

COMPOSICIÓN NEMATICIDA PARA EL CONTROL DE NEMÁTODOS PARÁSITOS DE LAS PLANTAS

Descripción

La presente invención se refiere a una composición nematicida para el control de nemátodos parásitos de las plantas que comprende hidrolizado de proteína vegetal. La presente invención se refiere además a un método para el control de nemátodos parásitos en el suelo de una planta mediante la aplicación de la composición nematicida y su uso para el control de nemátodos parásitos en el suelo de una planta.

Los nemátodos formadores de nudos o agallas (agalladores) son nemátodos parásitos de las plantas parecidos a lombrices, que viven en el suelo y tienen un tamaño microscópico, y pertenecen al género *Meloidogyne*. Son parásitos vegetales obligados de las raíces de un amplio espectro de especies de plantas económicamente importantes con distribución mundial, incluidos cultivos como tomate, café, soja, yuca, frijoles, cereales, tabaco y árboles frutales. El género incluye más de 50 especies, de las cuales varias son responsables de la mayoría de las plagas en todo el mundo: *M. javanica*, *M. incognita*, *M. arenaria*, *M. hapla*, *M. chitwoodi*, *M. fallax* y *M. naasi*.

Los nemátodos agalladores son gusanos activos similares a filamentos de unos 0,5 mm de largo, que penetran en las raíces y causan daños considerables. Los nemátodos agalladores pueden causar agallas o hinchazones típicas en las raíces de la planta, y las raíces muy agalladas pueden pudrirse, dejando un sistema radicular deficiente con unas cuantas agallas grandes. Esto afecta en gran medida la absorción de agua y nutrientes de la planta, y da como resultado un crecimiento deficiente y una disminución de la calidad y el rendimiento del cultivo. También puede reducir la resistencia a otros factores de estrés como la sequía y las enfermedades, y puede acabar ocasionando la muerte de la planta y, por tanto, una pérdida sustancial de la cosecha y del rendimiento.

El ciclo de vida de los nemátodos agalladores comienza en forma de huevos que se desarrollan rápidamente en nemátodos J1 (juvenil de primera etapa). La etapa J1 reside completamente dentro de la cápsula de huevos, en donde muda a un nemátodo J2 (juvenil de segunda etapa). El nemátodo agallador J2 nace de los huevos y se mueve a través del suelo e invade las raíces de las plantas cerca de la punta de la raíz. El J2 móvil es la única etapa presente en el suelo que puede infectar las raíces de las plantas. Por lo tanto, la

etapa J2 es un objetivo importante para los tratamientos nematicidas actuales. Los nemátodos agalladores J2 migran en el suelo en busca de puntas de raíces en crecimiento, ingresan a las raíces intercelularmente y se vuelven sedentarios por el resto de su vida, estableciendo un sitio de alimentación a su alrededor conocido como “células gigantes”. Una vez que se inician las células gigantes, estos nemátodos pasan por dos etapas juveniles más (J3 y J4) hasta la etapa final como hembras adultas globosas o (raramente) como machos adultos vermiformes. Las hembras jóvenes comienzan a alimentarse y permanecen dentro de las raíces por el resto de su vida. Como resultado de la alimentación de los nemátodos, se pueden formar grandes agallas o “nudos” en todo el sistema radicular, lo que limita la capacidad de la planta infectada para absorber y transportar agua y nutrientes.

Las hembras maduras ponen cientos de huevos en la superficie de la raíz, que eclosionan para continuar el ciclo de vida. Las condiciones de humedad del suelo que son óptimas para el crecimiento de las plantas también son ideales para el desarrollo de los nemátodos agalladores. Una sola hembra puede producir de 500 a más de 1000 huevos. Ponen sus huevos en masas gelatinosas que los mantienen unidos, lo que los protege contra los extremos ambientales y la depredación. Las masas de huevos generalmente se encuentran en la superficie de las raíces agalladas. La duración del ciclo de vida o generación de un nemátodo agallador varía entre especies, pero puede ser tan corta como de dos a seis semanas. Los nemátodos en regiones más frías suelen tener ciclos de vida más largos de hasta 10 a 15 semanas en invierno. Entender el ciclo de vida de los nemátodos agalladores es importante porque ciertas etapas de vida pueden ser más fáciles de abordar debido a su presencia en el suelo, en tanto que otras etapas de vida solo se pueden encontrar dentro de las raíces de las plantas. Es posible que los productos nematicidas solo se dirijan a etapas específicas del ciclo de vida.

Las opciones de los agricultores para el control de nemátodos actualmente son muy limitadas. El control de las infestaciones por nemátodos en la agricultura se puede lograr (parcialmente) mediante la mejora de las medidas sanitarias, la rotación extensiva de cultivos con el uso de variedades de plantas más tolerantes o resistentes, o el tratamiento del suelo con nematicidas. Sin embargo, los nemátodos agalladores se multiplican en muchas plantas hospedantes y pueden completar varias generaciones por año. Esto hace que sea muy difícil ampliar el plan de rotación de cultivos como medida de control. Además, la rotación de cultivos no eliminará las infestaciones porque los nemátodos agalladores

pueden permanecer en el suelo en forma de huevos durante al menos un año entre cultivos hospedantes y la mayoría de las especies pueden alimentarse de una amplia gama de plantas y malezas. La resistencia a los nemátodos en variedades de plantas previamente resistentes a menudo se rompe con el tiempo y pueden acumularse poblaciones de nemátodos virulentos que no se ven obstaculizadas por la resistencia de las plantas.

