes a lo largo de las generaciones disminuirá de manera similar. Además y aún más sorprendentemente, los inventores descubrieron que los nemátodos macho y J2 también parecen estar bloqueados en la raíz. Si no pueden salir de la raíz, por tanto, no pueden fertilizar hembras que no producirán huevos. El ciclo reproductivo del nemátodo se interrumpe nuevamente.

De este modo, a lo largo del tiempo, los quistes que infestan una parcela de cultivo eclosionan, debido a los exudados de raíz producidos por plantas resistentes, y liberan sus larvas que luego se bloquean en su ciclo de multiplicación, no pudiendo por tanto producir nuevos quistes. Durante varias generaciones del nemátodo, por ejemplo en una temporada de crecimiento, el nivel de infestación de la parcela de cultivo disminuye a un nivel aceptable y luego recibe un cultivo de *Daucus carota sativus*.

Definiciones:

Por "desinfección" o "desinfestación" de un suelo o medio, en el marco de la invención, se entiende la disminución de la población de una plaga o patógeno, más particularmente un nemátodo, en particular, un nemátodo de quiste, y más específicamente *Heterodera carotae*, en el suelo o el medio, o la disminución de su capacidad reproductiva. Los términos desinfección y desinfestación frente a *Heterodera carotae* se usan indistintamente en la presente descripción. Los conceptos de "resistencia" y "sensibilidad" son definidos en general por la ISF (International Seed Federation).

De este modo, por "Resistencia", se entiende la capacidad de una planta o variedad para restringir el crecimiento y desarrollo de un patógeno o plaga específico y/o el daño que causan, en comparación con variedades susceptibles y en condiciones similares, ambientales y de presión de este patógeno o esta plaga. Las plantas o variedades resistentes pueden expresar algunos síntomas de la enfermedad o algún daño si el patógeno o la plaga están bajo fuerte presión. Preferentemente, en el marco de la invención, resistencia significa la capacidad de restringir el crecimiento y el desarrollo de un patógeno o plaga específica. Por "sensibilidad", se entiende la incapacidad de una planta o variedad para restringir el crecimiento y desarrollo de un patógeno o plaga específica.

En el marco de la invención, la resistencia de una planta al nemátodo *Heterodera carotae* significa la capacidad de esta planta para restringir el crecimiento y desarrollo de dicho nemátodo. Una planta sensible a este mismo nemátodo es, por ejemplo, la variedad de zanahoria Nanco, comercializada por Vilmorin.

Se considerará que una planta es resistente cuando presenta una ausencia de multiplicación de nemátodos y/o una reducción de la multiplicación de nemátodos, acompañada opcionalmente por la producción de individuos masculinos mayoritariamente. En el primer caso, los nemátodos se bloquean al nivel del inicio del sincitio nutritivo: las larvas no logran "desviar" el metabolismo celular para su beneficio y, por lo tanto, no pueden completar su ciclo. En el segundo caso, algunas larvas logran iniciar y luego mantener un sincitio de alimentación de baja calidad y, por lo tanto, evolucionarán más bien hacia los machos, menos exigentes en aportes energéticos.

Por "efecto nematocida de una planta" o acción nematocida o poder nematocida de una planta, se entiende principalmente la capacidad de esta planta para reducir la población de un nemátodo, presente en un medio, o la capacidad de reducir la población correspondiente a una etapa de desarrollo de dicho nemátodo, por ejemplo, reducción del número de larvas en la etapa J2, o reducción del número de quistes. El efecto nematocida según la presente invención se dirige específicamente hacia el nemátodo de quiste *Heterodera carotae*. El efecto o poder nematocida también significa la capacidad de masculinización a más de 50 % larvas del nemátodo. Una planta que tiene un efecto nematocida es una planta que, por tanto, restringe el crecimiento o desarrollo del nemátodo en relación con una planta *Daucus carota* subsp. *sativus*, en condiciones de cultivo similares. Cabe señalar que el efecto nematocida según la presente invención no proviene del método de cultivo como tal, sino de la capacidad de la planta para restringir la multiplicación y el desarrollo del nemátodo, a diferencia del cultivo de trampa de zanahoria, donde la zanahoria solo sirve para atraer y canalizar los nemátodos y luego eliminarlos más fácilmente arrancando la zanahoria. El efecto o poder nematocida según la invención se obtiene, por tanto, gracias a un mecanismo de resistencia de dichas plantas contra el nemátodo de, quiste *Heterodera carotae*.

El efecto o poder nematocida de una planta contra *Heterodera carotae* se puede probar por ejemplo *in vitro* como se describe en el ejemplo 1B, por inoculación de *Heterodera carotae* directamente en el ápice de las semillas germinadas y contando el número de larvas o la proporción hembra/macho, después de 15 a 20 días.

Preferentemente, el poder nematocida de una planta se demuestra sembrando semillas en una maceta llena de tierra

con una tasa promedio de 15 larvas por gramo de tierra; una planta se considerará resistente a *Heterodera carotae*, o como poseedora de un poder nematocida contra *Heterodera carotae*, si 90 días después de la siembra, tiene menos de 10 hembras, larvas y/o quistes, a nivel de las raíces. La realización de este ensayo se detalla en particular en el ejemplo 2 de la parte experimental.

A nivel de la población, una población de plantas se considera globalmente resistente a *Heterodera carotae*, o generalmente presentando un poder nematocida contra *Heterodera carotae*, si al menos el 70 % de las plantas que constituyen la población son resistentes o tienen un poder nematocida como se definió anteriormente, preferentemente al menos 75 %, más preferentemente al menos 80 %. Una población de plantas resistentes o que exhiben un poder nematocida preferentemente no incluye ninguna planta multiplicadora, en particular, ninguna planta con más de 100 larvas a nivel de las raíces, 90 días después de sembrar en el suelo con un promedio de 15 larvas o quistes por gramo de suelo. Por "reducir suficientemente el nivel de infestación" de un campo de cultivo con el nemátodo de quiste *Heterodera carotae* para permitir un cultivo de zanahoria, se entiende reducir el nivel de infestación de *Heterodera carotae* inferior al número de larvas J2 que causan daños al cultivo. Este umbral es generalmente de una larva de nemátodos J2 por gramo de suelo o un quiste de nemátodos por gramo de suelo.

Según un primer aspecto, la presente invención se refiere por tanto al uso de una planta de la especie *Daucus carota*, para tratar un suelo o un medio de cultivo, infestado o probablemente infestado con nemátodos, más específicamente nemátodo de quiste, y lo más preferentemente *Heterodera carotae*, para desinfectarlo. La planta utilizada según la invención es una planta que exhibe un efecto o poder nematocida, especialmente contra el nemátodo *Heterodera carotae*. Según una realización particularmente preferente de la invención, dicha planta es una zanahoria *Daucus carota* que no pertenece a la subespecie de zanahoria cultivada *Daucus carota* subsp. *sativus*.

Por efecto nematocida de la planta, según las definiciones dadas anteriormente, se entiende en particular la capacidad de reducir la cantidad de larvas juveniles J2 que infestan un ambiente, o la capacidad de reducir la cantidad de quistes, o la capacidad de causar la masculinización de más del 50 % de las larvas de nemátodos *Heterodera carotae* infestando un medio. También puede ser una combinación de estas propiedades, por ejemplo, la capacidad de reducir la cantidad de larvas de J2 y la cantidad de quistes, o la capacidad de reducir la cantidad de J2 y conducir a la masculinización; o incluso la combinación de estas tres propiedades.

Preferentemente, la masculinización generada por el uso según este aspecto de la invención es una masculinización superior al 60 %, preferentemente superior al 70 %, incluso 80 % de la población de larvas *Heterodera carotae* infecciosas. Cabe señalar que el poder o efecto nematocida es específico de la planta o semilla, no es el resultado del método de cultivo; en particular, no proviene de un arrancado precoz de las plantas o de un cultivo en condiciones de riego insuficientes, que se sabe que causan una reducción de la población de nemátodos que infestan un suelo o un medio de crecimiento.

Esta capacidad nematocida se observa preferentemente durante un tiempo de cultivo de dichas zanahorias de al menos 3 meses, pero preferentemente al menos 4 meses, por ejemplo 5 meses, o 6 meses, o incluso más de 6 meses.

Como se mencionó, según una realización particularmente preferente de la invención, la planta utilizada es una zanahoria *Daucus carota* que no pertenece a la subespecie *Daucus carota* subsp. *sativus*; por tanto, la zanahoria utilizada para la desinfección no es una zanahoria comercial, no está destinada a su cosecha para la comercialización destinada a alimentación, especialmente humana, y por lo tanto no está destinada al consumo. La zanahoria nematocida utilizada en el contexto de la presente invención debe considerarse como un producto de desinfección, o producto fitosanitario, se utiliza para desinfectar el suelo o el medio de cultivo infestado de nemátodos. *Heterodera carotae* o susceptible de serlo.

En particular, puede ser una planta perteneciente a la subespecie *Daucus carota dentatus*, o una planta de esta subespecie u otra subespecie silvestre. Especialmente puede ser una planta híbrida de la cual al menos uno de los dos padres es la denominada zanahoria silvestre, que no pertenece a la subespecie cultivada *Daucus carota* subsp. *sativus*; por ejemplo, es una planta nematocida de la cual al menos uno de los dos padres es una zanahoria *Daucus carota dentatus*.

Según una realización particularmente preferente, las zanahorias utilizadas para este uso son plantas obtenidas de semillas depositadas en NCIMB con el número de registro NCIMB 42351.

