



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 344 096**

② Número de solicitud: 200900437

⑤ Int. Cl.:  
**A01N 63/04** (2006.01)  
**C12N 1/14** (2006.01)  
**C12R 1/645** (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

② Fecha de presentación: **16.02.2009**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **17.08.2010**

④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:  
**17.08.2010**

⑦ Solicitante/s: **ALCALIBER, S.A.**  
**c/ Fernando el Santo, 23**  
**28010 Madrid, ES**  
**Universidad de Córdoba**

⑦ Inventor/es: **Santiago Álvarez, Cándido;**  
**Quesada Moraga, Enrique y**  
**Muñoz Ledesma, Francisco Javier**

⑦ Agente: **Arias Sanz, Juan**

⑤ Título: **Cepa de *Beauveria bassiana* y sus aplicaciones.**

⑤ Resumen:

Cepa de *Beauveria bassiana* y sus aplicaciones.  
La invención se relaciona con un microorganismo de la especie *Beauveria bassiana* con capacidad para proteger de forma sistémica a la planta *Papaver somniferum* frente al ataque del insecto *Iraella luteipes* o un mutante de dicho microorganismo que mantiene dicha capacidad de proteger de forma sistémica a una planta frente al ataque de *I. luteipes*.

ES 2 344 096 A1

## DESCRIPCIÓN

Cepa de *Beauveria bassiana* y sus aplicaciones.

5 **Campo de la invención**

La invención se relaciona con una cepa de *Beauveria bassiana*, con capacidad para infectar de forma natural larvas del himenóptero cinípido *Iraella luteipes* (Thompson), y con su empleo en la protección sistémica de plantas de *Papaver somniferum* frente a este fitófago.

10 **Antecedentes de la invención***Papaver somniferum*

15 La adormidera (*Papaver somniferum* L.) es una de las plantas cultivadas más importantes para la industria farmacéutica, ya que constituye la única fuente de alcaloides como la morfina, codeína y tebaína, que son ampliamente utilizados en medicina como analgésicos, antitusivos y antiespasmódicos.

20 La adormidera es una planta herbácea, anual, con una fase vegetativa distintiva caracterizada por grandes y numerosas hojas pinnadas que se distribuyen en forma de roseta, y una etapa reproductiva durante la que florecen los brotes de los tallos. La raíz es pivotante y profunda, y el tallo erguido, robusto, poco ramificado y de hasta 1,60 m de altura. Las hojas abrazan el tallo por su base y son alternas, sentadas, grandes, lobuladas, lampiñas, de color verde claro y con nervaduras prominentes en el envés. Las flores son terminales y solitarias, compuestas de un cáliz de dos sépalos lampiños que se desprenden al abrirse la flor, y por una corola de cuatro pétalos en forma de cruz con numerosos estambres y con un pistilo de forma redondeada u ovoidea con varios estigmas. Los pétalos son generalmente blancos, aunque suelen tener tonalidades rosas o violáceas, pero siempre con una mancha oscura en la base. Sus frutos son cápsulas globosas y deprimidas, rematadas por una corona estigmática lobulada y contienen a las semillas. Estas son muy numerosas y pequeñas, reniformes y de superficie reticulada, y color blanco a pardo oscuro.

30 La maduración de las cápsulas coincide con una elevada concentración de alcaloides. En países de la zona templada, el cultivo de la adormidera se realiza con dos propósitos: 1) para la obtención de paja, importante origen de productos farmacéuticos; y 2) para obtención de semilla y aceite ambos utilizados en alimentación y otros procesos industriales de producción. En algunos países, la semilla se comercializa como el único producto del cultivo local de adormidera. Sin embargo, tanto la paja como la semilla tienen un importante uso y valor de mercado que aumentan la rentabilidad del cultivo.

35 Las plantas de adormidera también tienen una importancia menor, aunque creciente, como especie decorativa y las cápsulas secas se usan en las composiciones de flores secas, lo que ha dado lugar al desarrollo de cultivares específicos para este fin.