El tratamiento químico, como el uso de nematicidas (tratamiento nematicida del suelo), tampoco es preferible debido a las restricciones ambientales cada vez más estrictas con respecto al uso de productos químicos en el control de enfermedades. La mayoría de los productos con actividad contra los nemátodos fitoparásitos autorizados en Europa (sustancias activas nematicidas aprobadas de conformidad con el Reglamento (CE) n.º 1107/2009, como se enumeran en el Reglamento (UE) n.º 540/2011) son productos químicos, incluidos fumigantes como dazomet, metam-Na o -K, y no fumigantes como fostiazato y oxamil. Además de los (no) fumigantes, también se enumeran algunos productos basados en microorganismos y extractos de plantas, como los microorganismos *Bacillus firmus*, *Lysobacter enzymogenes* y *Purpureocillium lilacinum*, así como el extracto de ajo y los aceites terpénicos eugenol y timol. Sin embargo, la mayoría de los productos químicos tiene un uso restringido debido a restricciones ambientales, daños a largo plazo al medio ambiente, a la salud y efectos tóxicos para los mamíferos. Los fumigantes, que son compuestos volátiles que se utilizan contra organismos de amplio espectro presentes en el suelo, también son extremadamente tóxicos y solo se pueden aplicar antes de la siembra o el trasplante. Los productos a base de microorganismos suelen tener una eficacia escasa. Además, sus efectos suelen depender en gran medida de las condiciones ambientales en las que se aplica el producto. Se recomienda utilizar algunos de los extractos de plantas en combinación con nematicidas químicos o requieren una dosis muy alta para ser eficaces.

La Directiva Europea 1107/2009 relativa al uso sostenible de plaguicidas establece que el uso de fumigantes y nematicidas de base química debe reducirse con restricciones o prohibiciones debido a su toxicidad para los seres humanos y los animales y a su impacto en el medio ambiente. Al mismo tiempo, la directiva establece que las nuevas autorizaciones deben ser más específicas, menos persistentes y peligrosas. Por ejemplo, la Estrategia de la Granja a la Mesa de la Comisión Europea revela que el uso de plaguicidas en la agricultura contribuye a la contaminación del suelo, el agua y el aire. La Comisión tomará medidas para reducir en 50% el uso y el riesgo de plaguicidas químicos

para 2030 y para reducir en 50% el uso de plaguicidas más peligrosos para 2030. También se indicó que la agricultura orgánica es una práctica respetuosa con el medio ambiente que necesita un mayor desarrollo. La Comisión impulsará el desarrollo de la superficie agrícola ecológica de la UE con el objetivo de alcanzar el 25% del total de tierras agrícolas bajo agricultura ecológica en 2030. Además, con la creciente preocupación de los consumidores por el uso de productos fitosanitarios químicos, cada vez más productores recurren a la producción ecológica o de residuo cero, situación en la que los productos nematicidas tradicionales basados en productos químicos no se pueden utilizar o están muy restringidos.

Considerando lo anterior, existe una necesidad en la técnica de un control biológico mejorado y duradero de los nemátodos parásitos, más específicamente de los nemátodos formadores de nudos de la raíz (agalladores). Además, existe una necesidad en la técnica de un control eficaz y eficiente de los nemátodos parásitos que sea de origen biológico no químico, que proporcione una alternativa sostenible que tenga una toxicidad baja o nula para los mamíferos, un impacto reducido en el medio ambiente y carezca de efectos indeseados para otros organismos.

La presente invención tiene por objeto, entre otros, abordar la necesidad mencionada anteriormente en la técnica. El objeto de la presente invención, entre otros, se cumple mediante la presente invención como se describe en las reivindicaciones adjuntas.

En concreto, la presente invención cumple el objeto anterior, entre otros objetos, de acuerdo con un primer aspecto, mediante una composición nematicida para el control de nemátodos que se caracteriza porque la composición está compuesta por un hidrolizado proteínico enzimático de origen vegetal. La actividad nematicida se refiere a la capacidad de matar y/o paralizar nemátodos en cualquiera de sus etapas o de impedir que un nemátodo se desarrolle o crezca, y puede incluir actividad nematotóxica o nematostática. La composición también puede tener un efecto indirecto induciendo la respuesta de defensa de la planta, lo que da como resultado el retraso del ciclo de vida del nemátodo fitoparásito dentro del hospedador.

Los resultados muestran que la composición de la presente invención que comprende el hidrolizado enzimático de proteína vegetal fue capaz de reducir en gran medida la población de nemátodos J2 en el suelo en comparación con los nemátodos en el suelo que no recibieron la composición. Se demostró que el efecto del hidrolizado enzimático de proteína vegetal de la presente invención es comparable al de los

nematicidas químicos conocidos en el mercado. El hidrolizado enzimático de proteína vegetal tiene un impacto importante en la supervivencia de los J2 en el suelo; impacta fuertemente en la supervivencia de los J2 una vez que los huevos han eclosionado. La composición que comprende el hidrolizado enzimático de proteína vegetal demostró ser muy eficaz en la reducción de la población de nemátodos en plantas de tomate durante una y dos generaciones y en la prevención de la formación de nudos en las raíces y agallas. Además, y en respaldo de la composición que tiene un efecto indirecto al inducir la resistencia a los nemátodos en las plantas, se realizaron experimentos sobre la penetración y el desarrollo de nemátodos formadores de nudos en las raíces en plantas de tomate tratadas y no tratadas.

Las plantas tratadas presentaron una menor tasa de penetración de J2 y un retraso en el desarrollo de nemátodos dentro de las raíces en comparación con las plantas no tratadas.

La composición de la presente invención se basa preferiblemente en la hidrólisis enzimática de las proteínas del gluten. El hidrolizado de gluten es fácil de aplicar al suelo de una planta y es soluble en agua (a diferencia del gluten sólido). La composición de la invención se puede formular como un líquido; como un sólido; o posiblemente junto con adyuvantes, surfactantes, coformulantes u otros compuestos nematicidas. Por ejemplo, los surfactantes pueden mejorar la actividad de la composición porque darán como resultado una mejor difusión del producto en el suelo. Los resultados muestran que el hidrolizado de gluten obtenido por vía enzimática tiene un efecto sorprendentemente más pronunciado sobre la supervivencia de los nemátodos en etapa J2 en comparación con el hidrolizado de gluten ácido. El hidrolizado de gluten enzimático resultante contiene una mezcla principalmente de péptidos y aminoácidos. A diferencia de un hidrolizado enzimático, en un hidrolizado ácido la mayoría de los enlaces peptídicos restantes se destruyen, dejando principalmente aminoácidos libres en la mezcla. Los experimentos han demostrado que el efecto nematicida del hidrolizado ácido se reduce en comparación con el hidrolizado enzimático de la presente invención.

