(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 287 898**

(51) Int. Cl.:
A01N 65/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Número de solicitud europea: **05702143 .8**
(86) Fecha de presentación : **07.02.2005**
(87) Número de publicación de la solicitud: **1711061**
(87) Fecha de publicación de la solicitud: **18.10.2006**

(54) Título: **Nematocidas.**

(30) Prioridad: **07.02.2004 GB 0402728**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.12.2007

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.12.2007

(73) Titular/es: **Pharming Limited**
Stanley House 27 Wellington Road
Bilston, West Midlands WV14 6AH, GB

(72) Inventor/es: **Baekelmans, Ivo;**
Brown, Ron, Herbert y
Mueller-Harvey, Irene

(74) Agente: **González Palmero, Fe**

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).

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. Pº de la Castellana, 75 – 28071 Madrid

DESCRIPCIÓN

Nematocidas.

La presente invención se refiere al uso de pepitas de níspola para destruir, inactivar o repeler nematodos, y en particular como nematicida, es decir, una composición que destruye nematodos, y más particularmente como un nematicida que destruye selectivamente nematodos parásitos de plantas. La invención también se refiere a procedimientos para destruir nematodos y a composiciones nematicidas y sus procedimientos de fabricación.

Los nematodos son un tipo de gusano similar a un organismo. Hay diferentes grupos tróficos de nematodos: los que se alimentan de hongos, los que se alimentan de bacterias, predadores y parásitos de plantas. Los nematodos parásitos de plantas, tales como los nematodos de la raíz, son plagas debido a que producen que las plantas se atrofien, marchiten y/o amarilleen, frecuentemente se desarrollan agallas por las raíces de la planta debido a la alimentación de los nematodos en las raíces de las plantas. Las plantas que son particularmente vulnerables a nematodos parásitos de plantas incluyen banana, pimiento, zanahoria, apio, cucúrbitas, judías, berenjena, jengibre, uva, kiwi, fresa, lechuga, clavel, crisantemo, rosa, papaya, fruta de la pasión, piña, melocotón, calabaza, nectarina y tomate.

Por tanto, existe la necesidad de nematicidas para controlar nematodos parásitos de plantas; en particular nematicidas que destruyen selectivamente nematodos parásitos de plantas respecto a otros nematodos.

La níspola (*Eriobotrya japonica*) es un fruto de la familia de las rosáceas. La familia de las rosáceas también incluye los frutos del género Prunus, que incluyen almendras, albaricoques, melocotones, ciruelas, nectarinas y cerezas. La níspola también se conoce como níspero y, por tanto, las referencias en lo sucesivo a la níspola deben interpretarse en consecuencia.

La níspola se clasifica como un fruto del tipo "pomo"; los pomos son frutas carnosas que tienen una fina piel que está constituida por el tejido alargado del receptáculo que encierra el ovario y las semillas. Otros pomos incluyen manzana, pera y membrillo, aunque las semillas de la níspola son muy grandes (aproximadamente 1-3 cm de diámetro) en comparación con las semillas de manzanas o peras.

Las hojas, pepitas y fruto de la níspola son conocidos por sus usos medicinales; en particular, se dice que el fruto actúa como un sedante y alivia la tos y los vómitos, mientras que sus hojas y las pepitas contienen laetril, que se cree que tiene propiedades anticancerígenas. Sin embargo, hasta la fecha no ha habido ninguna enseñanza respecto al uso de la níspola en aplicaciones pesticidas.

La presente invención proporciona el uso de pepitas de níspola para destruir, inactivar o repeler nematodos. En una realización particularmente preferida se proporciona el uso de pepitas de níspola como nematicida.

Los presentes inventores han identificado que las pepitas de níspola pueden usarse eficazmente en la destrucción, inactivación y/o repulsión de nematodos.

En particular, la invención proporciona el uso de pepitas de níspola como un nematicida para nematodos parásitos de plantas, preferentemente como un nematicida selectivo para nematodos parásitos de plantas.

Como puede verse en los ejemplos, la destrucción selectiva de nematodos parásitos de plantas puede lograrse sorprendentemente mediante la aplicación de pepitas de níspola.

En particular, se proporciona el uso de pepitas de níspola como un tratamiento selectivo para nematodos en hongos. Como puede verse en los ejemplos, las pepitas de níspola actúan selectivamente como un nematicida; no actúan como un fungicida.

Las pepitas pueden usarse en cualquier forma adecuada; en particular pueden proporcionarse en forma molida, cortada en trozos pequeños, liofilizada o secada por pulverización o en forma de un extracto. Cuando está en forma de un extracto puede usarse cualquier disolvente adecuado, por ejemplo un disolvente acuoso tal como agua, o un disolvente orgánico tal como etanol, acetona o diclorometano. En una realización, las pepitas se usan en forma de un extracto en agua. En una realización alternativa, las pepitas se usan en forma de un extracto en etanol.

En una realización se usan todos los componentes solubles de las pepitas de níspola; en particular pueden usarse adecuadamente todos los componentes solubles en agua y/o todos los componentes solubles en etanol de las pepitas de níspola.