De hecho, los presentes inventores obtuvieron plantas que tienen una resistencia muy alta al nemátodo de quiste *Heterodera carotae*, como se ilustra en la parte experimental. Dichas plantas tienen una doble acción nematocida, no solo a nivel de desarrollo de sincitios sino también a nivel de machos y larvas J2 que parecen bloqueados a nivel de las raíces (necrosis). En *Heterodera carotae*, un bloqueo del sincitio favorece la aparición de nemátodos masculinos en detrimento de la aparición de nemátodos femeninos. La población femenina disminuye drásticamente, por tanto, la posibilidad de formar nuevos quistes a lo largo de las generaciones disminuye de manera similar. Además y aún más sorprendentemente, Los inventores descubrieron que también parece que los nemátodos masculinos y J2 están bloqueados en la raíz (necrosis). Si no pueden salir de la raíz, por tanto, no pueden fertilizar hembras que no producirán huevos. El ciclo se interrumpe nuevamente, de ahí la doble acción nematocida de las plantas como se describe en la parte experimental.

Las semillas utilizadas para obtener plantas *Daucus carota* que tienen dichas propiedades nematocidas se depositaron en la compañía Vilmorin, Route Le Manoir, 49250 La Ménitrie, Francia, según los requisitos del Tratado de Budapest para el reconocimiento internacional del depósito de microorganismos a los fines de los procedimientos de patentes, 20 de enero de 2015, con la "National Collection of Industrial, Food and Marine Bacteria" (NCIMB), (NCIMB Ltd, Edificio Ferguson, Craibstone Estate, Bucksburn, Aberdeen AB21 9YA, Reino Unido), con el número de registro NCIMB 42351, con la referencia *Daucus carota* DCHR1.

Según una realización particularmente preferente, las plantas utilizadas para la desinfección según la invención son plantas desarrolladas a partir de semillas NCIMB 42351 o plantas obtenidas o derivadas de estas semillas, después de propagación o cruce y selección. Las plantas utilizadas pueden ser en particular plantas *Daucus carota* derivadas de plantas que provienen de semillas depositadas con el número NCIMB 42351. La presente descripción proporciona toda la información necesaria para seleccionar plantas con poder nematocida, como parte de un programa de selección. Además la solicitud no se limita en modo alguno a las plantas derivadas de semillas depositadas. En efecto, como se describe en el ejemplo 1 de la solicitud, muchos genotipos silvestres también pueden exhibir resistencia al nemátodo *Heterodera carotae*, resistencia que se puede usar, según la enseñanza de la presente invención, para desinfectar un suelo o medio de cultivo.

Las plantas utilizadas en el contexto de la invención pueden ser una población de plantas nematocidas, es decir que al menos el 70 % de las plantas de dicha población tienen este poder nematocida, y preferentemente al menos del 80 al 90 % de las plantas, incluso más. Por tanto no se excluyen más que ciertas plantas, dentro de la población, que no tienen, individualmente, poder nematocida propio. Preferentemente, sin embargo, la población incluye solo un porcentaje muy pequeño, menos del 5 %, o inferior al 2 o 1 %, de plantas multiplicadoras del nemátodo.

El suelo o medio de cultivo infestado, o probablemente infestado, puede ser cualquier medio adecuado para el cultivo de zanahorias. En particular, puede ser tierra, o arena, o un terreno que comprende una mezcla de tierra y arena. Un medio de cultivo se considera infestado si incluye quistes de nemátodo *Heterodera carotae*, o si incluye estos nemátodos en cualquier otra etapa de desarrollo, por ejemplo si incluye juveniles J2. Generalmente se considera que un campo o medio de cultivo está infestado cuando dicho campo o medio de cultivo comprende al menos una larva J2 de nemátodo por gramo de suelo, o incluso un quiste. Más allá de este umbral, de hecho se considera que es necesario desinfectarlo antes de cultivar zanahorias comerciales, destinadas a la alimentación.

Sin embargo, el uso según la presente invención también es aplicable a cualquier suelo o medio de cultivo que pueda estar infestado. Por ejemplo, es posible realizar un ciclo de desinfección con plantas nematocidas como parte de un plan de rotación de cultivos. También es concebible realizar dicha desinfección sistemáticamente antes de cualquier cultivo de zanahorias comerciales, o con el fin de comercializar el propio medio de cultivo.

Al implementar el uso como se ha descrito anteriormente, por tanto, es posible realizar una desinfección o desinfestación de un medio de cultivo infestado con el nemátodo, y así reducir la población de nemátodos dentro de dicho medio de cultivo en al menos un 40 %, preferentemente al menos 50 %, incluso más preferentemente al menos 60 % y muy particularmente al menos 75 %. Cabe señalar, sin embargo, que el nivel de reducción de población de nemátodos efectuada por el uso de plantas nematocidas según la presente invención, es una función del nivel inicial de infestación en el medio de crecimiento, el tiempo de cultivo de las plantas nematocidas, y también la densidad de las plantas nematocidas.

Preferentemente, como se detalló anteriormente, las plantas nematocidas según la invención se cultivan durante un tiempo de cultivo de al menos 3 meses, para generar el mayor poder nematocida, y más bien al menos cuatro meses, incluso cinco meses o seis meses. Es importante observar que este tiempo de cultivo difiere del tiempo de cultivo generalmente utilizado en el contexto del uso de zanahorias trampa. En efecto, en tal situación, la zanahoria cultivada debe retirarse del suelo una vez que ha provocado la eclosión de los quistes presentes en el medio de cultivo, pero antes de la formación de nuevos quistes o la aparición de muchos nemátodos masculinos desde las raíces. El uso de plantas nematocidas como se describe en el contexto de la invención es, por el contrario, más eficaz cuando la zanahoria nematocida permanece en el medio durante mucho tiempo, preferentemente hasta que las raíces estén completamente maduras, durante varias generaciones del nemátodo.

Asimismo, las plantas nematocidas se plantan con una densidad de semillas comparable o superior a la utilizada para las variedades de zanahorias, cultivadas para consumo. Las densidades particularmente adecuadas en el contexto de la invención son en particular aquellas entre 0,8 y 4 millones de semillas por hectárea, y preferentemente entre 0,8 y 2,5 millones de semillas por hectárea. De hecho tales densidades permiten generar una desinfección óptima del medio de cultivo.

Según una realización preferente de la invención, el uso de plantas nematocidas como se describe hace posible reducir el número de quistes o nemátodos hembras en el medio de cultivo en al menos un 50 %. En efecto, las plantas nematocidas según la presente invención también pueden causar una masculinización significativa de la población de larvas, sin reducir necesariamente su número, al menos inicialmente. Sin embargo, la reducción del número de hembras en beneficio de las larvas masculinas conduce a una reducción significativa en el número de quistes dentro del medio de cultivo.

Preferentemente, el uso como se describe hace posible reducir el nivel de infestación del medio de cultivo a menos de una larva hembra J2 de *Heterodera carotae* por gramo de medio o menos de un quiste de *Heterodera carotae* por gramo de medio. Tal reducción, por supuesto, se entiende como un medio de cultivo que comprende inicialmente, antes de implementar el uso según la invención, un medio de cultivo que comprende más de una larva J2 hembra o más de un quiste de *Heterodera carotae* por gramo de medio, por ejemplo al menos cinco larvas y/o quistes hembras J2 de *Heterodera carotae* por gramo de medio, por ejemplo, aproximadamente 10 larvas J2 y/o quistes por gramo de medio, o incluso más de 10 larvas J2 y/o quistes por gramo. Los suelos infestados pueden contener más de 30 o incluso más de 50 larvas J2 y/o quistes por gramo.

Las zanahorias de las semillas depositadas con el número NCIMB 42351 permiten obtener en particular las realizaciones preferentes descritas anteriormente, y más particularmente la reducción del número de larvas juveniles J2 y/o la reducción del número de quistes y/o la masculinización superior al 50 % de las larvas de nemátodos *Heterodera carotae* durante un cultivo de al menos 4 meses, así como reducir la población de nemátodos *Heterodera carotae* dentro del medio de cultivo al menos 60 %, más preferentemente al menos 75 %, reducción de al menos un 50 % en el número de quistes o nemátodos femeninos en el medio de cultivo, así como reducir el nivel de infestación

en el medio de cultivo a menos de una larva J2 hembra de *Heterodera carotae* por gramo de medio como se describió anteriormente. Tales plantas son, por ejemplo, plantas obtenidas por germinación de semillas depositadas NCIMB 42351, o bien por selección de plantas que tienen las propiedades esperadas, de plantas de las semillas depositadas, después de una o más cruces.

El uso de plantas nematocidas como se describe en la presente invención hace posible asegurar una desinfección que no solo sea adecuada desde un punto de vista ambiental y ecológico, sino que además sea reproducible, cierta y fácil de realizar. En efecto, el uso, por ejemplo, de zanahorias trampa apenas permite una desinfección reproducible. Por otro lado, si en ciertas condiciones, los cultivos comerciales de zanahoria pueden reducir el nivel de infestación (ver ejemplo 9), esta reducción no es en modo alguno reproducible (ver ejemplo 7, con la misma variedad comercial).