De acuerdo con una modalidad preferida, la presente invención se refiere a la composición nematicida, que se caracteriza porque el hidrolizado proteínico enzimático de origen vegetal se deriva de una fuente vegetal que comprende entre 20 y 99% en peso, preferiblemente entre 50 y 95% en peso, más preferiblemente entre 75 y 90% en peso de proteína vegetal. La proteína de origen vegetal se refiere a la proteína que se deriva de

una fuente vegetal. La fuente vegetal debe tener un alto contenido proteínico para maximizar la cantidad de péptidos y aminoácidos en el hidrolizado. Con menos de 20% de proteína en la fuente vegetal, la cantidad de péptidos será demasiado baja para que el hidrolizado tenga un buen efecto nematocida. También sería preciso aplicar técnicas de concentración muy costosas para aumentar el contenido proteínico, lo que no sería económicamente viable.

De acuerdo con una modalidad preferida, la presente invención se refiere a la composición nematocida, que se caracteriza porque el hidrolizado proteínico vegetal enzimático está compuesto por una fracción peptídica que comprende (poli)péptidos y/o aminoácidos que tienen un tamaño de entre 0,075 y 30 kDa, 0,078 y 25 kDa, 0,08 y 20 kDa, 0,09 y 15 kDa, preferiblemente 0,1 y 10 kDa, 0,15 y 8 kDa, más preferiblemente 0,20 y 5 kDa, incluso más preferiblemente 0,25 y 5 kDa, lo más preferiblemente 0,3 y 3 kDa.

Las fracciones peptídicas se basan en exclusión por tamaño. Los resultados han demostrado que la fracción peptídica que contiene las moléculas más pequeñas, incluidos los péptidos de <30 kDa, es la que proporciona el efecto nematocida sobre los nemátodos similar a la composición de hidrolizado de gluten completa, no fraccionada, a la dilución más baja probada. Esta fracción de gluten proporciona una inducción de la defensa inmunitaria de la planta o efectos directos sobre los nemátodos que resultan en la reducción de la incidencia de agallas en la planta, como se observa en plantas de tomate infectadas por *M. javanica*.

La composición para el control de nemátodos fitoparásitos de acuerdo con la presente invención puede comprender fracciones purificadas simples o múltiples del hidrolizado enzimático como, por ejemplo, el hidrolizado proteínico vegetal enzimático que comprende las fracciones peptídicas de 0,01 a 0,5 kDa y de 5 a 10 kDa. Preferiblemente, al menos la fracción peptídica entre 0,3 y 5 kDa está incluida en la composición nematocida de la presente invención.

De acuerdo con otra modalidad preferida, la presente invención se refiere a la composición nematocida, que se caracteriza porque el hidrolizado proteínico enzimático de origen vegetal comprende un grado de hidrólisis de entre 1 y 75%, preferiblemente entre 5 y 60%, más preferiblemente entre 10 y 50%, lo más preferiblemente entre 15 y 40%. Se ha observado que un grado de hidrólisis más alto, es decir >75%, lo que indica la presencia de más aminoácidos individuales y menos péptidos, conduce a una disminución de la actividad nematocida de la composición. Se ha observado una actividad nematocida óptima

que se caracteriza porque el hidrolizado proteínico enzimático de origen vegetal comprende un grado de hidrólisis de entre 15 y 30% en peso.

De acuerdo con una modalidad preferida, la presente invención se refiere a la composición nematicida, que se caracteriza porque la proteína de origen vegetal procede de una o más seleccionadas de entre el grupo compuesto por Poaceae, Fabaceae, Brassicaceae, Asteraceae, Euphorbiaceae, algas marinas, Amaranthaceae, Cannabaceae, Arecaceae o proteínas vegetales de subproductos industriales de actividades de cervecería, preferiblemente Poaceae y/o Fabaceae. Junto a las proteínas de origen vegetal, como alternativa se pueden utilizar algas de origen proteínico, muchas de las cuales son conocidas normalmente por su alto contenido de proteína celular.

De acuerdo con otra modalidad preferida, la presente invención se refiere a la composición nematicida, que se caracteriza porque la proteína de origen vegetal es una o más seleccionadas de entre el grupo compuesto por gluten de trigo, gluten de cebada, gluten de centeno y gluten de avena, soja o harina de soja, guar, preferiblemente gluten de trigo.

De acuerdo con otra modalidad preferida, la presente invención se refiere a la composición nematicida, que se caracteriza porque los nemátodos son nemátodos agalladores, nemátodos lesionadores de la raíz, nemátodos quísticos y/o nemátodos migratorios. Se pueden tratar especialmente dos etapas del ciclo de vida de los nemátodos agalladores parásitos en el suelo; los huevos que ponen las hembras en la superficie de la raíz de la planta en la etapa de madurez, y después de la eclosión de los huevos, de los juveniles de la segunda etapa (J2). Los experimentos muestran que los nemátodos J2 todavía pueden eclosionar de sus huevos, pero después del contacto con la composición de la presente invención mueren rápidamente. Por lo tanto, el desarrollo de más huevos y nemátodos se reduce sustancialmente, así como la formación de agallas en las raíces de las plantas como consecuencia de esto.

De acuerdo con una modalidad preferida, la presente invención se refiere a la composición nematicida, que se caracteriza porque los nemátodos son uno o más nemátodos seleccionados de entre el grupo compuesto por *Meloidogyne*, *Heterodera*, *Globodera*, *Pratylenchus*, *Aphelenchoides*, *Xiphinema*, *Radopholus*, *Bursaphelenchus*, *Rotylenchulus*, *Nacobbus*, *Longidorus*, *Ditylenchus*, *Trichodorus*, *Meloidogyne javanica*, *Meloidogyne arenaria*, *Meloidogyne incognita*, *Meloidogyne hapla*, *Pratylenchus penetrans* y *Heterodera schachtii*, preferiblemente *Meloidogyne javanica*. Algunos experimentos han

demostrado que la composición de la presente invención, además de *M. javanica*, también es activa frente a *M. incognita*, *P. penetrans* y *H. schachtii*.