Las pepitas de níspola pueden usarse en forma de un extracto, preferentemente un extracto en agua que tiene una concentración cero o sustancialmente cero de compuestos volátiles; en particular, del extracto pueden haberse eliminado adecuadamente todos o sustancialmente todos los compuestos volátiles.

En una realización alternativa, las pepitas de níspola se usan en forma molida. En esta realización, las pepitas pueden haberse molido a cualquier tamaño adecuado. Preferentemente, las pepitas se han molido para atravesar un tamiz de 5 mm, más preferentemente un tamiz de 2 mm, lo más preferido un tamiz de 1 mm.

Sin embargo, se prefiere que las pepitas no se hayan molido demasiado finas, ya que un material tal se descompondría relativamente rápido y por tanto sería menos eficaz; por tanto, se prefiere que el 50% o más de las pepitas molidas no atraviesen un tamiz de 0,05 mm; más preferentemente el 60% o más, tal como el 70% o más, por ejemplo el 80% o más. En una realización, las pepitas se han molido de forma que el 50% o más de las pepitas molidas no atravesarán un tamiz de 0,1 mm; más preferentemente el 60% o más, tal como el 70% o más, por ejemplo el 80% o más.

Las pepitas de níspola pueden usarse en cualquier cantidad o concentración adecuada; claramente, la cantidad usada debería seleccionarse apropiadamente en función de la aplicación prevista.

Si se considera una base en peso/volumen, las pepitas de níspola pueden usarse adecuadamente en concentraciones de 10 g/l o más, preferentemente 15 g/l o más, más preferentemente 20 g/l o más, lo más preferido 25 g/l o más, por ejemplo 30 g/l o más.

Si se considera una base en peso/peso, las pepitas de níspola pueden usarse adecuadamente en concentraciones de 10 g/kg o más, preferentemente 15 g/kg o más, más preferentemente 20 g/kg o más, lo más preferido 25 g/kg o más, por ejemplo 30 g/kg o más.

Además, en un segundo aspecto la invención proporciona un procedimiento para destruir, inactivar o repeler nematodos, procedimiento que comprende proporcionar pepitas de níspola y aplicar las pepitas de níspola a los nematodos o a un área en la que probablemente vivan los nematodos o a un área en la que se espera se muevan los nematodos.

El procedimiento comprende de manera adecuada proporcionar las pepitas de níspola en forma molida, cortada en trozos pequeños, liofilizada o secada por pulverización o en forma de un extracto. Cuando se proporciona en forma de un extracto puede usarse cualquier disolvente adecuado; por ejemplo un disolvente acuoso tal como agua, o un disolvente orgánico tal como etanol, acetona o diclorometano. En una realización, las pepitas se proporcionan en forma de un extracto en agua. En una realización alternativa, las pepitas se proporcionan en forma de un extracto en etanol.

Adecuadamente pueden proporcionarse todos los componentes solubles de las pepitas de níspola, en particular pueden proporcionarse adecuadamente todos los componentes solubles en agua y/o todos los componentes solubles en etanol de las pepitas de níspola.

En una realización, las pepitas de níspola se proporcionan en forma de un extracto, tal como un extracto en agua, del que se han eliminado todos o sustancialmente todos los compuestos volátiles.

En una realización alternativa, las pepitas de níspola se proporcionan en forma molida.

El procedimiento puede comprender adecuadamente las etapas de proporcionar pepitas de níspola, tomar un extracto de las mismas y aplicar el extracto de pepitas de níspola a los nematodos o a un área en la que probablemente vivan los nematodos o a un área en la que se espera se muevan los nematodos.

En particular, la etapa de tomar un extracto de las pepitas de níspola puede comprender tomar un extracto de las pepitas con agua o con etanol.

El procedimiento puede comprender adicionalmente la etapa de eliminar todos o sustancialmente todos los compuestos volátiles del extracto antes de la etapa de aplicar el extracto.

El procedimiento puede comprender alternativamente las etapas de proporcionar pepitas de níspola, molerlas y aplicar las pepitas de níspola molidas a los nematodos o a un área en la que probablemente vivan los nematodos o a un área en la que se espera se muevan los nematodos.

Las pepitas pueden molerse a cualquier tamaño adecuado. Preferentemente, las pepitas se muelen para atravesar un tamiz de 5 mm, más preferentemente un tamiz de 2 mm, lo más preferido un tamiz de 1 mm.

Sin embargo, se prefiere que las pepitas no se muelan demasiados finas, ya que un material tal se descompondría relativamente rápido y por tanto sería menos eficaz; por tanto, se prefiere que el 50% o más de las pepitas molidas no atraviesen un tamiz de 0,05 mm; más preferentemente el 60% o más, tal como el 70% o más, por ejemplo el 80% o más. En una realización, las pepitas están molidas de forma tal que el 50% o más de las pepitas molidas no atravesarán un tamiz de 0,1 mm; más preferentemente el 60% o más, tal como el 70% o más, por ejemplo el 80% o más.