Según un segundo aspecto, la presente invención también se refiere a un método que hace posible desinfectar un suelo o medio de cultivo, o bien reducir la población de nemátodos, más particularmente de los nemátodos de quiste, específicamente *Heterodera carotae* en suelo o medio de cultivo infestado, o probablemente infestado con nemátodo de quiste *Heterodera carotae*. Dicho método de desinfección o desinfestación se basa, de manera original, en el cultivo de plantas *Daucus carota*, donde dichas plantas tienen un efecto nematocida sobre estos nemátodos.

Según una realización particularmente preferente, dicho método de desinfección no incluye una etapa de aplicar un producto químico nematocida, como 1,3 dicloropropeno o sus derivados, en cualquier forma. Por tanto, la desinfección es solo el resultado de la acción nematocida de las plantas cultivadas.

Según otra realización, el método de desinfección o desinfestación según la invención puede ir acompañado, precedido, seguido o complementado por la aplicación de un producto químico nematocida. En este caso, la etapa principal de cultivo de plantas nematocidas permite reducir la dosis del producto químico nematocida que habría sido necesario utilizar para obtener un nivel comparable de desinfección, en ausencia de cultivo de plantas nematocidas. Como parte de esta realización, el cultivo de plantas según la invención y la aplicación de productos químicos nematocidas pueden ser simultáneos, sucesivos o superpuestos total o parcialmente; el orden de las etapas no es decisivo.

Reducción de la población de nemátodos *Heterodera carotae* en un suelo o medio de cultivo infestado, o probablemente infestado con el nemátodo, significa preferentemente una reducción del número de quistes de dicho nemátodo, dentro del suelo o medio de cultivo, o bien una reducción de juveniles J2, o acumulativamente una reducción tanto del número de quistes como del número de juveniles J2 dentro del medio de cultivo.

Preferentemente, las plantas cultivadas como parte de este método de desinfección no pertenecen a la subespecie de zanahorias cultivadas *Daucus carota* subsp. *sativus*.

Las realizaciones preferentes detalladas en el contexto de los diferentes usos según el primer aspecto de la invención también son aplicables a los métodos según este segundo aspecto de la invención. En concreto, el método se realiza preferentemente con plantas nematocidas de la subespecie *Daucus carota dentatus*, o plantas derivadas de zanahorias de la subespecie *Daucus carota dentatus*, por ejemplo de un cruce inicial entre una planta *Daucus carota dentatus* y una planta *Daucus carota sativus*.

Al igual que con los diferentes usos de la invención, los métodos también se realizan preferentemente con zanahorias que se derivan o derivan de las semillas depositadas por Vilmorin en NCIMB el 20 de enero de 2015, con el número de registro NCIMB 42351. Tales plantas se obtienen, por ejemplo, por germinación directa de dichas semillas depositadas. También pueden ser plantas que se obtienen por propagación de zanahorias a partir de la germinación de semillas depositadas en NCIMB, o bien se obtienen por cruces con otras plantas, preferentemente de la especie *Daucus carota*. Dichas plantas se describen en la parte experimental de la presente solicitud. Las plantas nematocidas que pueden usarse en los métodos según la invención también son plantas regeneradas, opcionalmente *in vitro*, a partir de células vegetales obtenidas por germinación de semillas depositadas con el número NCIMB 42351. Sin embargo, los métodos de la invención no se limitan en modo alguno a las plantas nematocidas derivadas de las semillas depositadas con el número de registro, se pueden usar otras plantas *Daucus carota* que tengan un poder nematocida, que no sean *Daucus carota sativus*, y que sean identificables en particular por la realización de los ensayos descritos en los ejemplos de la parte experimental.

Como ya se mencionó, las plantas utilizadas en el contexto de la invención pueden ser una población de plantas nematocidas.

El suelo o medio de cultivo infestado, o probablemente infestado, es como se describe para los usos según la presente invención. Es preferentemente un campo, puede ser tierra o arena o una mezcla de los dos, o puede ser suelo arenoso.

Al realizar el método de la invención, es posible por tanto realizar una desinfección o desinfestación de un suelo o medio de cultivo, infestado con el nemátodo, y reducir así la población de nemátodos dentro de dicho medio de cultivo en al menos un 40 %, preferentemente al menos 50 %, incluso más preferentemente al menos 60 % y muy particularmente al menos 75 %. Por este método, es posible por tanto reducir el nivel de infestación del suelo o medio de cultivo a menos de una larva J2 hembra y/o quiste de *Heterodera carotae* por gramo de medio, es decir, por debajo del umbral correspondiente a un entorno denominado "infestado". El método se realiza preferentemente en un medio de cultivo que comprende más de una larva J2 y/o quistes por gramo de medio, preferentemente al menos 5 larvas J2 y/o quistes por gramo de medio, o bien aproximadamente 10 o más de 10 larvas J2 y/o quistes por gramo de medio, incluso 20, 25, 50 o más.

Según una realización preferente de la invención, el método reduce el número de quistes o nemátodos femeninos en el medio de cultivo en al menos un 50 %. La reducción del número de hembras puede deberse a una reducción general en el número de nemátodos, o a una proporción reducida de hembras en comparación con los machos. En efecto, las plantas nematocidas según la presente invención pueden causar una masculinización significativa de la población de

larvas, sin conducir necesariamente a una reducción inmediata de su número, al menos inicialmente. Sin embargo, la reducción del número de hembras a favor de las larvas masculinas conduce a una reducción drástica en el número de quistes en el suelo o en el medio de crecimiento.

El método según la invención comprende el cultivo de plantas nematocidas durante al menos 3 meses y preferentemente durante un período de al menos 4 meses, preferentemente al menos 5 meses, muy preferentemente al menos 6 meses. Como se observó con respecto a los usos según la invención, este tiempo de cultivo es muy diferente de los tiempos de cultivo aplicables en el contexto de un cultivo de zanahorias trampa, donde el mantenimiento de las zanahorias trampa más allá de los 3 meses conduce a aumentar el número de quistes o larvas infestados en lugar de disminuirlo. Por el contrario, el método según la invención es mucho más fácil de realizar ya que las zanahorias nematocidas se pueden eliminar en cualquier momento, preferentemente después de 4 meses, sin ningún efecto perjudicial en el nivel de infestación. En efecto, independientemente de cuándo se retiran, preferentemente después de 3 meses, siempre habrá una reducción del nivel de infestación en el medio de cultivo. El efecto nematocida óptimo se obtiene cuando se realiza aproximadamente un tiempo de cultivo correspondiente al ciclo de cultivo completo para una variedad comercial de zanahoria *D. carotae*, aproximadamente 6 meses. Sin embargo, ya se observa un buen efecto nematocida después de 3 meses de cultivo, preferentemente después de 4 meses. El tiempo de arrancado óptimo, teniendo en cuenta, por un lado, la ausencia de producción comercial durante el cultivo de zanahorias nematocidas y, por otro lado, el efecto nematocida óptimo, Parece ser entre 4 y 6 meses. Por supuesto, este tiempo óptimo debe determinarse teniendo en cuenta también la probabilidad de infestación del medio de cultivo y su nivel de infestación.

Según este método, las plantas nematocidas se plantan con una densidad de semillas comparable o superior a la utilizada para las llamadas zanahorias comerciales, cultivadas para consumo. Las densidades particularmente adecuadas en el contexto de la invención, cuando se realiza en campos, son en particular las comprendidas entre 0,8 y 4 millones de semillas por hectárea, y preferentemente entre 0,8 y 2,5 millones de semillas por hectárea. De hecho tales densidades permiten generar una desinfección óptima del medio de cultivo. Sin embargo, son posibles otras densidades, especialmente cuando se trata de pequeñas cantidades de medio de cultivo, o cuando el nivel de infestación es particularmente alto o particularmente bajo. La densidad también se puede adaptar según la composición del medio de cultivo.

Al realizar la invención, el cultivo de zanahorias nematocidas puede iniciarse en cualquier momento oportuno, según los cultivos que preceden y siguen al cultivo de zanahorias nematocidas. Según las realizaciones preferentes, dicho cultivo se inicia, por ejemplo, en otoño o invierno, para proporcionar el mejor rendimiento nematocida y/o el menor impacto en la rentabilidad. Dependiendo del clima u otras restricciones, por ejemplo económicas, el cultivo puede iniciarse sin embargo en otros momentos si esto resulta apropiado, necesario o deseable. El cultivo se inicia preferentemente sembrando semillas, aunque también puede ser posible trasplantar plántulas.

El método según la presente invención hace posible obtener una reducción de la población de nemátodos, especialmente hembras, de *Heterodera carotae* en un medio de cultivo infestado principalmente gracias a las propiedades nematocidas de las plantas cultivadas. Como se detalló antes, esta característica del método lo distingue en particular del cultivo de zanahorias trampa, donde la disminución de la población de nemátodos se debe al método de cultivo, y más particularmente al momento del arrancado, pero no plantas cultivadas.

Sin embargo, se pueden tomar ciertas medidas en el contexto de la invención para amplificar la reducción de la población de nemátodos; en concreto, ciertas condiciones de crecimiento o ciertos fertilizantes u otros, pueden aplicarse para amplificar el efecto nematocida generado por las plantas nematocidas según la invención. En concreto, las plantas se pueden cultivar opcionalmente en condiciones de higrometría insuficiente, en la medida en que se sabe que una cierta sequedad del medio de cultivo participa en la reducción de la población de nemátodos *Heterodera carotae*. De forma alternativa, el método puede realizarse en condiciones de humedad satisfactorias para un cultivo comercial de zanahoria.

Las zanahorias de las semillas depositadas con el número NCIMB 42351 permiten en particular obtener las aplicaciones preferentes descritas anteriormente, para los diversos métodos según la invención, en particular plantas obtenidas por germinación de las semillas depositadas.