De acuerdo con otra modalidad preferida, la presente invención se refiere a la composición nematicida, que se caracteriza porque la composición tiene actividad nematotóxica y/o nematostática contra nemátodos parásitos, preferiblemente tanto actividad nematotóxica como nematostática. El hidrolizado proteínico enzimático de origen vegetal tiene un fuerte efecto nematicida dependiente de la dosis sobre los nemátodos en el suelo. El efecto nematicida se observa como un efecto de toxicidad que mata a los nemátodos, en combinación con la inmovilización de los nemátodos. La composición también puede tener un efecto indirecto al inducir la respuesta de defensa de la planta, lo que da como resultado el retraso del ciclo de vida del nemátodo parásito de la planta dentro del huésped.

De acuerdo con otra modalidad preferida, la presente invención se refiere a la composición nematicida, que se caracteriza porque la composición se combina con al menos otro compuesto que tiene actividad nematicida, como un nematicida químico o un nematicida biológico. Algunos ejemplos de compuestos nematicidas químicos o biológicos adecuados pueden incluir nematicidas basados en sustancias activas como dazomet, metam potasio, metam sodio, fluopiram, fostiazato, oxamil, abamectina, *Bacillus firmus* I-1582, extracto de ajo, *Purpureocillium lilacinum* cepa 251 y terpenos (timol y geraniol).

La presente invención, de acuerdo con un segundo aspecto, se refiere a un método para el control de nemátodos parásitos en el suelo de una planta mediante la aplicación de una composición nematicida al suelo de una planta. Por ejemplo, la composición puede aplicarse al suelo en una dilución de entre 0,3 y 25 g/l, preferiblemente de 0,6 a 15 g/l, más preferiblemente de 1,25 a 10 g/l, lo más preferiblemente de 2,5 a 5 g/l.

De acuerdo con otra modalidad preferida, la presente invención se refiere al método para el control de nemátodos parásitos, que se caracteriza porque la aplicación se realiza antes y/o durante el ciclo de cultivo de la planta. La composición de la presente invención es preferiblemente de origen vegetal completamente biológico. A diferencia de la composición de la presente invención, los fumigantes, que son compuestos volátiles de amplio espectro utilizados contra organismos presentes en el suelo, también son extremadamente tóxicos, incluso para la propia planta, y se pueden aplicar solo antes de la siembra o el trasplante. La composición de la presente invención que comprende el hidrolizado de proteína vegetal enzimático, por otro lado, es de origen vegetal, no químico

y, por lo tanto, constituye una alternativa mucho más sostenible. Además, también se puede aplicar durante el ciclo de cultivo, lo que no es el caso de los fumigantes.

De acuerdo con otra modalidad preferida, la presente invención se refiere al método para el control de nemátodos parásitos, que se caracteriza porque la composición se aplica al suelo con una frecuencia de aplicación seleccionada de entre el grupo compuesto por una vez al mes, dos veces al mes, cuatro veces al mes, cada dos semanas, una vez a la semana y dos veces a la semana, preferiblemente cada dos semanas. Preferiblemente, la composición de la presente invención se aplica a una dilución de 5 a 10 g/l, cada dos semanas.

De acuerdo con otra modalidad preferida, la presente invención se refiere al método para el control de nemátodos parásitos, que se caracteriza porque después de la aplicación, el nemátodo es controlado durante al menos dos generaciones de nemátodos, preferiblemente al menos tres generaciones de nemátodos, más preferiblemente al menos cuatro generaciones de nemátodos.

De acuerdo con una modalidad preferida, la presente invención se refiere al método para el control de nemátodos parásitos, que se caracteriza porque al menos 50%, preferiblemente al menos 75%, más preferiblemente al menos 90% de los nemátodos son inmovilizados y/o muertos, preferiblemente muertos.

De acuerdo con otra modalidad preferida, la presente invención se refiere al método para el control de nemátodos parásitos, que se caracteriza porque la aplicación de la composición nematicida se realiza mediante riego, empapado del suelo, a través de un sistema de riego por goteo sobre el suelo o aplicación sólida a través de gránulos, recubrimiento y inmersión.

La presente invención, de acuerdo con un tercer aspecto, se refiere al uso de una composición nematicida de la presente invención para el control de nemátodos parásitos en el suelo de una planta.

La presente invención se detallará más detalladamente en los siguientes ejemplos y figuras, en donde:

La **Figura 1** muestra el efecto del hidrolizado enzimático de gluten de la presente invención sobre J2 de *M. javanica*. Después de una semana de incubación con los nemátodos y la composición de la presente invención, se recuperaron y contaron los J2 vivos. El grupo de control no recibió ningún tratamiento nematicida.

La **Figura 2A)** muestra raíces de una planta de tomate del grupo de control

expuesta a J2 *M. javanica* (que no recibió el hidrolizado de gluten enzimático de la presente invención) que tiene un índice de agallas (IG) de 4,35 y presenta síntomas graves de enfermedad como lo demuestran los síntomas de agallas masivos. La **Figura 2B)** muestra raíces de una planta de tomate expuesta a J2 de *M. javanica* y que recibe el hidrolizado de gluten enzimático (10 g/l, por semana) de la presente invención que tiene un índice de agallas de 1,2 y presenta muy pocos síntomas de enfermedad, síntomas de agallas muy reducidos.