40 *Iraella luteipes*

El himenóptero cinípido *Iraella luteipes* (Thompson) (= *Timaspis papaveris* Kieffer en "Goury and Guignon 1905") [Goury, G., and J. Guignon 1905. Feuille. J. Nat. 200-2003], es el fitófago que ocasiona los daños más importantes a la adormidera (*Papaver somniferum*) en España, debido a la actividad barrenadora de sus larvas que viven confinadas en el interior del tallo de la planta.

50 Las hembras de *I. luteipes* aparecen en la segunda mitad de marzo, y tras la maduración sexual, realizan la puesta en los tallos de la adormidera durante el mes de abril y comienzos de mayo. Tras la eclosión, las larvas se desarrollan y se alimentan de forma endófito en el interior de los tallos, causando graves daños en el tejido vascular, que desembocan en una reducción de producción, y con mucha frecuencia, en el debilitamiento del tallo y la caída de plantas. Las larvas alcanzan el estado de pupa, y tras la recolección, permanecen en este estado en los restos de cosecha, foco principal de infestación, hasta la primavera siguiente (Chevin H, Janvry GC, 1980. Phytoma 317, 20-21; Sedivy J, Chilar P. 2005. Plant Protect. Sci. 41,73-79).

55 **Control de plagas**

La naturaleza completamente endófito de huevos, larvas y pupas de *I. luteipes*, que no se exponen durante ninguna etapa en la zona externa de la planta, limita enormemente el empleo de cualquier estrategia de control, pues es necesario acceder al interior de la planta, esto es, llevar a cabo una protección sistémica. La posibilidad de utilizar insecticidas químicos de síntesis de naturaleza sistémica esta muy limitada tanto desde el punto de vista económico, como ecotoxicológico, y en el caso particular de la adormidera, la disponibilidad de tales productos es nula. Además, los procesos de extracción química de los alcaloides de interés en el producto cosechado requieren la ausencia de cualquier traza de insecticidas en la planta, lo que es complejo cuando se trata de productos sistémicos. Por tanto, debido a que el control químico de *I. luteipes* es difícil, se necesitan métodos de control biológico. Entre los agentes más importantes para el control biológico de insectos fitófagos se encuentran los hongos entomopatógenos, entre los que destacan los ascomicetos mitosporicos, y dentro de ellos el género *Beauveria*, que se ha aislado de forma natural de un amplio número de géneros de insectos dañinos de gran importancia en Agricultura (Zimmermann, G. 2007. Biocontrol Sci. Techn. 17: 553-596).

Trabajos previos han revelado la existencia de un aislado del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*, que infecta de forma natural a las larvas del cinípido *I. luteipes*. Técnicas microbiológicas, moleculares y de microscopía electrónica mostraron que esta cepa del hongo *B. bassiana* era capaz de establecerse endofíticamente en la adormidera (Quesada-Moraga *et al* 2006; Mycopathologia 161(5):323-329). Aunque se ha revelado que *B. bassiana* puede colonizar endofíticamente hasta catorce especies diferentes de plantas (Vega F, 2008. J. Invertebr. Pathol. 98: 277-279), hasta la fecha, el único caso real en condiciones de campo donde se ha constatado protección sistémica de un cultivo frente al ataque de fitófagos ha sido el maíz, donde una cepa de *B. bassiana* se mostró eficaz frente al ataque de barrenadores del tallo (Bing *et al.*, 1991. Vuill. Environ. Entomol. 1207-1211; Cherry *et al.*, 2004. Int. J. Pest Manag. 50: 67-73).

### Compendio de la invención

Como se ha mencionado, *I. luteipes* es el fitófago que ocasiona los daños más importantes a la adormidera (*P. somniferum*) en España. Los inventores han descubierto un aislado del hongo *B. bassiana* que, sorprendentemente, posee la capacidad natural de colonizar endofíticamente a la planta, y dentro de ella, infectar a las larvas de *I. luteipes* y por tanto se puede emplear en la protección sistémica de las plantas de *P. somniferum* infestadas por las larvas de *I. luteipes*. Un cultivo de dicho aislado de *B. bassiana* fue depositado el día 30 de julio de 2008 en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con el número de acceso CECT 20744.