Las pepitas de níspola pueden aplicarse en cualquier cantidad o concentración adecuada; claramente, la cantidad usada debería seleccionarse apropiadamente en función de la aplicación prevista.

Si se considera una base en peso/volumen, las pepitas de níspola pueden aplicarse adecuadamente en concentraciones de 10 g/l o más, preferentemente 15 g/l o más, más preferentemente 20 g/l o más, lo más preferido 25 g/l o más, por ejemplo 30 g/l o más.

Si se considera una base en peso/peso, las pepitas de níspola pueden aplicarse adecuadamente en concentraciones de 10 g/kg o más, preferentemente 15 g/kg o más, más preferentemente 20 g/kg o más, lo más preferido 25 g/kg o más, por ejemplo 30 g/kg o más.

Preferentemente, los nematodos son nematodos parásitos de plantas, por ejemplo nematodos de la raíz tales como *Meloidogyne spp*.

Se prefiere que el procedimiento sea un procedimiento para destruir selectivamente nematodos parásitos de plantas.

Se prefiere que el procedimiento sea un procedimiento para destruir selectivamente nematodos en hongos.

El procedimiento puede implicar adecuadamente aplicar pepitas de níspola a un medio de crecimiento tal como tierra, turba, arena o agua, en un área en la que se cree que viven los nematodos o a un medio de crecimiento tal como tierra, turba, arena o agua, en un área en la que se espera se muevan los nematodos. Por ejemplo, las pepitas de níspola pueden aplicarse a o mezclarse con un medio de crecimiento tal como tierra, turba, arena o agua que tiene plantas plantadas en él o pueden aplicarse a o mezclarse con un medio de crecimiento tal como tierra, turba, arena o agua que tiene plantas plantadas en él, especialmente cuando las plantas son aquellas que son vulnerables a nematodos.

Además, en un tercer aspecto la invención proporciona un nematicida que comprende pepitas de níspola y un disolvente, soporte, excipiente o diluyente pesticidamente aceptable.

El nematicida puede comprender adecuadamente todos los componentes de pepitas de níspola solubles, en particular todos los componentes solubles en agua y/o todos los componentes solubles en etanol de pepitas de níspola.

Adecuadamente, el nematicida comprende, cuando se considera una base en peso/volumen, 10 g/l de pepitas de níspola o más, preferentemente 15 g/l o más, más preferentemente 20 g/l o más, lo más preferido 25 g/l o más, por ejemplo 30 g/l o más.

Si se considera una base en peso/peso, el nematicida comprende adecuadamente 10 g/kg de pepitas de níspola o más, preferentemente 15 g/kg o más, más preferentemente 20 g/kg o más, lo más preferido 25 g/kg o más, por ejemplo 30 g/kg o más.

El nematicida puede comprender las pepitas en forma molida, cortada en trozos pequeños, liofilizada o secada por pulverización o en forma de un extracto. Cuando está en forma de un extracto puede usarse cualquier disolvente adecuado, por ejemplo un disolvente acuoso tal como agua o un disolvente orgánico tal como etanol, acetona o diclorometano. En una realización, el nematicida comprende un extracto de pepitas de níspola en un disolvente, soporte, excipiente o diluyente pesticidamente aceptable. Preferentemente, el nematicida comprende un extracto de pepitas de níspola en agua.

En una realización particular tal, el nematicida comprende un extracto de pepitas de níspola, preferentemente un extracto en agua, que tiene una concentración cero o sustancialmente cero de compuestos volátiles. En particular, el nematicida puede comprender un extracto de pepitas de níspola, preferentemente un extracto en agua, del que se han eliminado todos o sustancialmente todos los compuestos volátiles.

En una realización alternativa, el nematicida comprende pepitas de níspola en forma molida. En esta realización, las pepitas pueden haberse molido a cualquier tamaño adecuado. Preferentemente, las pepitas se han molido para atravesar un tamiz de 5 mm, más preferentemente un tamiz de 2 mm, lo más preferido un tamiz de 1 mm.

Sin embargo, se prefiere que las pepitas no se hayan molido demasiado finas, ya que un material tal se descompondría relativamente rápido y por tanto sería menos eficaz; por tanto, se prefiere que el 50% o más de las pepitas molidas no atraviesen un tamiz de 0,05 mm; más preferentemente el 60% o más, tal como el 70% o más, por ejemplo el 80% o más. En una realización, las pepitas se han molido de forma que el 50% o más de las pepitas molidas no atravesarán un tamiz de 0,1 mm; más preferentemente el 60% o más, tal como el 70% o más, por ejemplo el 80% o más.

La presente invención también proporciona, en un cuarto aspecto, un procedimiento para producir un nematicida, procedimiento que comprende proporcionar pepitas de níspola molidas, cortadas en trozos pequeños, liofilizadas o secadas por pulverización.

En una realización, el procedimiento comprende proporcionar pepitas de níspola molidas. En esta realización, las pepitas pueden haberse molido a cualquier tamaño adecuado. Preferentemente, las pepitas se han molido para atravesar un tamiz de 5 mm, más preferentemente un tamiz de 2 mm, lo más preferido un tamiz de 1 mm.