La **Figura 3** muestra el efecto del hidrolizado enzimático de gluten de trigo sobre la supervivencia de los nemátodos en comparación con el hidrolizado ácido de gluten de trigo. Además, también se probó el efecto de la fertilización con nitrato (efecto del nitrógeno) sobre la supervivencia de los nemátodos que a menudo se observa en la práctica; se comparó la actividad de los hidrolizados de gluten y el fertilizante de nitrato de amonio a varias concentraciones de nitrógeno (160 mg N/L, 64 mg N/L y 32 mg N/L). Se observa un efecto dependiente de la dosis que se caracteriza porque el hidrolizado de gluten de trigo obtenido enzimáticamente tiene un efecto más pronunciado sobre la supervivencia del nemátodo J2 en comparación con el hidrolizado de gluten de trigo ácido. Esto se observó en todas las concentraciones de N.

La **Figura 4A)** muestra el número de huevos/g (eje vertical) de raíces de plantas de tomate tratadas con el hidrolizado enzimático de gluten de trigo (cada dos semanas) de la presente invención y raíces de plantas de tomate tratadas con el producto comercial Velum®. La dosis de 10 g/l de hidrolizado enzimático de gluten de trigo proporcionó una reducción de 57% y Velum® una reducción de 41%, en comparación con el control no tratado. La **Figura 4B)** muestra la raíz de tomate de control no tratado (izquierda) y la raíz de tomate de una planta tratada con 10 g/l de hidrolizado de gluten de trigo (derecha) cada dos semanas.

Ejemplos

Efecto del hidrolizado de gluten de trigo sobre J2 *M. javanica*

El efecto del hidrolizado enzimático de gluten de trigo sobre los ejemplares juveniles de segunda etapa (J2) de *M. javanica* se determinó en un experimento previo a la siembra. Los experimentos se realizaron utilizando hidrolizado de gluten de trigo a partir de gluten de trigo que comprendía ~ 81% de proteína, seguido de una incubación con enzima proteasa durante 48 h y un paso posterior de desactivación por calentamiento, proporcionando un grado de hidrólisis de entre 15 y 30%. Se introdujo tierra esterilizada en

macetas de 0,5 L y luego se dispusieron en una mesa de invernadero. El suelo se inoculó con siete juveniles de segunda etapa (J2) de *M. javanica* por ml de suelo (3500 J2/maceta). Un día después de la inoculación del nemátodo se aplicó el hidrolizado de gluten de trigo al suelo en dosis de 25 g/l. Luego, las macetas se cubrieron y se mantuvieron en la mesa de invernadero (26°C). Después de una semana, se recuperaron y contaron los J2 vivos. En el grupo de control (que no recibió hidrolizado de gluten de trigo) se contabilizaron 131 (± 29) J2 por cada 100 ml de suelo. En las macetas que recibieron hidrolizado de gluten de trigo se contabilizaron solo 9 (± 8) J2 por cada 100 ml de suelo. El hidrolizado de gluten de trigo logró reducir en gran medida la población de J2 en el suelo en comparación con el grupo de control (ver Figura 1).

Efecto dependiente de la dosis del hidrolizado de gluten de trigo sobre J2 *M. javanica*

En otro experimento previo a la siembra se determinó el efecto de diferentes dosis de hidrolizado de gluten de trigo. Se inocularon macetas de 100 ml llenas de suelo esterilizado con *M. javanica* a razón de dieciocho J2 por ml de suelo (1800 J2/maceta). Un día después de la inoculación del nemátodo se aplicaron diferentes dosis de hidrolizado enzimático de gluten de trigo (10 g/l, 5 g/l, 2,5 g/l y 1,25 g/l). El suelo sin tratar (sin hidrolizado de gluten de trigo) sirvió como control. Luego, las macetas se taparon y se mantuvieron en una mesa de laboratorio (23°C). Después de una semana, se recuperaron y contaron los J2 vivos.

En la Tabla 1 se muestra el efecto de diferentes dosis de hidrolizado de gluten de trigo contra J2 *M. javanica* después de una semana en macetas cubiertas llenas de tierra esterilizada.

Tabla 1.

Tratamiento	J2 vivos por cada 100 ml de suelo
Control	131 $\pm$ 10
10 g/l	8 $\pm$ 5
5 g/l	15 $\pm$ 5
2,5 g/l	35 $\pm$ 8
1,25 g/l	73 $\pm$ 10

Este experimento confirmó que el hidrolizado de gluten de trigo tiene un impacto importante en la supervivencia de los J2 en el suelo, y este efecto depende de la dosis.

Efecto del hidrolizado de gluten de trigo sobre la eclosión de huevos de *M. javanica*

Se realizó un experimento para evaluar el efecto de diferentes dosis (10 g/l, 5 g/l, 2,5 g/l, 1,25 g/l, 0,626 g/l y 0,3125 g/l) del hidrolizado enzimático de gluten de trigo sobre huevos de *M. javanica*. El producto se mezcló con huevos frescos de nemátodos y se mantuvo durante una semana a 25°C en la oscuridad. Se determinó el porcentaje de eclosión de huevos y el porcentaje de mortalidad de los J2 después de la eclosión. La Tabla 2 muestra el efecto del hidrolizado de gluten de trigo sobre la eclosión de huevos de *M. javanica* una semana después de la aplicación del producto y la mortalidad de los J2 eclosionados. El hidrolizado de gluten de trigo no parece inhibir la eclosión de huevos, pero sí impacta fuertemente en la supervivencia de los J2 una vez eclosionados, lo que nuevamente confirma nuestros resultados anteriores.

Tabla 2.

Tratamiento	% de eclosión de huevos	% de mortalidad de J2 después de la eclosión
Control	15	8,6
10 g/l	14,5	100
5 g/l	13,4	100
2,5 g/l	14,9	100
1,25 g/l	12,3	100
0,626 g/l	13,5	65,1
0,3125 g/l	13,2	26

Efectos nematocidas y nematostáticos del hidrolizado de gluten de trigo sobre *M. javanica*

Se evaluó el efecto nematocida (toxicidad sobre J2 *M. javanica*) y nematostático (inmovilidad de J2 *M. javanica*) a diferentes dosis (10 g/l, 5 g/l, 2,5 g/l, 1,25 g/l, 0,626 g/l y 0,3125 g/l) del hidrolizado enzimático de gluten de trigo sobre *M. javanica* J2. Las dosis se mezclaron con los J2 y se mantuvieron juntas durante 4 y 7 días a 25°C en oscuridad. Se determinó el porcentaje de J2 inmovilizados y muertos. La Tabla 3 muestra el efecto nematocida (% de mortalidad de J2) y nematostático (% de inmovilización de J2) del

hidrolizado de gluten de trigo sobre *M. javanica*.