Según otro aspecto, esta descripción también revela una población de plantas *Daucus carota*, o una población de semillas de zanahoria *Daucus carota*, que provienen o se obtienen de semillas depositadas con el número de registro NCIMB 42351 donde dicha población o dichas zanahorias tienen un efecto nematocida en los nemátodos, particularmente los nemátodos de quiste, y específicamente *Heterodera carotae*. El efecto nematocida es como se describe en la presente solicitud. Las plantas que se originan a partir de las semillas depositadas son en particular plantas obtenidas por germinación de dichas semillas. Las plantas o semillas que provienen o se obtienen de semillas depositadas también cubren plantas o semillas obtenidas cruzando o propagando plantas obtenidas por germinación de las plantas depositadas, así como todas las plantas derivadas de plantas obtenidas por germinación de semillas depositadas, sin embargo, siempre que tengan un poder nematocida, y en particular el poder nematocida como se describe para las plantas correspondientes a semillas depositadas e ilustradas en la parte experimental de la solicitud.

La presente descripción también desvela fragmentos de estas plantas, semillas, material reproductivo y células de estas plantas, que pueden regenerarse para obtener plantas resistentes o nematocidas.

Las realizaciones preferentes de la invención ya se han descrito en el contexto de aspectos anteriores de la invención; también son aplicables a este aspecto de la descripción. En concreto, el efecto nematocida de las plantas es preferentemente una reducción del número de juveniles J2 y/o una reducción del número de quistes y/o una masculinización mayor de 50 % larvas de nemátodos *Heterodera carotae*, preferentemente durante un tiempo de

cultivo de dichas zanahorias de al menos 3 meses.

Dicha población comprende al menos el 70 % de las plantas que presentan individualmente un poder nematocida como se describe, o bien el 70 % de las semillas que dan lugar a tales plantas. Preferentemente, la proporción es superior al 70 %, por ejemplo al menos 80 %, o incluso al menos 90 % o más.

5 Preferentemente, sin embargo, la población incluye solo un porcentaje muy pequeño, menos del 5 %, o inferior al 2 o 1 %, de plantas multiplicadoras de nemátodos, o semillas que dan lugar a tales plantas.

10 Como se detalló anteriormente, la presente invención se ilustra con plantas *Daucus carota* identificadas por los inventores y que presentan resistencia al nemátodo, especialmente al nemátodo de quiste *Heterodera carotae*, sin embargo, la invención no se limita al genotipo identificado por los inventores. En efecto, otras plantas que también presentan poder nematocida pueden ser identificadas fácilmente por el experto en la materia. Con este objetivo, un ensayo adecuado para determinar el poder nematocida de una planta o una población, o para seleccionar plantas con tal poder es el siguiente:

- 15 - Las semillas a analizar se siembran en una maceta llena de tierra infestada de aproximadamente 10 a 15 larvas de *Heterodera carotae* por gramo de tierra;
- El cultivo continúa durante 70 a 90 días en condiciones normales de cultivo;
- 20 - 70 a 90 días después de la siembra, las plantas se arrancan de raíz y se cuenta el número de hembras J2 a nivel de las raíces.

Una planta que tiene un poder nematocida según la invención es preferentemente una planta que tiene entre 0 y 10 hembras al nivel de las raíces al final de este ensayo. A la inversa, una planta con más de 100 hembras en el nivel de la raíz se considerará un multiplicador.

25 Con este protocolo, es fácil identificar plantas nematocidas, o seleccionar plantas nematocidas, especialmente en un programa de selección.

La presente descripción también desvela un producto fitosanitario, que permite la desinfección o desinfestación de un suelo o medio de cultivo, dicho producto comprendiendo plantas nematocidas o resistentes, como se describe. Todas las características ya descritas anteriormente son aplicables a este aspecto de la divulgación. En concreto, un producto de protección de plantas como se menciona puede comprender una población de plantas o semillas de *D. carota*, y preferentemente que no sea de la subespecie *Daucus carota sativus*, al menos el 70 % de ellas presentando un efecto o poder nematocida.

30 Es particularmente ventajoso que el producto fitosanitario no incluya plantas multiplicadoras, como se definió anteriormente.

35 Por tanto, la presente invención se caracteriza, entre otras cosas, por el hecho de cultivar o usar plantas *D. carota* no comerciales, es decir, no destinadas a su cosecha a la alimentación, particularmente alimentación humana, y para explotar la resistencia de estas plantas a *Heterodera carotae* para obtener un efecto nematocida, para desinfectar un campo infestado con este nemátodo.

40 Leyenda de figuras

Fig.1: El gráfico ilustra, para diferentes combinaciones híbridas resultantes de los genotipos identificados en el Ejemplo 1, así como para la variedad sensible Nanco, la distribución del número de hembras *Heterodera carotae* por planta, el número promedio de hembras por planta y el porcentaje de plantas con menos de 10 hembras *Heterodera carotae*.

45 Fig. 2: La tabla indica, para dos líneas F2 del genotipo HCR10, la distribución del número promedio de hembras, por planta, en dos años de cultivo.

Fig. 3 y 4: Estas cifras describen el número promedio de hembras presentes en las raíces, aproximadamente 80 a 90 días después de la siembra, en medios de cultivo infestados tomados de 5 zonas geográficas distintas, en campos de cultivo infestados por *Heterodera carotae* en Créance en la Manche, Plouhinec en Morbihan, Machecoul en Vendée, Carpentras en Vaucluse y Lambesc en Bouches du Rhône. Su nivel de contaminación varía de 4,46 a 13,86 larvas J2 por gramo de suelo.

La Figura 3 se refiere a la siembra del 3 de mayo con una lectura el 19 de julio, mientras que la figura 4 se refiere a la siembra del 28 de mayo con una lectura el 24 de agosto.

50 Fig. 5: La figura 5 ilustra los resultados presentados en la tabla 2. En abscisas, se encuentran los diferentes genotipos A a l ensayados. El porcentaje de plantas se muestra en ordenadas, dentro de un genotipo, perteneciente a cada una de las siguientes 9 clases: 0; 1 a 5 hembras; 5 a 10 hembras; 10 a 20 hembras; 20 a 30 hembras; 30 a 40 hembras; 40 a 50 hembras; 50 a 100 hembras y 100 a 1000 hembras.

60 Fig. 6: La figura 6 ilustra la tasa de multiplicación de quistes en el suelo de la maceta, donde se cultivan diferentes lotes de semillas, sensibles y resistentes, después de 4 meses y 6 meses de cultivo. La tasa de infestación en la siembra es idéntica en cada jardinera. % Tm significa: tasa de multiplicación de quistes en el suelo.

Parte experimental

65 Ejemplo 1: Identificación de plantas resistentes a *Heterodera carotae*

Los inventores procedieron en tres etapas sucesivas.

En un primer momento, probaron más de 3700 plantas diferentes, de diversos orígenes genéticos y geográficos mediante un ensayo de inoculación de raíces. Solo plantas sin nemátodos *Heterodera carotae* hembra, particularmente sin presentar quiste, fueron retenidas para el segundo análisis (ensayo de confirmación de resistencia *in vivo*).

5

A. Obtención de juveniles (J2) *Heterodera carotae*

Los quistes se cosechan de parcelas infectadas en Baja Normandía y se multiplican en invernaderos antes de almacenarse a 4 °C hasta su uso. Los quistes se humedecen en agua, durante 24 h, antes de su transferencia al exudado de raíz de zanahoria y se depositan en una habitación con aire acondicionado a 20 °C. Las larvas, hasta una semana de edad, se recogen y almacenan a 4 °C en agua.

10

B. Descontaminación de semillas de zanahoria e inoculación de larvas de *Heterodera carotae* (Etapa 1)

La descontaminación de las semillas de zanahoria se realiza a 52 °C en un baño de agua durante 18 minutos en agua estéril añadiendo SDS al 10 %. Las semillas luego se aclaran en agua estéril y se colocan en medio de agar al 1,5 %.

15

Las semillas germinadas se transfieren individualmente a una placa de Petri en medio de agar suplementado con microelementos, medio EM (Murashige T y Skoog F (1962)). Las juveniles *Heterodera carotae* de etapa J2 se inoculan en las plántulas cuya raíz alcanza de 1 a 2 cm de largo.

20

Siete J2 se depositan en el ápice de la raíz usando una pestaña. Las cajas se dejan 48 horas en el laboratorio antes de colocarlas en una habitación con aire acondicionado a 20 °C con un fotoperíodo de 16 h.

Para cada genotipo (planta) probado, se ponen 60 semillas para germinar. El número de plantas realmente evaluadas (inoculadas) para determinar su resistencia depende de la tasa de germinación obtenida en las placas de Petri.

25

Como control sensible se usa un híbrido comercial *Daucus Carota sativus* sensible al nemátodo de quiste. La variedad Nanco se elige para este fin como control sensible.

30

La lectura de las cajas se realiza entre 15 y 20 días después de la inoculación de juveniles de segunda etapa (D2). Se conservan todas las plantas que no permitieron el desarrollo de nemátodos o que solo permitieron el desarrollo de machos. Se eliminan las plantas con hembras.

C. Ensayos de confirmación de resistencia (Etapas 2 y 3)

35

Etapa 2:

Las plantas conservadas al final del ensayo *in vitro* se vuelven a enmacetar en una mezcla de arena y tierra para probarse por segunda vez, *in vivo*, en suelos naturales contaminados con quistes de *Heterodera carotae*.