Sin embargo, se prefiere que las pepitas no se hayan molido demasiado finas, ya que un material tal se descompondría relativamente rápido y por tanto sería menos eficaz; por tanto, se prefiere que el 50% o más de las pepitas molidas no atraviesen un tamiz de 0,05 mm; más preferentemente el 60% o más, tal como el 70% o más, por ejemplo el 80% o más. En una realización, las pepitas se han molido de forma que el 50% o más de las pepitas molidas no atravesarán un tamiz de 0,1 mm; más preferentemente el 60% o más, tal como el 70% o más, por ejemplo el 80% o más.

En una realización particular tal, la etapa de proporcionar pepitas de níspola molidas comprende las subetapas de proporcionar pepitas de níspola y luego moler las pepitas.

En una realización, el procedimiento comprende proporcionar pepitas de níspola molidas y además comprende la etapa de tomar extractos de las pepitas de níspola molidas. Puede usarse cualquier disolvente adecuado para tomar

el extracto, por ejemplo un disolvente acuoso tal como agua, o un disolvente orgánico tal como etanol, acetona o diclorometano. En particular, el procedimiento puede comprender la etapa adicional de tomar extractos en agua o extractos en etanol de las pepitas de níspola molidas.

El procedimiento puede comprender adicionalmente la etapa de eliminar todos o sustancialmente todos los compuestos volátiles del extracto de pepitas molidas. En una realización particular tal, la etapa de proporcionar pepitas de níspola molidas comprende las subetapas de proporcionar pepitas de níspola y luego moler las pepitas.

La invención se describirá ahora adicionalmente, sólo para fines de ilustración, en los siguientes ejemplos.

Ejemplos

Se evaluaron extractos en agua de pepitas de níspola Moraira (variedades Algerie o Cardona) en varios experimentos. La disolución madre usada en cada caso se preparó mediante 5 g de pepitas molidas (peso fresco) que se habían extraído en Soxflo^{MR} con 50 ml de agua destilada.

Ejemplo 1

Experimentos con nematodos juveniles de la raíz

Los extractos en agua se probaron frente a nematodos parásitos de plantas, *Meloidogyne spp*. Este nematodo de la raíz es una plaga muy importante de las cosechas.

Los nematodos juveniles de la raíz se expusieron a diferentes concentraciones de la disolución madre.

Procedimiento

Se prepararon dos disoluciones madre como anteriormente. Una se preparó y se guardó en la nevera durante un mes (reserva A) y la otra se produjo y se usó inmediatamente (reserva B). Entonces, los nematodos se trataron con concentraciones del 90, 50 y 10% de estas disoluciones madre (por ejemplo, para una concentración del 90% la relación de disolución madre:agua fue 9:1, v/v). Los controles equivalentes se dejaron en agua.

Después del tratamiento, los nematodos se colocaron en agua para observar cualquier recuperación.

Resultados

El producto inactivó inmediatamente los nematodos.

Nematodos de la raíz (usando reserva B)				
Concentración	% de inactivación después de la aplicación inicial			Inactivación media (%)
	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3	
Disolución al 90%	100	100	100	100,0
Disolución al 50%	100	100	100	100,0
Disolución al 10%	100	100	99,5	99,8
Control al 90%	0	0	0	0,00
Control al 50%	0	0	0	0,00
Control al 10%	0	0	0	0,00

Nematodos de la raíz (usando reserva A)				
Concentración	% de inactivación después de la aplicación inicial			Inactivación media (%)
	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3	
Disolución al 90%	100	100	100	100,0
Disolución al 50%	100	100	100	100,0
Disolución al 10%	99	100	100	99,5
Control al 90%	0	0	0	0,00
Control al 50%	0	0	0	0,00
Control al 10%	0	0	0	0,00

Cuando los nematodos se devolvieron a agua fresca y se observaron durante 22 horas, solamente se recuperaron aquellos que habían sido inactivados por la disolución al 10%.

Conclusión

Las disoluciones destruyeron nematodos de la raíz a concentración del 50% y 90%, pero al 10% la inactivación fue reversible.

Ejemplo 2

Otros experimentos con nematodos juveniles de la raíz

Procedimiento

Se repitió el ejemplo 1, pero usando disoluciones al 40, 30 y 20%.

Resultados

Se obtuvieron los mismos resultados que en el ejemplo 1. No se produjo recuperación cuando los nematodos se volvieron a colocar en agua.

Conclusión

La concentración de la disolución a la que hay inactivación sin recuperación está entre el 10 y el 20%.

En otros estudios de repetición, el periodo de observación de la recuperación se alargó hasta 8 días (en lugar de 22 horas como anteriormente). No se registró recuperación significativa con las disoluciones al 40, 30 y 20%.