Tabla 3.

Tratamiento	Después de 4 días		Después de 7 días	
	% inmovilización J2	% mortalidad J2	% inmovilización J2	% mortalidad J2
Control	10,3	5,3	4,4	8
10 g/l	100	100	100	100
5 g/l	100	76,5	100	100
2,5 g/l	100	81,8	100	100
1,25 g/l	100	21,1	100	100
0,626 g/l	100	20	100	58,3
0,3125 g/l	84,2	10,8	85,0	4,5

Los resultados confirman el efecto nematicida del hidrolizado de gluten de trigo y cómo el aumento del tiempo de contacto puede conducir a un aumento adicional de la tasa de mortalidad, incluso a concentraciones más bajas.

Efecto del hidrolizado de gluten de trigo en la interacción planta-nemátodo en un invernadero.

Después de determinar el efecto nematicida extenso y repetible del hidrolizado de gluten de trigo sobre J2 de *M. javanica* en el suelo, se realizaron experimentos de invernadero con plantas de tomate. El efecto del hidrolizado de gluten de trigo (10 g/l) se estudió en un experimento de interacción planta-nemátodo en un invernadero. Las plantas de tomate se trasplantaron a macetas de 1L y 3L con tierra esterilizada para determinar el efecto después de completar una y dos generaciones de nemátodos, respectivamente. Las macetas de 1L se inocularon con 1000 J2 de *M. javanica* y las macetas de 3L con 3000 J2 de *M. javanica*. La composición de la presente invención se aplicó al suelo mediante empapado cada semana. La primera aplicación se realizó después de la inoculación del nemátodo. El número de huevos de nemátodo por gramo de raíz y el número de nemátodos J2 por 100 ml de suelo se evaluaron después de una y dos generaciones. La Tabla 4 resume los resultados.

Tabla 4.

Tratamiento	Después de 1 generación		Después de 2 generaciones	
	# Huevos/gramo raíz	# J2/100 ml suelo	# Huevos/gramo raíz	# J2/100 ml suelo
Control	4989 ± 774	586 ± 80	59317 ± 4246	2304 ± 422
10 g/l	42 ± 12	0	4709 ± 1340	16 ± 8

Además, la gravedad de la enfermedad (índice de agallas, puntuación GI) se determinó al final de la segunda generación, de 0 (plantas sanas) a 10 (plantas muertas) como lo describió previamente Zeck, WM et al, 1971, "A rating scheme for field evaluation of root-knot nematode infestations.", Pflanz. Nachricht. Bayer. 24, 141–144. Una puntuación GI superior a 5 se relaciona con síntomas graves de agallas que son inaceptables en la agricultura. Las plantas de control obtuvieron una puntuación de índice de agallas (GI) de 4,35 y las plantas tratadas con la composición de la presente invención obtuvieron una puntuación de índice de agallas de 1,2.

Los resultados muestran la eficacia del hidrolizado de gluten de trigo en la reducción de la población de nemátodos en plantas de tomate en invernadero durante una y dos generaciones. El efecto es duradero, evitando la supervivencia de J2 en el suelo y la formación de agallas.

Efecto del hidrolizado de gluten de trigo sobre otros nemátodos fitoparásitos

Se realizó un experimento para evaluar el efecto de diferentes dosis (5 g/l, 2,5 g/l, 1,25 g/l, 0,626 g/l y 0,3125 g/l) del hidrolizado enzimático de gluten de trigo contra dos especies de nemátodos agalladores *M. javanica* y *M. incognita*, un fitoparásito migratorio *Pratylenchus penetrans* y un nemátodo de quiste *Heterodera schachtii*. El producto se mezcló con nemátodos frescos (juveniles y adultos) y se mantuvo todo junto durante 48 h a 25°C en la oscuridad. Se determinó el porcentaje de mortalidad de los nemátodos. La Tabla 5 muestra el efecto del hidrolizado enzimático de gluten de trigo sobre los cuatro diferentes nemátodos después de la aplicación del producto.

Tabla 5.

Tratamientos	% de mortalidad de los nemátodos			
	<i>Meloidogyne javanica</i>	<i>Meloidogyne incognita</i>	<i>Pratylenchus penetrans</i>	<i>Heterodera schachtii</i>

Control (agua)	2,6	6,53	3,68	5,82
5 g/l	100,00	100,00	95,00	96,64
2,5 g/l	100,00	100,00	91,96	94,02
1,25 g/l	94,44	94,62	85,71	85,34
0,626 g/l	81,52	93,68	81,89	76,40
0,3125 g/l	46,34	25,58	12,39	29,91

El hidrolizado de gluten de trigo tuvo un efecto nematicida sobre todos los nemátodos fitoparásitos evaluados.

Efecto del hidrolizado de gluten de trigo a diferentes frecuencias de aplicación sobre *M. javanica*

El efecto de diferentes dosis (10 g/l y 5 g/l) del hidrolizado de gluten de trigo con diferentes frecuencias de aplicación (una (1w), dos (2w) y tres semanas (3w)) empapando suelo esterilizado en un experimento de invernadero. Las plantas de tomate se inocularon una semana después del trasplante con 1000 J2 de *M. javanica* en macetas de 1L para determinar el efecto después de completar una generación de nemátodos. Los tratamientos comenzaron después de la inoculación de los nemátodos. Se evaluó el número de huevos de nemátodos por gramo de raíz y el número de nemátodos J2 por 100mL de suelo. La Tabla 6 resume los resultados.