40

El dispositivo consiste en un tubo de PVC de 20 cm de alto por 4,5 cm de diámetro que contiene suelo arenoso (70 % de arena y 30 % de tierra). El conjunto se coloca sobre un lecho de arena de Fontainebleau, se mantienen húmedas para garantizar una humedad constante. Las plantas se repican en contacto con una bolsita de 10 quistes de *Heterodera carotae*, de la misma población que durante el ensayo *in vitro*. La bolsita se puede reemplazar ventajosamente por un suministro directo de larvas en solución al pie de cada planta. El ensayo se realiza en un invernadero, en condiciones controladas de temperatura 20 °C ± 5 y fotoperíodo de 16 horas.

45

Dos meses después de su realización, las plantas se controlan una a una por su resistencia a *Heterodera carotae* observando las raíces, haciendo posible detectar la presencia o ausencia de hembras, especialmente la presencia o ausencia de quiste. Las plantas con hembras desarrolladas, especialmente quistes, se eliminan automáticamente ya que son sensibles, las otras se mantienen como potencialmente resistentes.

50

De 3720 plantas diferentes probadas, solo 32 son retenidas en esta etapa.

55

Etapa 3:

En tercer lugar, las 32 plantas seleccionadas se multiplican primero *in vitro* según los protocolos de embriogénesis somática bien conocidos por el experto en la materia, ver por ejemplo Stewardc, F.C. *et al* (1958), luego cuatro clones de cada genotipo se trasplantan en una mezcla de tierra y arena que contiene quistes de *Heterodera carotae* según el ensayo de la etapa 2. Solo se retienen los genotipos sin nemátodos *Heterodera carotae* hembra, especialmente sin quiste, respecto a ninguna de las 4 plantas clonadas: finalmente se retienen 11 genotipos al final de estas tres etapas sucesivas. Se presentan en la tabla 1 a continuación.

60

Tabla 1: genotipos probados que presentan resistencia a *Heterodera carotae* (HCR = *Heterodera carotae* Resistance)

Número de genotipo	Subespecie
HCR1	<i>Daucus carota</i> gummifer
HCR2	<i>Daucus carota</i> carota
HCR3	<i>Daucus carota</i> carota
HCR4	<i>Daucus carota</i> carota
HCR5	<i>Daucus carota</i> gummifer
HCR6	<i>Daucus carota</i> carota
HCR7	<i>Daucus carota</i> gummifer
HCR8	<i>Daucus carota</i> commutatus
HCR9	<i>Daucus carota</i> commutatus
HCR10	<i>Daucus carota</i> dentatus
HCR11	<i>Daucus carota</i> gummifer

Los inventores conservaron y multiplicaron estos 11 genotipos *in vitro*.

5

Ejemplo 2: Validación e identificación de resistencia a *Heterodera carotae*

Las 11 plantas conservadas en la etapa precedente se cruzan con plantas de zanahoria cultivadas *Daucus carota sativus* sensibles a *Heterodera carotae* para estudiar la heredabilidad de resistencia.

10

Las plantas híbridas de primera generación obtenidas por el crecimiento de genotipos resistentes con plantas *Daucus carota sativus* sensibles se siembran en macetas, en tierra tomada en campos infestados naturalmente por *Heterodera carotae*. La tasa media de infestación de *Heterodera carotae* de esta tierra es de 16 larvas por gramo de suelo. Antes de sembrar, las semillas se descontaminan en agua a 51 °C durante 12 minutos. Las macetas se colocan en el invernadero, a una temperatura de 20 °C. Los números son 100 semillas por combinación híbrida producida.

15

Las plantas se analizan entre 70 y 90 días después de la siembra, el sistema de raíces de cada planta se lava cuidadosamente y luego se aplica un chorro de agua a las raíces para separar las hembras adultas y la etapa J4.

20

Se encuentra que el 70 % de las plantas híbridas que tienen el genotipo HCR10 como planta madre tienen menos de 10 hembras a nivel de la raíz. Los resultados se presentan en la figura 1 para algunas combinaciones híbridas, así como para Nanco, la variedad sensible elegida como control: la tabla indica, para cada combinación híbrida, la distribución del número de hembras *Heterodera carotae* por planta, el número promedio de hembras *Heterodera carotae* por planta y el porcentaje de plantas con menos de 10 hembras *Heterodera carotae*.

25

Solo se retienen las plantas con un número reducido de 0 a 5 larvas hembra de *Heterodera carotae* y se autopolinizan para producir plantas de segunda generación.

30

La segunda generación se prueba en condiciones idénticas a las de los ensayos de primera generación, sembradas en macetas, en tierra tomada en campos infestados naturalmente por *Heterodera carotae*. La tasa promedio de infestación de *Heterodera carotae* de esta tierra es de 55 larvas por gramo de tierra. El control Nanco se comporta como se esperaba, con más del 97 % de las plantas de control analizadas con más de 200 hembras *Heterodera carotae*. El análisis de plantas de segunda generación del genotipo HCR10 muestra altos niveles de resistencia, más del 80 % de las plantas con menos de 100 hembras *Heterodera carotae*. El análisis se repite durante dos años, los resultados son sustancialmente idénticos y se presentan en la figura 2. Esta figura ilustra, para dos líneas F2 del genotipo HCR10, la distribución del número de hembras, en dos años.

35

De nuevo, solo plantas con un número reducido de larvas, pero esta vez de 0 a 10 larvas hembra de *Heterodera carotae* son retenidas y autopolinizadas para producir plantas de tercera generación.

40

Del mismo modo, las plantas de tercera generación se siembran en macetas, en tierra tomada en campos infestados naturalmente por *Heterodera carotae*. Solo plantas con un número reducido de 0 a 10 hembras por planta de larvas hembra *Heterodera carotae* retienen.

45

A lo largo de ensayos y generaciones, los inventores identificaron el genotipo HCR10 como una fuente potencial de resistencia a *Heterodera carotae*. La multiplicación del nemátodo es muy limitada con este genotipo: no solo las larvas están bloqueadas en la etapa J2 sino que también están fuertemente masculinizadas, destacando así una acción nematicida de dichas plantas. Las plantas de tercera generación del genotipo HCR10 son fenotípicamente aún muy cercanas al tipo silvestre, tienen una raíz blanca, muy poco tuberosa, con follaje céreo y brillante, un porte desplegado.

50

Ejemplo 3: Estabilidad de la resistencia respecto a diferentes poblaciones *Heterodera carotae*

Las plantas de segunda generación del genotipo HCR10 (F2.HCR10) se utilizan para este análisis: se siembran en

macetas, en suelo tomado de campos infestados naturalmente pero de orígenes geográficos múltiples que representan las diversas áreas del cultivo francesa donde *Heterodera carotae* está presente. La variedad sensible Nanco se utiliza como control sensible.

5 Las 5 poblaciones de *Heterodera carotae* se toman de campos de cultivo infestados de *Heterodera carotae* en Créance en la Manche, Plouhinec en Morbihan, Machecoul en Vendée, Carpentras en Vaucluse y Lambesc en Bouches du Rhône. Su nivel de contaminación varía de 4,46 a 13,86 larvas J2 por gramo de suelo.

10 Las figuras 3 y 4 describen el número promedio de hembras presentes en las raíces. Las plantas se analizan aproximadamente 80 a 90 días después de la siembra. Las plantas se arrancan delicadamente y luego se aclaran cuidadosamente el sistema de raíces de cada planta. Finalmente, los quistes se cuentan bajo un microscopio binocular.

Este experimento muestra que las plantas de segunda generación del genotipo HCR10 muestran resistencia contra diferentes poblaciones de *Heterodera carotae* probadas.

15 Ejemplo 4: Identificación del mecanismo de resistencia

20 Los clones de plantas resistentes se trasplantan a suelos contaminados con quistes de *Heterodera carotae*. Los clones de un control sensible sirven para controlar la dinámica de penetración del nemátodo controlando, al microscopio, las raíces en diferentes momentos después del inicio del experimento. Los inventores descubrieron que las larvas están bloqueadas en la etapa J2 y también que están fuertemente masculinizadas.

Ejemplo 5: Ensayos en invernadero y validación

25 El objeto de este experimento es probar el nivel de resistencia de diferentes plantas:

- plantas de segunda (F2.HCR10), tercera (F3.HCR10) y cuarta generación (F4.HCR10) descritas u obtenidas como se explica en los ejemplos 1 a 3 (genotipos A, B y E, respectivamente),
- 30 - plantas de tercera generación de cruces hermano x hermana obtenidas cruzando una planta de segunda generación del genotipo HCR10 seleccionada por su alto nivel de resistencia con otra planta de segunda generación del genotipo HCR10 seleccionada por su alto nivel de resistencia (genotipos C y D, correspondiente a AxA),
- plantas híbridas obtenidas cruzando una planta de segunda generación del genotipo HCR10 seleccionada por su alto nivel de resistencia con líneas de zanahoria *Daucus carota sativus* macho fértil y sensible al nemátodo
- 35 - *Heterodera carotae* (genotipos F, G y H);
- el genotipo I correspondiendo al control sensible Nanco.