De este modo, la presente invención contribuye no sólo a evitar los problemas medioambientales y económicos asociados con el uso de insecticidas químicos sistémicos, sino que, además, contribuye a eliminar los problemas toxicológicos derivados de la extracción de los alcaloides de interés de la cosecha, que requieren la ausencia de traza alguna de insecticidas en la planta recogida.

Por tanto, en un aspecto, la invención se relaciona con un microorganismo de la especie *Beauveria bassiana*, depositado en la CECT con el número de acceso CECT 20744 que tiene la capacidad de proteger de forma sistémica a la planta *Papaver somniferum* frente al ataque del insecto *Iraella luteipes*, o un mutante de dicho microorganismo que mantiene dicha capacidad de proteger de forma sistémica a una planta de *P. somniferum* frente al ataque de *I. luteipes*. Un cultivo y una espora de dicho microorganismo constituyen un aspecto adicional de esta invención.

En otro aspecto, la invención se relaciona con una composición que comprende dicho microorganismo en cualquiera de sus formas.

En otro aspecto, la invención se relaciona con una semilla recubierta total o parcialmente con dicho microorganismo en cualquiera de sus formas.

En otro aspecto, la invención se relaciona con una planta recubierta total o parcialmente con dicho microorganismo en cualquiera de sus formas.

En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de dicho microorganismo en cualquiera de sus formas para proteger *P. somniferum* frente a *I. luteipes*.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para proteger una planta de *P. somniferum* frente a *I. luteipes*, que comprende aplicar una cantidad eficaz de dicho microorganismo en cualquiera de sus formas, al suelo que rodea dicha planta o directamente sobre la planta o sobre partes de la misma.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para proteger *P. somniferum* frente a *I. luteipes*, que comprende sembrar una semilla de *P. somniferum* recubierta con cualquiera de las formas de dicho microorganismo y cultivarla bajo condiciones que permiten la germinación y desarrollo de la planta.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para reducir la población larvaria de *I. luteipes*, que comprende poner en contacto dicha larva con una cantidad eficaz de dicho microorganismo en cualquiera de sus formas.

### Breve descripción de las figuras

La Figura 1A es una fotografía de una placa petri con larvas de *I. luteipes* infectadas por *B. bassiana*. La Figura 1B es una fotografía del detalle de una larva de *I. luteipes* infectada por *B. bassiana*.

La Figura 2 es una gráfica que muestra las curvas de vuelo de *I. luteipes* desde finales de marzo a principios de mayo durante tres campañas agrícolas (2005, 2006 y 2007).

La Figura 3 es una gráfica que muestra el efecto de las diferentes formas de inoculación del hongo en la planta sobre el número de larvas en las tres campañas agrícolas.

## Descripción detallada de la invención

La invención se relaciona, en general, con un microorganismo del género *Beauveria* (*B. bassiana*) con capacidad para proteger de forma sistémica a la planta *P. somniferum* frente al ataque del insecto *I. luteipes*, que es el fitófago que ocasiona los daños más importantes en *P. somniferum* en España, debido a la actividad barrenadora de sus larvas que viven confinadas en el interior del tallo de la planta.

En un aspecto, la invención se relaciona con un microorganismo, en adelante microorganismo de la invención, de la especie *Beauveria bassiana* depositado en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con número de acceso CECT 20744, que tiene la capacidad de proteger de forma sistémica a la planta *Papaver somniferum* frente a *Iraella luteipes* o un mutante de dicho microorganismo que mantiene dicha capacidad de proteger de forma sistémica a *P. somniferum* frente al ataque de *I. luteipes*.

Tal como aquí se utiliza, la expresión “capacidad de proteger de forma sistémica a la planta *P. somniferum* frente a *I. luteipes*” significa que el microorganismo de la invención es capaz de atacar a las larvas de dicho insecto eventualmente presentes en el interior del tallo de una planta de *P. somniferum* y provocar la muerte de dichas larvas, reduciéndose de este modo el número de larvas viables y, en consecuencia, protegiendo a la planta de *P. somniferum*, en su conjunto, frente a dicho insecto *I. luteipes*, tal como se pone de manifiesto en la Tabla 1 (Ejemplo 1), en la que se muestra la relación directa entre dosis del hongo y mortalidad de larvas de *I. luteipes*, que osciló entre el 65,0% y el 97,5%.