Ejemplo 3

La eficacia del producto en la inactivación de nematodos de la raíz después del almacenamiento

Procedimiento

Se probaron dos lotes diferentes de disolución madre preparados como anteriormente para comparar si se había producido una pérdida de eficacia con el tiempo. La reserva C se almacenó en la nevera a 5ºC durante un mes después de la preparación; la reserva D se preparó nuevamente a partir de pepitas molidas que se habían almacenado en el congelador antes de uso. Se comparó el tiempo que necesitaron los nematodos de la raíz para inactivarse por el producto para los dos lotes. Se evaluaron dos concentraciones, 90% y 50%, y un control en agua.

Resultado

Las concentraciones de tanto la reserva C como la reserva D produjeron instantáneamente parálisis de los nematodos de la raíz.

Conclusión

La eficacia no se perdió durante el almacenamiento del producto a 5ºC.

Ejemplo 4

El papel de los compuestos volátiles en las pepitas de Moraira

Se llevaron a cabo experimentos para determinar si los compuestos volátiles en las pepitas son los principios que destruyen los nematodos.

Procedimiento

Los experimentos se realizaron en las condiciones que se describe anteriormente, pero en un tratamiento se eliminaron las tapas de los recipientes (para permitir que escapen los compuestos volátiles). Las dosificaciones fueron el 50, 40, 30 y 20% de la disolución madre anterior.

Resultados

Los nematodos se observaron durante 3 días. En ambos tratamientos (con o sin tapa) y a todas las concentraciones, los nematodos dejaron de moverse [indicado por (X)]. Los controles permanecieron activos (no se muestran los datos)

Experimento con tapa															
Día	1	2	3	Día	1	2	3	Día	1	2	3	Día	1	2	3
50%	X	X	X	40%	X	X	X	30%	X	X	X	20%	X	X	X

Experimento sin tapa															
Día	1	2	3	Día	1	2	3	Día	1	2	3	Día	1	2	3
50%	X	X	X	40%	X	X	X	30%	X	X	X	20%	X	X	X

Conclusión

Los resultados sugieren que los principios activos no son todos los compuestos volátiles.

Entonces, el trabajo se repitió usando disoluciones de las que se habían eliminado los compuestos volátiles. Se mostraron los mismos resultados, que sugieren que hay compuestos no volátiles en el extracto en agua que destruirán los nematodos de la raíz.

Ejemplo 5

La actividad del extracto en agua frente a nematodos parásitos de no plantas

Se llevaron a cabo experimentos para determinar si los extractos en agua son activos en todos los tipos de nematodos, o si muestran alguna selectividad frente a diferentes tipos de nematodos.

Procedimiento

I. Los nematodos que se alimentan de bacterias son habitantes de la tierra común. Algunos de estos nematodos del género *Steinernema* se expusieron a una disolución al 50% de la disolución madre.

II. Una población mixta recogida de un campo de todos los grupos tróficos de nematodos (que se alimentan de hongos, que se alimentan de bacterias, predadores y parásitos de plantas) se expuso a una disolución al 50% de la disolución madre.

Resultados

I. Los nematodos *Steinernema* no se inactivaron.

II. De la población mixta se inactivaron todos los parásitos de plantas. Algunos de los parásitos de no plantas estuvieron todavía activos, esto varió probablemente entre grupos tróficos.

Conclusión

Los nematodos con diferentes comportamientos de alimentación se afectan de diferente manera por el producto. Se inactivaron todos los nematodos parásitos de plantas.

Ejemplo 6

Actividad frente a larvas de la polilla de la cera Galleria mellonella

La polilla de la cera *Galleria mellonella* es un insecto de prueba de laboratorio habitual y tales polillas se producen fácilmente en masa en el laboratorio o pueden comprarse de un proveedor, por ejemplo Live Foods Direct.

Procedimientos

En varios estudios, las larvas (o larvas de diferentes estadios o sólo larvas de primer estadio) se expusieron al producto mediante aplicación directa. Las observaciones continuaron durante 36 días.

Resultados

El producto no mostró actividad cuando se aplicó a las larvas. El desarrollo a adulto progresó, aunque en algunas pruebas preliminares el extracto en agua pareció detener el desarrollo. El experimento no mostró efecto cuando se repitió con larvas de primer estadio.

Ejemplo 7

Actividad frente a algunos insectos beneficiosos

La avispa *Encarsia formosa*, parásita en moscas blancas, el ácaro predador *Phytoseiulus persimilis* que se alimenta de arañuelas y ninfas y adultos del depredador del trip *Amblyseius cucumeris* (todos comprados de una compañía de control biológico) se expusieron a la disolución madre.

Resultados

No hubo mortalidad.

Ejemplo 8

Actividad frente a un hongo patógeno

Procedimiento

La disolución madre se probó sin diluir frente a dos cepas del hongo que infecta la raíz *Pythium aphanideratum*.

Se colocaron tapones de hongo en pleno crecimiento sobre agua-agar en placas Petri; se colocaron gotas de 25 y 50 microlitros del producto en diferentes posiciones alrededor del hongo. El crecimiento del hongo se monitorizó durante 48 h a 25ºC. Se usaron gotas de agua estéril como controles.

Resultado

No se inhibió el crecimiento del hongo.