Tabla 6.

Tratamiento	# Huevos/gramo raíz	# J2/100 ml suelo
Control	21301 ± 2274	665 ± 198
10 g/l 1 sem.	522 ± 326	1 ± 1
10 g/l 2sem.	959 ± 323	2 ± 1
10 g/l 3 sem.	1797 ± 559	5 ± 2
5 g/l, 1 sem.	4298 ± 1115	12 ± 4
5 g/l, 2 sem.	8059 ± 1869	56 ± 13
5 g/l, 3 sem.	13376 ± 2836	88 ± 27

Los resultados muestran que la reducción de la población de nemátodos por el

hidrolizado de gluten de trigo depende de la dosis y la frecuencia en un invernadero.

Comparación entre hidrolizado enzimático de gluten de trigo y un hidrolizado ácido de gluten de trigo para la supervivencia de los nemátodos en etapa J2

En este experimento se comparó el efecto sobre la supervivencia de J2 del hidrolizado de gluten de trigo obtenido por hidrólisis enzimática con el hidrolizado de gluten de trigo obtenido por hidrólisis ácida. Además, en la práctica se observa a menudo un efecto limitado de la fertilización con nitrato sobre la supervivencia de los nemátodos. Para comprobar este efecto del nitrógeno, incluimos el fertilizante mineral nitrato de amonio. Los hidrolizados de gluten de trigo y el nitrato de amonio se probaron en varias concentraciones de nitrógeno (160 mgN/L, 64 mgN/L y 32 mgN/L). Macetas de 100 ml llenas de suelo esterilizado se inocularon con *M. javanica* a 18 J2 por ml de suelo (1800 J2 por maceta). Un día después de la inoculación del nemátodo se aplicaron los tratamientos. Luego, las macetas se cubrieron y se mantuvieron en una mesa de laboratorio (23°C). Después de una semana, se recuperaron y contaron los J2 vivos. Los resultados se resumen en la Figura 3.

Se observa un efecto dependiente de la dosis que se caracteriza porque el hidrolizado de gluten de trigo obtenido enzimáticamente tiene un efecto más pronunciado sobre la supervivencia del nemátodo J2 en comparación con el hidrolizado de gluten de trigo ácido. Esto se observó en todas las concentraciones de N probadas.

El hidrolizado enzimático de gluten de trigo (de acuerdo con la presente invención) comprende una mezcla principalmente de péptidos y aminoácidos. En el hidrolizado ácido, la mayoría de los enlaces peptídicos restantes se destruyen, dejando principalmente aminoácidos libres en la mezcla. El efecto nematicida del hidrolizado ácido se reduce en comparación con el hidrolizado enzimático de la presente invención. El efecto nematicida del hidrolizado ácido es similar al efecto del nitrato de amonio, lo que indica que el efecto nematicida del hidrolizado enzimático de gluten de trigo se debe (junto con el efecto del nitrógeno) a los péptidos intactos presentes en el hidrolizado, que están ausentes en el hidrolizado ácido.

Efecto de las fracciones hidrolizadas de hidrolizado de gluten de trigo sobre *M. javanica*

A continuación, con el fin de comprender mejor el modo de acción del hidrolizado enzimático de gluten de trigo sobre los nemátodos, y especialmente el papel de la fracción peptídica, el hidrolizado de gluten de trigo se fraccionó mediante filtración por membrana. El efecto de cuatro fracciones de tamaño del hidrolizado de gluten de trigo (fracción R1:

>30kDa, fracción R2: >10kDa, fracción R3: >3kDa, fracción P3: <3kDa) se evaluó en un experimento *in vitro* contra J2 de *M. javanica*. El hidrolizado de gluten de trigo no fraccionado se utilizó como control. Cada fracción se mezcló con J2 y se mantuvo durante 48 horas a 25°C en la oscuridad. Posteriormente, se determinó el porcentaje de J2 muertos. Los resultados se resumen en la Tabla 7 e indican que la fracción P3 (<3 kDa), la fracción que contiene las moléculas más pequeñas, incluidos los péptidos, proporciona el efecto nematicida óptimo sobre los nemátodos similar al control de hidrolizado de gluten de trigo en la dilución más baja (0,3125 g/l).

Tabla 7.

Dilución	% de J2 muerto por fracción				
	>30 kDa	>10 kDa	>3 kDa	<3 kDa	Control
5 g/l	100	100	100	100	100
2,5 g/l	100	100	100	100	100
1,25 g/l	100	100	100	100	100
0,626 g/l	61,3	60,1	100	100	100
0,3125 g/l	1,1	0,3	21,8	88,7	94,7

En un segundo experimento (Tabla 8), el tamaño de fracción entre 5 y 0,3 kDa tuvo el mejor efecto nematicida entre las otras fracciones de péptidos probadas.

Tabla 8.

Dilución	% de J2 muertos por fracción				
	>25 kDa	>5kDa	>0,3 kDa	<0,3 kDa	Control
5 g/l	98	98	99		98
2,5 g/l	99	98	98	98	96
1,25 g/l	95	97	99	98	89
0,626 g/l	89	97	97	23	92

0,3125 g/l	29	41	97	4	87
------------	----	----	----	---	----

Los resultados combinados de los experimentos indican que el tamaño de la fracción nematocida más activa está entre 3 y 0,3 kDa.

Efecto de las fracciones hidrolizadas de hidrolizado de gluten de trigo sobre *M. javanica* in vivo

Después de los resultados *in vitro* con las fracciones de péptidos y juveniles de segunda etapa de *M. javanica*, estos tamaños de fracciones también se probaron *in vivo*, en un invernadero en plantas de tomate. El efecto del hidrolizado enzimático de gluten de trigo no fraccionado (10 g/l) y las fracciones de hidrolizado enzimático de gluten de trigo de diferentes tamaños de péptidos se estudiaron en un experimento de interacción planta-nemátodo. Las plantas de tomate se trasplantaron a macetas de 2 litros con suelo esterilizado, para determinar el efecto después de completar una generación. Las macetas de 2 litros se inocularon con 2000 J2 de *M. javanica*. El producto se aplicó al suelo empapándolo cada dos semanas. Los porcentajes de reducción de huevos por gramo de raíz (en comparación con el control no tratado) después de una generación se pueden observar en la tabla 9. Los resultados muestran la efectividad del hidrolizado enzimático de gluten de trigo y todos los demás tamaños de fracciones en la reducción de la población de nemátodos en plantas de tomate, y especialmente la fracción 5-0,3kDa.