El ataque del microorganismo frente a larvas de *I. luteipes* puede determinarse por cualquier método que ponga en contacto los propágulos infectivos del hongo, conidias, con las larvas del fitófago, por ejemplo, obteniendo una suspensión de conidias del hongo y sumergiendo las larvas en diferentes concentraciones, tal como se muestra en el Ejemplo 1. La capacidad del microorganismo de la invención de proteger de forma sistémica a la planta *P. somniferum* frente al ataque de *I. luteipes* requiere poner en contacto el microorganismo con la planta, bien mediante su aplicación al lecho de siembra, bien a las semillas, o bien a cualquier estado fenológico del cultivo de *P. somniferum* y posteriormente, en el momento de la recolección, evaluar el número de larvas de *I. luteipes* presentes en los tallos. Como se pone de manifiesto en el Ejemplo 2(c), el tratamiento con *B. bassiana* tuvo un efecto significativo en la disminución del número de larvas por planta, provocando una reducción comprendida entre el 36,5% y el 73,4%, dependiendo del tipo de aplicación del hongo y de la campaña agrícola, pues la población del fitófago creció a lo largo de las tres campañas de estudio.

En una realización particular, el microorganismo de la invención, es un mutante de dicha cepa *B. bassiana* (CECT 20744) que mantiene la capacidad de proteger de forma sistémica a la planta *P. somniferum* frente al ataque del insecto *I. luteipes*. Tal como aquí se utiliza, el término “mutante” incluye a cualquier individuo u organismo resultante de una mutación o cambio en el ADN de un gen de un organismo que da como resultado un carácter (fenotipo) que no se encuentra en el tipo salvaje (“wild-type”).

El microorganismo de la invención ha sido aislado a partir de una larva de *I. luteipes* enferma que presentaba los síntomas característicos asociados a la infección con ascomicetos mitospóricos entomopatógenos. Brevemente, la larva fue desinfectada superficialmente y colocada en una cámara húmeda, con condiciones de 100% de humedad relativa para promover la etapa de crecimiento saprótrofo del hongo y la posterior esporulación en el exterior de la larva. Posteriormente, se procedió a aislar el hongo en medio de malta-agar, a partir de inóculo del exterior de la larva, para promover su crecimiento y desarrollo en placa, con el fin de identificarlos mediante la observación en el microscopio de las estructuras características que forman cada tipo de hongos, tal como se indica en el Ejemplo 1. El hongo identificado fue *Beauveria bassiana* y el aislado fue depositado en la CECT, bajo el número de acceso CECT 20744.

Un cultivo biológicamente puro, así como una spora del microorganismo de la invención constituyen aspectos adicionales de la presente invención.

En otro aspecto, la invención se relaciona con una composición, en adelante, composición de la invención, que comprende el microorganismo de la invención, junto con un vehículo agrícolamente aceptable. Dicha composición de la invención puede contener una población de microorganismos donde, al menos, uno de ellos es el microorganismo de la invención. La composición de la invención puede ser utilizada para los mismos fines que el microorganismo de la invención.

La concentración de microorganismo de la invención en la composición de la invención puede variar dentro de un amplio intervalo; no obstante, en una realización particular se prefiere utilizar una suspensión de conidias de alrededor de  $4 \times 10^7$  u.f.c./ml, aunque este aspecto dependerá en gran medida del tipo de aplicación. En aplicaciones a la semilla, se ha observado que una concentración diez veces superior garantiza un mayor número de semillas que reciben propágulos fúngicos.