Ejemplo 9

Prueba de actividad de pepitas de níspolas en una cortina de agua

Procedimiento

Se pipetearon 100 microlitros que contenían nematodos en 2,5 cm de placas Petri. Los nematodos usados fueron principalmente nematodos de la raíz (*Meloidogyne sp*), pero también se hicieron algunas observaciones iniciales en algunas *Pratylenchus sp*. y especies de vida independiente (parásitos de no plantas).

Se añadieron 900 microlitros de extracto de níspola, o 500 microlitros de extracto de níspola más 400 microlitros de agua, a los nematodos para dar concentraciones del 90 o el 50% del extracto de níspola original. Por tanto, el volumen total añadido fue 1 ml. Sin embargo, también se llevaron a cabo experimentos comparables usando disolución de amigdalina (disoluciones preparadas de (a) 70 mg disueltos en 50 ml de agua y (b) 400 mg disueltos en 50 ml de agua).

Los controles fueron nematodos de la misma fuente colocados en agua de grupo.

Tras la aplicación de la disolución de níspola o amigdalina, las observaciones se hicieron después de 10 minutos, al día siguiente y después de 5 días.

Resultados

10 minutos después de la aplicación:

- No se observa movimiento de nematodos parásitos de plantas a ninguna concentración de pepitas de níspolas; pero los nematodos de vida independiente permanecieron activos.
- Amigdalina: todos los nematodos están todavía activos a ambas concentraciones después de 10 minutos.

Día siguiente:

- No se observa movimiento de nematodos parásitos de plantas a ninguna concentración de pepitas de níspolas.
- Estuvieron activos los nematodos en ambos tratamientos de amigdalina.

5 días después:

Mismos resultados: no hay movimiento en los extractos de pepitas de níspola; pero los nematodos todavía están activos en ambos tratamientos de amigdalina.

Conclusiones

Las pepitas de níspola en la cortina de agua producen la destrucción de nematodos parásitos de plantas, pero no se perjudican los nematodos beneficiosos de vida independiente.

Sin embargo, la propia amigdalina no es activa por sí misma.

Ejemplo 10

Experimentos en maceta con nematodos y plantas en invernadero

Procedimiento

Las pepitas molidas se mezclaron perfectamente en compost basado en tierra vegetal John Innes número 2 (33 g). Las dosis aplicadas fueron 0,33, 0,83, 1,66 g por maceta y un control sin tratar.

Se plantaron tomateras de cuatro semanas cv Tiny Tim en la tierra modificada y luego se inocularon aproximadamente 700 nematodos juveniles de la raíz. Las plantas se dejaron crecer en un invernadero climatizado a 20ºC (+/- 5ºC). Después de 48 días, las plantas se sacaron de las macetas; se tomaron los nuevos pesos de los sistemas de follaje y radicular; se registraron los números de masas de huevos de nematodos de la raíz por sistema radicular.

Resultados

Nivel de tratamiento		**Peso de la raíz**	**Peso del brote**	**Índice de agallamiento**	**Masas totales de huevos**	**Masas de huevos/g de raíz**
Control	1	1,84	3,45	4	156	84,78
	2	2,12	2,58	4	178	83,96
	3	1,80	2,51	4	161	89,44
	4	1,47	2,33	4	197	134,01
	Media	**1,81**	**2,72**	**4,0**	**173**	**98,05**
0,33 g	1	2,51	2,57	3	200	79,68
	2	2,07	3,08	4	198	95,65
	3	3,04	2,01	3	89	29,25
	4	2,76	2,86	4	118	42,75
	Media	**2,60**	**2,63**	**3,5**	**151**	**61,83**
0,83 g	1	1,28	2,09	3	104	81,25
	2	2,16	2,22	4	112	51,85
	3	1,74	2,39	4	68	39,08
	4	1,77	2,48	4	140	79,09
	Media	**1,74**	**2,30**	**3,8**	**106**	**62,82**
1,66 g	1	0,81	2,14	2	38	46,91
	2	1,43	1,93	3	30	20,98
	3	1,75	2,75	2	28	16,00
	4	1,72	2,48	2	98	56,98
	Media	**1,43**	**2,33**	**2,3**	**49**	**35,22**

Conclusiones

Se produjeron masas de huevos significativamente menores en las plantas tratadas con la dosis más alta. Esto confirmaría que hay compuestos nematicidas en las semillas de níspola.

El producto también parece algo fitotóxico y esto se reflejó en menores pesos de la raíz y en los brotes ligeramente atrofiados.

Ejemplo 11

Efecto de pepitas molidas en nematodos en tierra

Procedimiento

Se trataron 30 cm de compost basado en John Innes secado al aire con 0,11, 0,28 y 0,55 g de pepitas molidas en recipientes de plástico. Entonces, cada uno se inoculó con 600 nematodos de la raíz contenidos en 1 ml agua y se añadieron otros 7 ml de agua para proporcionar la humedad adecuada. Después de 48 h, los nematodos se extrajeron de la tierra usando la técnica de incubación convencional durante 24 h. Los tratamientos tuvieron cuatro repeticiones.