40 Las plantas se siembran en tres series separadas (con la excepción de los genotipos D y E que se sembraron en dos de las 3 series), aproximadamente 20 plantas por serie para cada genotipo, en macetas de plástico (8*8*8) que contienen aproximadamente 380 g de tierra previamente homogeneizada con una mezcladora. El suelo está infestado de forma natural y proviene de Créance, en la Manche. La medida promedio de la tasa de infestación es de 15 larvas J2 por gramo de suelo. El riego se realiza maceta a maceta, Por encima.

45 La lectura del ensayo se realiza entre 70 y 90 días después de la siembra utilizando un método de lectura rápida: un recuento total de hembras (incluyendo quistes) para plantas con menos de 100 hembras. El recuento se detiene más allá de este valor de 100 hembras, y el valor "más de 100" se asigna a las plantas correspondientes.

50 Las plantas con una puntuación inferior a 5 hembras se almacenan y se trasplantan en una mezcla de tierra y arena libre de contaminación.

Las series se siembran en momentos distintos, entre septiembre y noviembre.

55 Los resultados se presentan en la tabla 2, que agrupa, para cada serie, plantas según su nivel de infestación ("clases" de plantas con 0 hembras, 1 a 5 hembras, 5 a 10 hembras, etc.). Entonces, para el genotipo A, 4 plantas de 63 plantas analizadas no muestran hembras, 17 plantas tienen de 1 a 5 hembras, etc.

El genotipo A corresponde al genotipo resistente (planta de segunda generación resistente derivada del genotipo HCR10) mientras que el genotipo I corresponde al control sensible.

60 Para las tres series, el nivel del control es lo suficientemente alto como para que el ensayo se considere discriminatorio.

La media M representa el número total de quistes contados para cada planta en cada serie, dividido entre el número de plantas analizadas por genotipo.

65 La distribución promedio entre las diferentes clases se ilustra en la figura 5, para cada uno de los genotipos probados.

Tabla 2: número de quistes por planta, para diferentes genotipos.

Clase	Genotipos								
	A	B	C	D	E	F	G	H	I
0	4	5	4	13	5	0	1	0	0
1 a 5	17	16	8	13	13	0	0	0	0
5 a 10	11	14	4	6	6	1	0	2	0
10 a 20	13	8	9	2	8	2	0	0	0
20 a 30	8	0	5	3	4	3	2	1	1
30 a 40	2	3	1	1	1	1	4	0	1
40 a 50	1	3	2	0	2	7	3	1	0
50 a 100	3	1	4	0	1	21	10	8	2
100 a 1000	4	1	3	1	0	22	42	47	61
S	63	51	40	39	40	57	62	59	65
M	21,397	13,3529	28,275	12,538	12,075	85,421	86,371	92,4375	323,615

Los resultados son los siguientes, para cada genotipo probado:

- 5 A: (F2.HCR10) genotipo resistente al control. Los resultados son coherentes con los obtenidos en los ensayos anteriores, con un alto nivel de resistencia (promedio general sobre las 3 series en 21.4) y la presencia de un pequeño porcentaje de plantas multiplicadoras (aproximadamente 10 %) en la cola de la distribución.
 B: (F3.HCR10, F3 derivado por autofecundación de la población F2.HCR10) genotipo interesante para las 3 series con aproximadamente el 50 % de las plantas con menos de 10 hembras. No obstante, se observará la presencia de un pequeño porcentaje de plantas multiplicadoras (aproximadamente 10 %) en la cola de la distribución.
 10 E: (F4.HCR10, F4 derivado por autofecundación de la población F3.HCR10) genotipo muy resistente (promedio general en las 2 series de 12.5). se observa la ausencia total de plantas multiplicadoras en la cola de la distribución.

15 Se observa, de una generación a la siguiente (F2, F3 luego F4) un aumento de la resistencia y una disminución del número de plantas multiplicadoras.

- C: perfil atípico con un porcentaje casi equivalente de plantas en todas las clases. Este tipo de perfil tiende a indicar un carácter oligogénico de la resistencia.
 20 D: genotipo muy resistente (promedio general sobre las dos series de 12.5). Se observa la ausencia casi completa de plantas multiplicadoras en la cola de la distribución.
 F, G y H: perfil idéntico al del control sensible I.

25 Estos tres genotipos (F, G, H) procedentes de un cruce con una línea comercial de élite sensible a *Heterodera carotae*, los resultados muestran que la resistencia es recesiva.

En consecuencia, el cruce entre ellos de individuos del genotipo HCR10 permitiría obtener individuos homocigotos para el carácter de resistencia en el caso de resistencia monogénica. Como es más probable que la resistencia sea oligogénica, los inventores continuaron los cruces para estabilizar una progenie resistente.

30 Ejemplo 6: Ensayos en bandeja:

El objeto de este experimento es probar el poder nematocida de las plantas de tercera generación del genotipo HCR10.

35 Se siembran 30 plantas F3 en 5 líneas de siembra en macetas (32*28*20 cm) que comprenden una altura de suelo de 18 cm infestada naturalmente (y que proviene de Créance). La infestación se mide al comienzo y al final del experimento, después del arrancado y esto, para cada bandeja.

El experimento se repite 2 veces.

	Rep 1	Rep 1	Rep 2	Rep 2
Genotipo	Genotipo I Sensible	Genotipo B	Genotipo I Sensible	Genotipo B
Pop inicial (D2/g)	10,92	18,80	10,6	22,07
Pop final (D2/g) 3 de febrero	14,46	9,86	-	-
Pop final (D2/g) 28 de marzo			27,51	9,33
Tm (Pf/Pi)	1,32	0,52	2,59	0,42
%	+ 32,5	- 47,53	+ 159	- 56

40 Genotipo I sensible (Nanco): según lo esperado, hay un aumento del nivel de población de *Heterodera carotae* en el suelo, después de arrancar las zanahorias. Este aumento es aún más significativo porque el tiempo de presencia del cultivo es importante (+ 32 y +159 %) que corresponde a la realización de una generación adicional en el caso de la segunda fecha de arrancado.

45

Genotipo B: En ambos casos, el nivel de población disminuye en aproximadamente un 50 %. La disminución es más marcada con un mayor tiempo de presencia. Los resultados podrían ser incluso mejores si el genotipo utilizado fuera más genéticamente: el ensayo del ejemplo 5 muestra que aproximadamente 10 % de las plantas son multiplicadores para este genotipo. No obstante, estos resultados son extremadamente alentadores y son del mismo nivel que los obtenidos en el caso de un cultivo trampa exitoso, realizado con una variedad clásica. Con una variedad clásica, la destrucción demasiado tardía, sin embargo, tiene el efecto contrario al buscado, es decir, un mantenimiento o un aumento de la población, según lo confirmado con el genotipo sensible I.

Con otros genotipos (incluyendo los genotipos E o D, desprovisto de plantas multiplicadoras), se deben obtener valores cercanos a los obtenidos en el caso de desinfección química (80-90 %), en Este ensayo.

Ejemplo 7: Validación del poder nematicida:

Se estableció un ensayo en invernadero artificial para medir el nivel de poder nematicida de un cultivo de zanahoria resistente a *Heterodera carotae*, identificado en los ejemplos anteriores.

Protocolo:

Este ensayo se realiza en macetas que contienen suelo contaminado naturalmente tomado de la región de Créance (Normandía). El criterio medido es la tasa de infestación del suelo (número de quistes) en el momento de la siembra y luego en diferentes fechas después de la siembra, lo que hace posible medir una tasa de multiplicación del nemátodo *Heterodera carotae* durante el cultivo.

El dispositivo utilizado es del tipo de aleatorización en bloques completos con 2 repeticiones por genotipo.

Material vegetal probado:
Control sensible: Nanco
Plantas resistentes:

- 2 lotes diferentes de F3.HCR10 (genotipo B en el ejemplo 5): F3.HCR10a y F3.HCR10b;
- 2 lotes diferentes de plantas de F3.HCR10 por multiplicación: F3.HCR10.Ma y F3.HCR10.Mb

Resultados:

Los inventores observaron una germinación muy pobre al realizar este ensayo: 33-34 % para Nanco y 0 a 14 % para las 4 líneas F3 resistentes, de las cuales 0 % para la línea F3.HCR10b. Esta mala tasa de germinación, observada para todas las plantas probadas, probablemente esté relacionada con malas condiciones durante la germinación.

Los inventores observaron que con Nanco, el control sensible, el aumento de la población de nemátodos es del 430 % después de 6 meses de cultivo, a pesar de las malas condiciones de germinación.

Para las líneas F3.HCR10a y F3.HCR10.Ma, se observa una disminución de la tasa de infestación del suelo de aproximadamente 20 % (F3.HCR10.Ma) a aproximadamente 40 % (F3.HCR10a), después de 6 meses de cultivo, y a pesar de las malas condiciones de germinación.

Conclusión:

El poder nematicida está bien confirmado por este ensayo.

Sin embargo, dada la germinación muy pobre durante este ensayo, no es posible concluir precisamente sobre el nivel de poder nematicida de este material resistente a *Heterodera carotae*.

Ejemplo 8: Creación de lotes de semillas de los genotipos más resistentes.

Se realizó una multiplicación de los F3 mejor identificados en grandes jaulas y en un túnel de plástico (la fecundación se realiza al azar por los insectos), para depositar semillas, para obtener:

- una población sintética creada a partir del entrecruzamiento de las plantas F3 más resistentes;
- una población F4.HCR10.M, correspondiente a una multiplicación de la línea F4.HCR10 descrita en el ejemplo 5, cuyo poder nematicida ya ha sido confirmado.