En el sentido utilizado en esta descripción, el término “vehículo agrícolamente aceptable” se utiliza para indicar que dicho vehículo comprende una sustancia o combinación de sustancias que puede(n) ser utilizada(s) en el sector agrícola, e incluye cualquier material líquido o sólido agrícolamente aceptable que pueda añadirse y/o mezclarse con el microorganismo de la invención, para ponerlo en una forma de aplicación más sencilla o mejorada, o bien con

una intensidad de activación aplicable o deseable. Debido a la naturaleza del ingrediente activo de la composición (el microorganismo de la invención), dicho vehículo agrícolamente aceptable tiene que permitir o no perjudicar ni comprometer la viabilidad de dicho microorganismo.

5 La composición agrícola de la invención puede emplearse bien en forma sólida o bien en forma líquida, por ejemplo, en forma de un polvo humectable o de un concentrado emulsionable que incorpora los diluyentes convencionales. Dichas composiciones pueden obtenerse de manera tradicional, por ejemplo, mezclando el microorganismo de la invención con un diluyente y opcionalmente con otros ingredientes de formulación, como los conocidos por el experto en la materia. Preferiblemente, la suspensión concentrada podría contener agua (89,9%), mojante (jabón potasio 0,1%  
10 p/p), conidias del microorganismo de la invención (10% p/p) y el polvo humectable contendría las conidias del microorganismo de la invención (10% p/p), caolín (89,9%) y talco (0,1% p/p).

La composición agrícola de la invención puede formularse de manera que resulte apta para su administración por pulverización, espolvoreo, o cualquier otro procedimiento de administración agrícola conocido en el estado de la  
15 técnica.

La composición agrícola de la invención podría contener, además, otros ingredientes o constituyentes que son empleados habitualmente en las composiciones agrícolas y que son conocidas por el experto en la materia, tales como, pero no limitadas a, solventes, agentes activos o reguladores de pH, fertilizantes, etc., siempre y cuando todos ellos  
20 permitan o no perjudiquen ni comprometan la viabilidad del microorganismo proporcionado por la presente invención.

En otro aspecto, la invención se relaciona con una semilla de una planta recubierta total o parcialmente con el microorganismo de la invención o con esporas del microorganismo de la invención. En una realización particular, la semilla es una semilla de la planta *P. somniferum*.  
25

Asimismo, en otro aspecto, la invención se relaciona con una planta recubierta total o parcialmente con el microorganismo de la invención o con esporas del microorganismo de la invención. En una realización particular, la planta es una planta de *P. somniferum*.

30 En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso del microorganismo de la invención, sus esporas, un cultivo biológicamente puro de dicho microorganismo de la invención o una composición de la invención, para proteger *P. somniferum* frente a *I. luteipes*.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un procedimiento para la protección de una planta de *P. somniferum* frente a *I. luteipes*, que comprende aplicar una cantidad eficaz del microorganismo de la invención, de un cultivo de dicho microorganismo de la invención, de esporas del microorganismo de la invención o de la composición de la invención, al suelo que rodea a dicha planta, directamente sobre la planta o sobre partes de la misma. La aplicación de dicho microorganismo o composición se lleva a cabo por métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia.  
35  
40

En el sentido utilizado en esta descripción, el término “cantidad eficaz” se refiere a la cantidad suficiente para obtener los resultados beneficiosos o deseados. Una cantidad eficaz puede administrarse en una sola vez o en varias administraciones. En términos de tratamiento y protección, una “cantidad suficiente” es la cantidad necesaria para paliar, mejorar, estabilizar, revertir, impedir, retardar o retrasar la progresión de estadios de desarrollo de los fitófagos de las plantas.  
45

En otro aspecto, la invención se relaciona con un procedimiento para la protección de una planta de *P. somniferum* frente a *I. luteipes* que comprende sembrar una semilla recubierta total o parcialmente con el microorganismo de la invención o con una espora de dicho microorganismo de la invención y cultivarla bajo condiciones que permitan la germinación y el desarrollo de la planta. Estas etapas se llevan a cabo por métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia.  
50

El insecto *I. luteipes* es causante de grandes pérdidas en la cosecha de la adormidera (*P. somniferum*), debido a la actividad de sus larvas que viven confinadas en el interior del tallo de la planta. Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con un procedimiento para reducir la población larvaria de *I. luteipes*, que comprende poner en contacto dicha larva con una cantidad eficaz de un microorganismo de la invención, con una espora de dicho microorganismo de la invención, con un cultivo de dicho microorganismo de la invención o con una composición que contenga el microorganismo de la invención.  
55