Resultados

La figura 1 es un gráfico que muestra los resultados para los diferentes niveles de tratamiento.

Conclusiones

Todos los tratamientos de níspola tuvieron un efecto significativo en la recuperación de nematodos de la tierra, que indica que el polvo de pepitas había inactivado los nematodos durante el periodo de 48 h.

Ejemplo 12

Inmersión de tomateras en extracto de níspola acuoso

Procedimiento

Se sumergieron tomateras de dos semanas durante 1 h en extractos de níspola del 25, 50 y 75% del material de reserva original. Entonces, las plantas tratadas se plantaron en tierra (compost basado en tierra vegetal John Innes número 2) y se inocularon con 375 nematodos de la raíz. Entonces, las plantas habían crecido durante 1 mes en el invernadero cuando se evaluó el desarrollo de nematodos.

Resultado

La figura 2 es un gráfico que muestra los resultados para los diferentes niveles de tratamiento.

Conclusiones

El efecto de sumergir los sistemas radiculares del tomate en todas las concentraciones del extracto evitó la invasión por nematodos de la raíz. Esto sugiere que los efectos tóxicos del extracto fueron suficientemente persistentes para evitar la invasión de nematodos.

REIVINDICACIONES

1. El uso de pepitas de níspola para destruir, inactivar o repeler nematodos.

2. Uso según la reivindicación 1, en el que el uso es como un nematicida.

3. Uso según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el uso es contra nematodos parásitos de plantas.

4. Uso según la reivindicación 3, en el que el uso es como un nematicida selectivo para nematodos parásitos de plantas.

5. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el uso es como un tratamiento selectivo para nematodos en hongos.

6. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que las pepitas de níspola se usan en forma molida, cortada en trozos pequeños, liofilizada o secada por pulverización o en forma de un extracto.

7. Uso según la reivindicación 6, en el que las pepitas se usan en forma de un extracto en agua.

8. Uso según la reivindicación 6, en el que las pepitas se usan en forma de un extracto en un disolvente orgánico.

9. Uso según la reivindicación 8, en el que el disolvente es etanol.

10. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que se usan todos los componentes solubles de las pepitas de níspola.

11. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que se usan todos los componentes solubles en agua de las pepitas de níspola.

12. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que se usan todos los componentes solubles en disolventes orgánicos de las pepitas de níspola.

13. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que se usan todos los componentes solubles en etanol de las pepitas de níspola.

14. Uso según la reivindicación 6, en el que las pepitas de níspola están en forma molida.

15. Uso según la reivindicación 14, en el que las pepitas se han molido de manera que atraviesan un tamiz de 5 mm, pero de forma que el 50% o más de las pepitas molidas no atravesaría un tamiz de 0,1 mm.

16. Un procedimiento para destruir, inactivar o repeler nematodos, procedimiento que comprende proporcionar pepitas de níspola y aplicar las pepitas de níspola a los nematodos o a un área en la que probablemente vivan los nematodos o a un área en la que se espera se muevan los nematodos.

17. El procedimiento de la reivindicación 16, en el que el procedimiento comprende proporcionar las pepitas de níspola en forma molida, cortada en trozos pequeños, liofilizada o secada por pulverización o en forma de un extracto.

18. El procedimiento de la reivindicación 17, en el que el procedimiento comprende las pepitas en forma de un extracto en agua.

19. El procedimiento de la reivindicación 17, en el que el procedimiento comprende las pepitas en forma de un extracto en un disolvente orgánico.

20. El procedimiento según la reivindicación 19, en el que el disolvente es etanol.

21. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 20, en el que se proporcionan todos los componentes solubles de las pepitas de níspola.

22. El procedimiento de la reivindicación 17, en el que las pepitas de níspola se proporcionan en forma molida.

23. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 22, en el que los nematodos son nematodos parásitos de plantas.

24. El procedimiento de la reivindicación 23, en el que los nematodos son nematodos de la raíz.

25. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 24, en el que el procedimiento comprende aplicar pepitas de níspola a un medio de crecimiento en un área en la que se cree que viven los nematodos o a un medio de crecimiento en un área en la que se espera se muevan los nematodos.

26. El procedimiento de la reivindicación 25, en el que las pepitas de níspola se aplican a o se mezclan con un medio de crecimiento que va a tener plantas plantadas en él o se aplica a o se mezcla con un medio de crecimiento que tiene plantas plantadas en él.

27. Un nematicida que comprende pepitas de níspola y un disolvente, soporte, excipiente o diluyente pesticidamente aceptable.

28. El nematicida de la reivindicación 27, que comprende todos los componentes solubles de pepitas de níspola.

29. El nematicida de la reivindicación 27, que comprende todos los componentes solubles en agua de pepitas de níspola.

30. El nematicida de la reivindicación 27, que comprende todos los componentes solubles en etanol de pepitas de níspola.

31. El nematicida de una cualquiera de las reivindicaciones 27 a 30, que comprende 10 g/l de pepitas de níspola o más.

32. El nematicida de una cualquiera de las reivindicaciones 27 a 31, en el que el nematicida comprende pepitas de níspola en forma molida, cortada en trozos pequeños, liofilizada o secada por pulverización o en forma de un extracto.