Las semillas depositadas el 20 de enero de 2015 en NCIMB, con el número de registro NCIMB 42351 y referencia *Daucus carota* DCHR1, corresponden a una multiplicación de la población F4.HCR10.M, bautizada F4.HCR10.MM.

Ejemplo 9: Nueva validación del poder nematicida en una jardinera

Este ensayo se realiza para evaluar el efecto nematocida de una población de zanahorias en *Heterodera carotae*. Se realiza en jardineras, cada genotipo siendo probado en una jardinera de dos hileras. Para garantizar la solidez del ensayo, se realizan dos repeticiones.

5 El seguimiento del efecto nematocida se realiza contando el número de quistes en el suelo infectado utilizando muestras antes de la siembra, a mediados el ensayo 4 meses después de la siembra, y al final el ensayo 6 meses después de la siembra, lo que hace posible medir una tasa de multiplicación del nemátodo *Heterodera carotae* durante el cultivo.

10 Inóculo: Inóculo natural: Tierra de un campo infestado de nemátodos *Heterodera carotae*. Este inóculo si homogeneiza bien en una mezcladora.

Preparación de jardineras: jardineras agujereadas de 29 litros H: 20 cm, L: 98 cm, l: 25 cm (1 jardinera por genotipo y por repetición) se rellenan estrictamente con la misma cantidad de tierra.

15 Material vegetal probado:

- Lote 1. Nanco: control sensible
- Lote 2. Línea F4 resistente (F4.HCR10.M, ver ejemplo 8)
- Lote 3. Una población sintética, como se describe en el ejemplo 8
- 20 Lote 4. Línea Pseudo F3 resistente
- Lote 5. Línea Pseudo F3 resistente

25 Siembra: las semillas se siembran dejando un espacio de 5 cm entre las semillas y el borde, para evitar un efecto de bordura. La siembra se realiza en dos hileras paralelas de 70 cm con 60 semillas por hilera distribuidas de manera uniforme en toda la longitud. Toma de muestras: Durante el ensayo, se realizan 3 tomas de muestras de 3 muestras de cada jardinera. La muestra n.º 1 corresponde a la muestra antes de la siembra, n.º 2 corresponde a la muestra 4 meses después de la siembra y n.º 3 corresponde a la muestra 6 meses después de la siembra.

30 Resultados:

- Los inventores observaron una buena germinación para todos los lotes probados, excepto el lote 4 (25 %), pero un desarrollo muy pobre de las plantas del control sensible Nanco (retraso de crecimiento muy significativo). Debido al retraso del crecimiento del control sensible, los resultados de la multiplicación de nemátodos no son coherentes con los resultados obtenidos en años anteriores en este tipo de ensayo. En efecto, el retraso del crecimiento conduce a la introducción de un sesgo de los resultados: mientras que en todos los ensayos anteriores se observó una multiplicación del nemátodo en el suelo (de 159 a 430 % para controles sensibles), aquí se observa una disminución del 52 % de los nemátodos. El desarrollo deficiente de la raíz probablemente tuvo un impacto en el ciclo del nemátodo.
- 3 de los genotipos probados permiten una reducción de la tasa de infestación del suelo del 62 % al 87 % después de 6 meses de cultivo;
- para uno de los genotipos (Lote 5, pseudo resistente a F3), a un aumento del 60 % en la población de nemátodos después de 6 meses de cultivo, lo cual es inesperado.

45 Los resultados se ilustran en la figura 6. Las tablas a continuación informan el análisis de varianza y los resultados del ensayo de Newman-Keuls en el umbral del 5 %.

Análisis de varianza:

	S.C.E	DDL	C.M.	ENSAYO F	PROBA
VarTOTAL	28367,288735	9	3151,920971		
Var.FACTOR 1	26750,325501	4	6687,581375	25,584440	0,006094
Var.BLOQUES	571,393143	1	571,393143	2,185958	0,212694
VAR.RESIDUAL 1	1045,570091	4	261,392523		

50 Ensayo de Newman-Keuls en umbral 5 %

Modalidad	Promedio	Grupos homogéneos
Lote 5	59,842520	A
Lote 1: NANCO	- 51,968504	B
Lote 4	- 62,204724	B
Lote 3	- 64,566929	B
Lote 2	- 86,614173	B

Conclusiones:

El poder nematocida relacionado con esta resistencia se confirma nuevamente mediante el ensayo realizado.

5 El genotipo F4.HCR10.M resistente a *Heterodera carotae*, con un poder nematocida de aproximadamente 80 % después de 4 a 6 meses de cultivo, proporciona un efecto comparable a un tratamiento químico (que tiene una eficacia del 80-90 %).

Este genotipo ya había mostrado el mejor poder nematocida en el ensayo anterior; las semillas obtenidas por multiplicación de este genotipo se depositaron en NCIMB con el número NCIMB 42351.

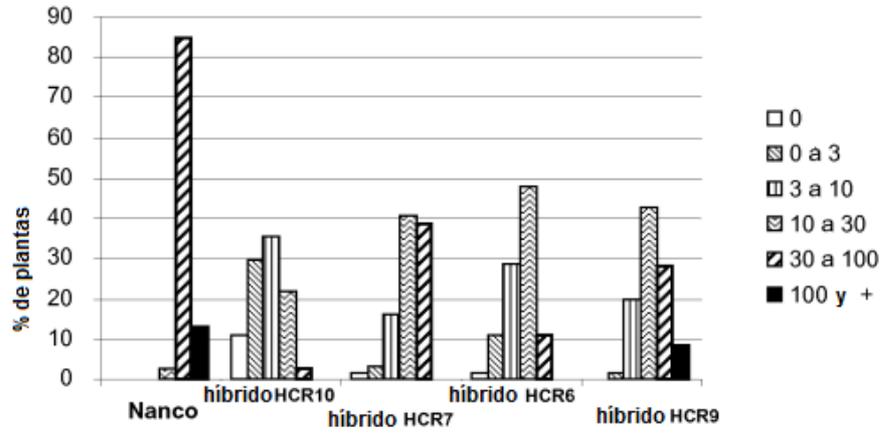
10 BIBLIOGRAFÍA

Murashige T y Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15(3): 473-497.

15 Steward, F.C., Mapes, M.O., y Smith, J. (1958). Growth and organized development of cultured cells. I, II y III. Growth and division of freely suspended cells. *Am. J. Bot.* 45

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de plantas *Daucus carota* que no pertenecen a la subespecie de zanahorias cultivadas *Daucus carota sp. Sativus*, para desinfectar un medio de cultivo infestado por nemátodos *Heterodera carotae*, dichas plantas presentando un efecto nematicida.
- 10 2. Uso según la reivindicación 1, en donde el efecto nematicida es una reducción del número de larvas juveniles J2 y/o una reducción del número de quistes y/o una masculinización superior al 50 % de las larvas del nemátodo *Heterodera carotae* durante un cultivo de al menos 4 meses de dichas plantas.
- 15 3. Uso según la reivindicación 1, en donde dichas plantas provienen de semillas depositadas en el NCIMB con el número de registro NCIMB 42351.
- 15 4. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el medio de cultivo infestado es tierra o arena.
- 20 5. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que permite reducir la población de nemátodos *Heterodera carotae* dentro del medio de cultivo al menos al 40 %.
- 20 6. Uso según la reivindicación 5, que permite reducir la población de nemátodos *Heterodera carotae* dentro del medio de cultivo al menos al 50 %.
- 25 7. Uso según la reivindicación 5, que permite reducir la población de nemátodos *Heterodera carotae* dentro del medio de cultivo al menos al 60 %.
- 25 8. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que permite reducir al menos en un 50 % el número de quistes o nemátodos hembra del medio de cultivo.
- 30 9. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que permite reducir el nivel de infestación del medio de cultivo a menos de una larva J2 hembra de *Heterodera carotae* por gramo de medio.
- 30 10. Método para reducir la población de nemátodos *Heterodera carotae* en un medio de cultivo infestado, que comprende el cultivo de plantas *Daucus carota* que no pertenecen a la subespecie de zanahorias cultivadas *Daucus carota sp. Sativus*, durante un periodo de al menos 4 meses, en donde dichas plantas tienen un efecto nematicida en dichos nemátodos.
- 35 11. Método según la reivindicación 10, en donde dicho cultivo dura al menos 5 meses.
- 35 12. Método según la reivindicación 11, en donde dicho cultivo dura al menos 6 meses.
- 40 13. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, en donde dicho cultivo se realiza a una densidad de 0,8 a 4 millones de semillas por hectárea.