El microorganismo de la invención puede ser aplicado de distintas maneras. En una realización particular, dicho microorganismo se puede aplicar por inoculación de la semilla, mientras que, en otra realización particular el microorganismo de la invención se puede aplicar por pulverización en cualquier parte de la planta o en el lecho de siembra. Asimismo, en otra realización particular, el microorganismo de la invención se puede aplicar por inmersión de la semilla o de la planta en una suspensión que contiene dicho microorganismo. Dichos métodos de aplicación son conocidos por el experto en la materia.  
60  
65

A continuación se describen algunos ejemplos ilustrativos que ponen de manifiesto las características y ventajas de la invención; no obstante, no se deben considerar como limitativos del objeto de la invención.

## Ejemplo 1

*Aislamiento y caracterización de B. bassiana EABb 04/01-Tip (CECT 20744)*

5 En la campaña agrícola 2003/2004, se observó en restos de adormidera recogidos en la finca “El Pino” en el término de Écija (Sevilla) una larva de *I. luteipes* enferma que presentaba los síntomas característicos asociados a la infección con ascomicetos mitospóricos entomopatógenos. Con el fin de esclarecer el agente causante de tal sintomatología, la larva fue tratada de la siguiente forma: (1) fue desinfectada superficialmente en una disolución al 1% de hipoclorito sódico en agua destilada estéril durante 1 minuto, y 2 veces, también durante 1 minuto, en agua estéril; (2) se colocó en una cámara húmeda, con condiciones de 100% de humedad relativa para promover la etapa de crecimiento saprófito del hongo y la posterior esporulación en el exterior de la larva; y (3) se procedió a aislar el hongo en medio de malta-agar, a partir de inóculo del exterior de la larva, para promover su crecimiento y desarrollo en placa, a efectos de identificación mediante la observación en el microscopio de las estructuras características que forman cada tipo de hongos. El hongo identificado en este caso fue *Beauveria bassiana*. La identificación de *B. bassiana* fue llevada a cabo siguiendo el manual de referencia Barnett, H.L. y Hunter, B.B. 1987. 4th edition. Collier Macmillan Publishers. London. pp 218. Asimismo, fue constatado molecularmente y la secuencia de la región utilizada para confirmar *B. bassiana* fue registrada en el GenBank (DQ364698). Dicha identificación fue corroborada además por uno de los mayores especialistas mundiales en sistemática de Hongos Entomopatógenos, el Dr. Stanislaw Balazy, del Research Centre for Agricultural and Forest Environment PAS (Bukowska str. 19, 60-809 Poznan, Polonia).

20 Un cultivo del aislado de *B. bassiana* EABb 04/01-Tip fue depositado en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con número de acceso 20744 el día 30 de julio de 2008.

25 Para determinar la respuesta del insecto a la acción del hongo (postulados de Koch), se planteó la realización de un bioensayo de patogeneicidad de *B. bassiana* en larvas de *I. luteipes*. En primer lugar, se procedió a la obtención de una suspensión de conidias procedentes del aislado obtenido de la larva original de *I. luteipes* enferma. La suspensión se tituló utilizando el método de la cámara de Malassez. A partir de la suspensión madre se obtuvieron las diferentes dosis empleadas en el bioensayo. En dicho bioensayo se utilizaron larvas procedentes de plantas atacadas por el insecto sin determinar su estadio. La administración del hongo se realizó sumergiendo las larvas en las soluciones con distintas concentraciones, a las cuales se les añadió mojante agrícola (Tween® 80/Polisorbato 80) al 0,01%. Una vez tratadas las larvas, éstas se colocaron en placas petri junto a un trozo de filtro humedecido para mantener el grado de humedad y favorecer el proceso de infección del hongo.