33. Un procedimiento para producir un nematicida, procedimiento que comprende proporcionar pepitas de níspola molidas, cortadas en trozos pequeños, liofilizadas o secadas por pulverización.

34. El procedimiento de la reivindicación 33, que comprende proporcionar pepitas de níspola molidas.

35. El procedimiento de la reivindicación 34, que comprende además tomar extractos de las pepitas de níspola molidas.

36. El procedimiento de la reivindicación 35, en el que el extracto es en agua.

37. El procedimiento de la reivindicación 35, en el que el extracto es en etanol.

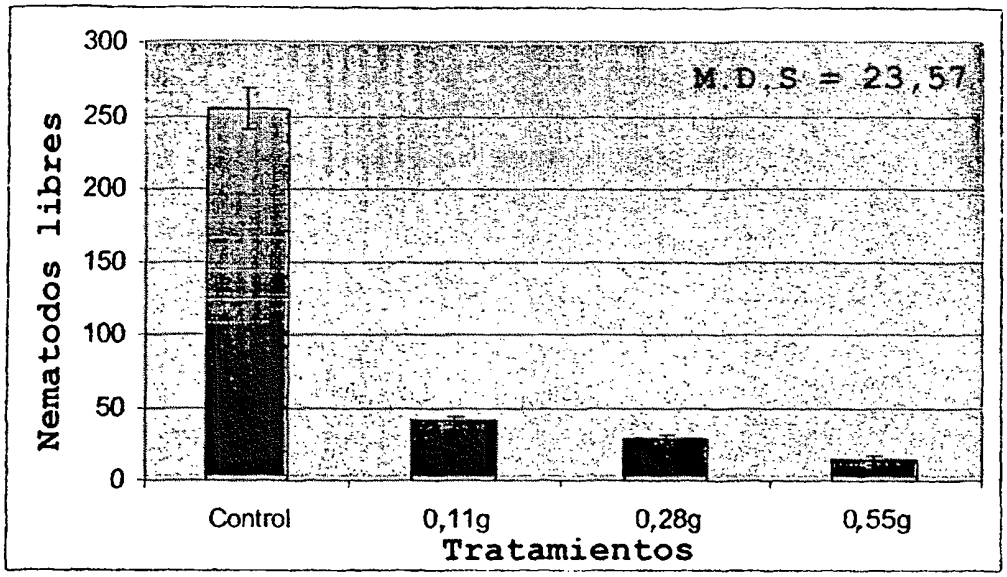

M.D.S = 23,57
Nematodos libres
300
250
200
150
100
50
0
Control
0,11g
0,28g
0,55g
Tratamientos

Fig 1

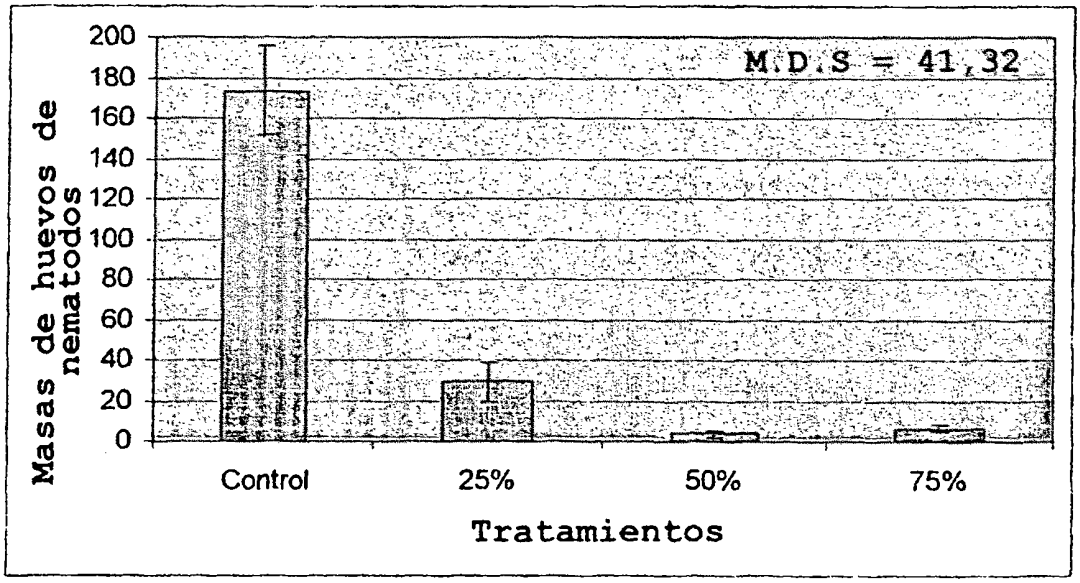

M.D.S = 41,32
Masas de huevos de nematodos
200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
Control
25%
50%
75%
Tratamientos

Fig. 2