Media Hembras / planta	70,4	7,4	32,2	16,7	35,6
% de plantas < 10 hembras	0	75,7	20,9	41,1	21,3

FIG. 1

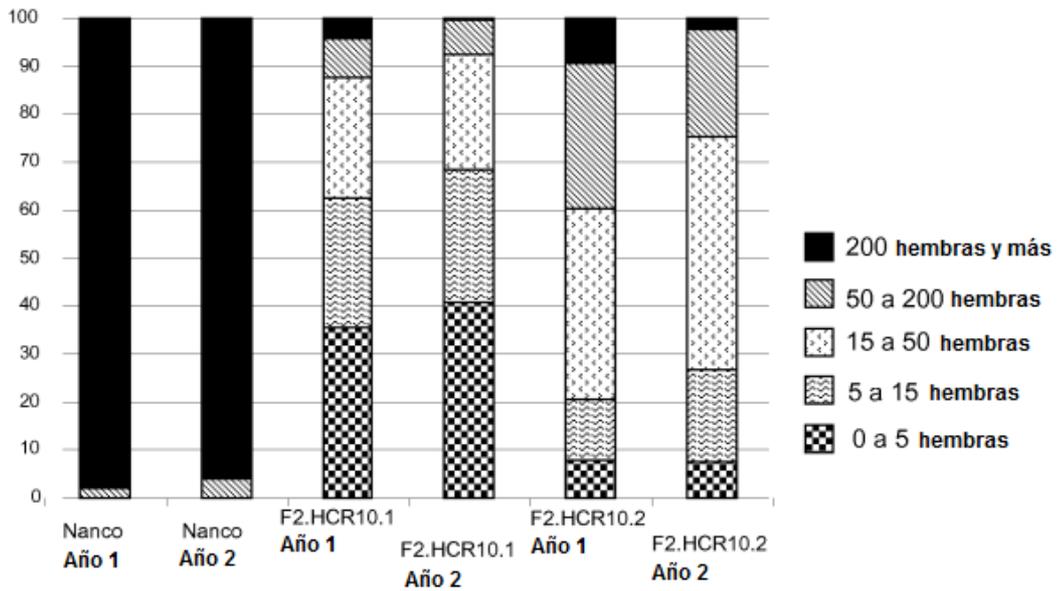


FIG. 2

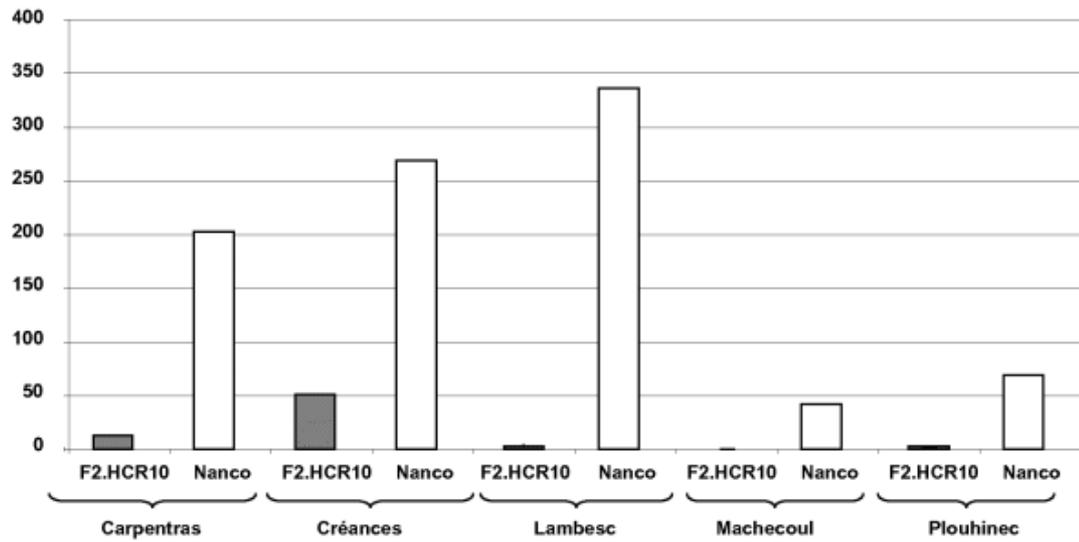


FIG. 3

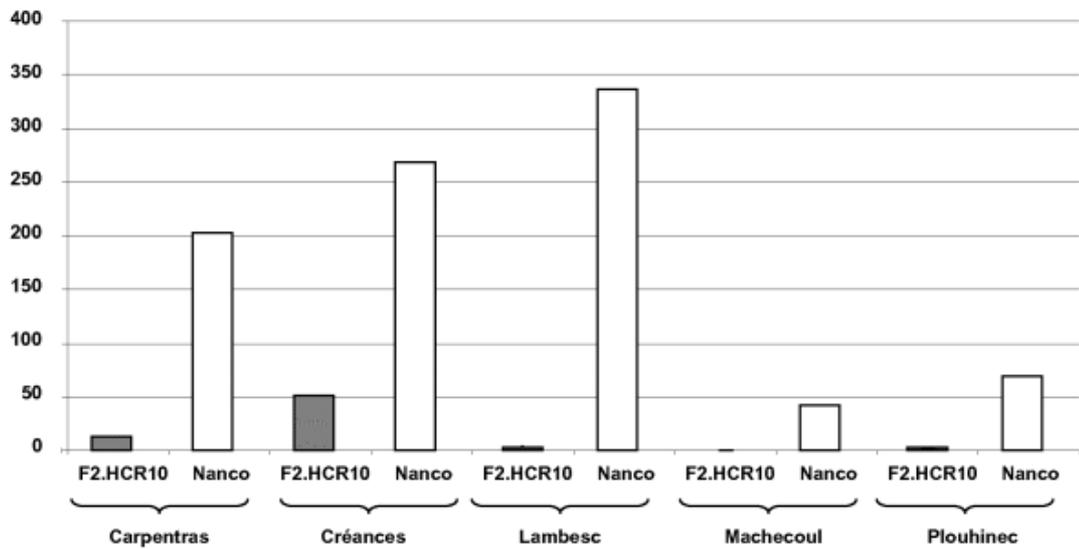


FIG. 4

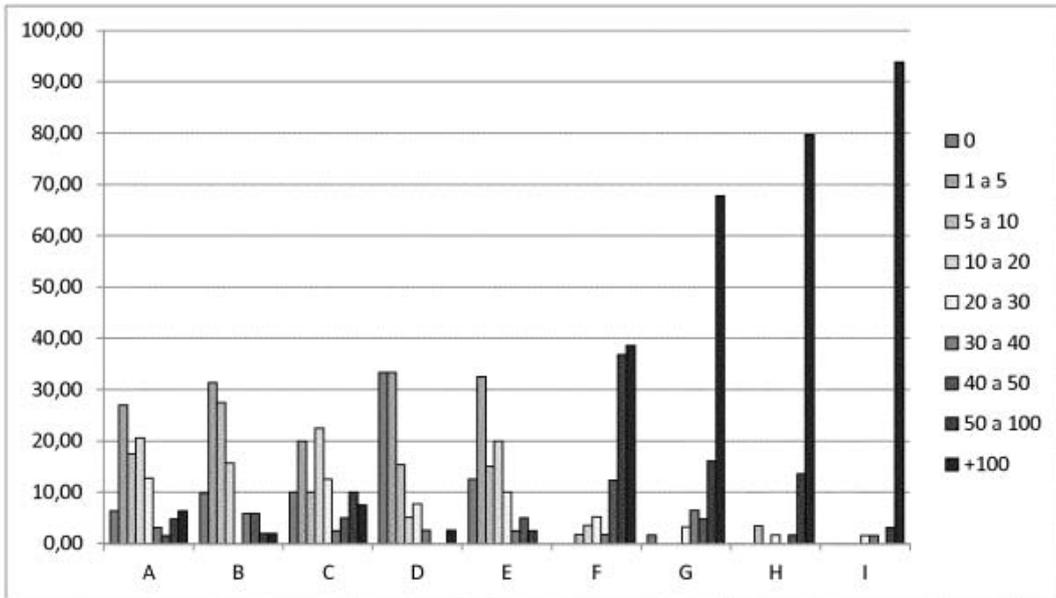


FIG. 5

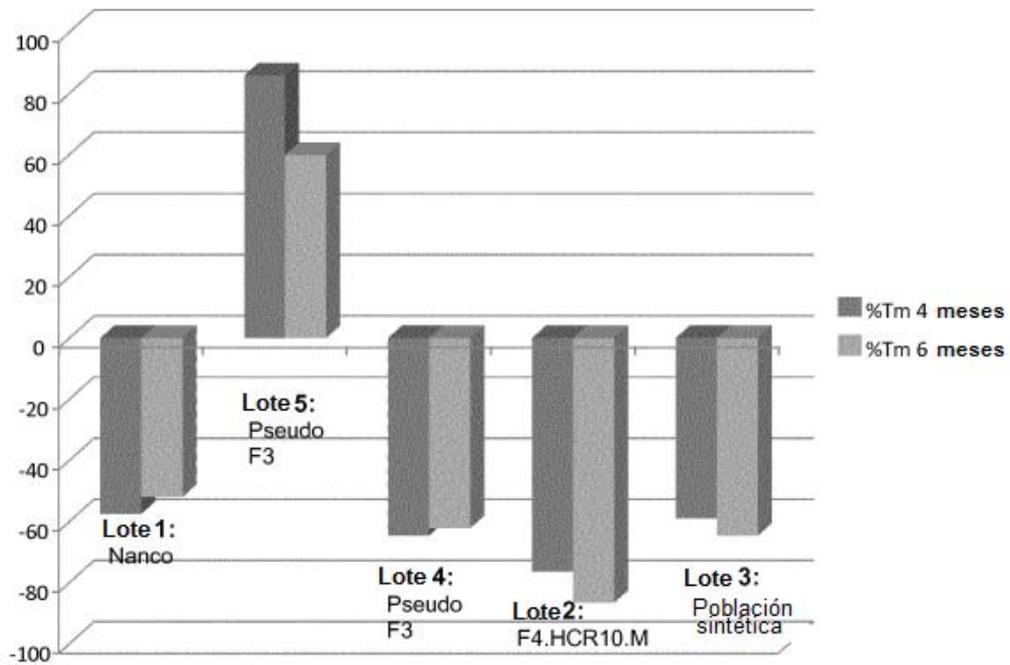


FIG. 6