Tabla 9.

Tratamientos; tamaño de fracción	% de reducción del total de huevos*
Tamaño de fracción > 25 kDa	87,44
Tamaño de fracción > 5 kDa	86,17
Tamaño de fracción > 0,3 kDa	97,91
Tamaño de fracción < 0,3 kDa	86,59

*Nivel de infección en el control (plantas no tratadas) = 38.750 huevos/planta

Efecto de los hidrolizados enzimáticos de proteínas vegetales de diversas fuentes de proteínas vegetales sobre *M. javanica* in vitro

Se realizaron experimentos para evaluar el efecto de diferentes dosis (5 g/l, 2,5 g/l, 20 1,25 g/l, 0,626 g/l y 0,3125 g/l) del hidrolizado enzimático de gluten de trigo y otros

hidrolizados enzimáticos de proteínas vegetales (hidrolizados enzimáticos de harina de soja y guar) sobre *M. javanica* J2. Los productos se mezclaron con nemátodos y se mantuvieron juntos durante 48 h a 25°C en la oscuridad. Se determinó el porcentaje de mortalidad de nemátodos. La Tabla 10 muestra el efecto del gluten de trigo y los hidrolizados de guar y harina de soja sobre *M. javanica* J2 después de la aplicación.

Tabla 10.

Tratamientos	% de mortalidad de J2		
	Hidrolizado de gluten de trigo	Hidrolizado de harina de soja	Hidrolizado de guar
5 g/l	98,36	97,67	99,13
2,5 g/l	96,00	96,83	97,71
1,25 g/l	88,89	97,06	95,21
0,626 g/l	92,41	96,40	94,31
0,3125 g/l	86,58	91,89	93,57
0,15625 g/l	8,84	84,89	5,59

Los resultados demuestran que los hidrolizados enzimáticos de proteínas vegetales de otras fuentes vegetales además del gluten de trigo también pueden tener un efecto nematocida.

Estudio sobre la penetración y desarrollo de *M. javanica* en plantas tratadas y no tratadas

La penetración, desarrollo y reproducción del nemátodo agallador, *Meloidogyne javanica*, se estudiaron en plantas de tomate tratadas con hidrolizado de gluten de trigo (10 g/l) y no tratadas. Las plantas se inocularon con una suspensión de nemátodos de 3 J2 por gramo de suelo y luego se desarraigaron a los 5 y 20 DAI (días después de la inoculación) y al final de la primera generación. En cada fecha de muestreo se retiraron cuidadosamente todos los sistemas radiculares, se lavaron y se tiñeron en NaOCl-fucsina ácida-glicerina de acuerdo con el método descrito por Byrd et al., 1983. La penetración de *M. javanica* a los

5 DAI se determinó contando los J2 en las raíces teñidas utilizando un estereomicroscopio. A los 20 DAI se contaron los diferentes estadios de desarrollo de los nemátodos (J2 vermiforme, J3 y J4, y hembras y machos adultos) utilizando un estereomicroscopio. Al final de la primera generación se consideró el número de hembras ponedoras de huevos y de agallas por planta.

El número total de nemátodos en raíces de tomate no tratadas y tratadas con hidrolizado de gluten de trigo (10 g/l) después de 5 y 20 días después de la inoculación y al final de la primera generación se da en la tabla 11; los resultados comparativos muestran una reducción en la penetración temprana y un retraso posterior en el desarrollo del nemátodo en las plantas tratadas en comparación con el control no tratado.

Tabla 11.

Período	Tratamientos	Etapas J2	Etapas J3 y J4	Puesta de huevos hembras	Total agallas
5 DAI	control no tratado	102	-	-	-
	hidrolizado de gluten de trigo (10 g/l)	49	-	-	-
20 DAI	control no tratado	12	350	-	105
	gluten de trigo hidrolizado (10 g/l)	22	115	-	72
Fin de la 1ª generación	control no tratado	-	-	119	169
	gluten de trigo hidrolizado (10 g/l)	-	-	12	74

Este resultado sugiere un efecto nematicida/nematostático directo o incluso repelente del hidrolizado enzimático de proteína vegetal, pero también un efecto indirecto: inducción de resistencia y retraso de la finalización del ciclo de vida de los nemátodos una vez que han penetrado en las raíces.

Eficacia del hidrolizado de gluten de trigo frente a un nematicida comercial

Para determinar la eficacia del hidrolizado de gluten de trigo se llevó a cabo un experimento en un invernadero de plástico fuertemente infestado con el nemátodo formador de nudos *Meloidogyne incognita* (172 a 553 juveniles/250 cc de suelo). El gluten

de trigo se probó en dos concentraciones (10 g/l y 10 5 g/l) y se incluyó como control químico un nematicida comercial (Velum®, principio activo: fluopiram) aplicado siguiendo las instrucciones del fabricante. Los productos se aplicaron al suelo mediante empapado cada dos semanas.

Los tratamientos con gluten de trigo redujeron la reproducción de nemátodos después de dos generaciones (10 g/l 57% de reducción y Velum 46% de reducción, en comparación con el control no tratado) de manera similar, incluso ligeramente mejor, en comparación con el producto comercial (Figura 4 A y B).

Resumen

La presente invención se refiere a una composición nematicida para el control de plagas de plantas. La presente invención se refiere además a un método para el control de nemátodos parásitos en el suelo de una planta mediante la aplicación de la composición nematicida y su uso para el control de nemátodos parásitos en el suelo de una planta.