35 Cuatro grupos de 40 larvas (divididos en 4 repeticiones de 10 larvas) fueron tratados con dosis crecientes del hongo:  $1,5 \times 10^4$  conidias/ml;  $1,5 \times 10^5$  conidias/ml;  $1,5 \times 10^6$  conidias/ml y  $1,5 \times 10^7$  conidias/ml. Otro grupo de 40 larvas (dividido en 4 repeticiones de 10 larvas) se utilizó como testigo, tratándose únicamente con agua y el mojante (Tween® 80/ Polisorbato 80). Como se observa en las Figuras 1A y 1B, el hongo posee capacidad para infectar las larvas de *I. luteipes*. En la Tabla 1 se muestra la relación directa dosis-mortalidad, que osciló del 65,0% al 97,5%, e inversa dosis-tiempo letal, que osciló entre 2 y 3 días.

45 (Tabla pasa a página siguiente)

45

50

55

60

65

# ES 2 344 096 A1

TABLA 1

*Evolución de la mortalidad de larvas de Iraella luteipes causada por el aislado EABb 04/01-Tip de B. bassiana (CECT 20744)*

5

	Dosis Hongo (conidias/ml)	Repetición	Mortalidad por días			
			10/6/04	11/6/04	13/6/04	14/6/04
10	Testigo	1	0	0	1	0
		2	0	0	0	0
		3	0	0	1	0
		4	0	0	0	0
15	1,5x10 <sup>4</sup>	1	0	0	6	2
		2	0	0	3	1
		3	0	0	7	0
		4	0	0	6	1
20	1,5x10 <sup>5</sup>	1	0	0	2	0
		2	0	0	10	0
		3	0	0	8	0
		4	0	0	6	0
25	1,5x10 <sup>6</sup>	1	1	0	5	2
		2	0	0	10	0
		3	0	0	10	0
		4	0	1	8	0
30	1,5x10 <sup>7</sup>	1	0	1	6	2
		2	0	4	6	0
		3	0	1	9	0
		4	0	4	6	0
35						

## 40 Ejemplo 2

*Control de I. luteipes en P. somniferum mediante B. bassiana EABb 04/01-Tip (CECT 20744)*

### 1. Materiales y métodos

45

#### (a) Producción de conidias

El inóculo del aislado EABb 04/01-Tip de B. bassiana (CECT 20744) se obtuvo mediante crecimiento en un sustrato de arroz. Para ello, se añadieron 100 g de arroz y 200 ml de agua destilada en placas petri de cristal de 190 mm de diámetro y 30 mm de alto. A continuación, las placas se esterilizaron (120°C durante 20 minutos) y se inocularon con una suspensión de conidias de 10<sup>8</sup> conidias/ml, que se incubaron a 25°C durante 15 días, momento en el que el cultivo estaba bien esporulado. Llegado este momento se eliminó la humedad de las placas mediante exposición a 15°C y 60% de humedad relativa, y cuando se detectó que las placas estaban secas, se procedió a recolectar las conidias del hongo con la ayuda de una espátula, lo que proporcionó un producto pulverulento, que constituyó la base para la posterior inoculación de las semillas de P. somniferum. La suspensión de conidias usadas para el ensayo se ajustó diluyendo las conidias en Tween<sup>®</sup> 80 (Polisorbato 80) al 0,01% hasta una concentración final de 4,1x10<sup>7</sup> u.f.c./ml (unidades formadoras de colonias/ml)

55

#### (b) Inoculación de semillas de P. somniferum

60

La inoculación de las semillas de P. somniferum se realizó mediante el empleo de una máquina de tratamiento de semillas vía húmeda, donde se obtuvo una suspensión de conidias de B. bassiana EABb 04/01-Tip (CECT 20744) en agua de 1x10<sup>8</sup> conidias/ml aproximadamente, que se aplicó por vía húmeda a las semillas en una tratadora-mezcladora de laboratorio nebulizando con aerógrafo directamente la suspensión sobre las semillas de P. somniferum en movimiento, de manera que la aplicación fuera lo más homogénea posible.

65

(c) *Evaluación de la protección de P. somniferum**Diseño experimental*

5 Para evaluar la protección de plantas de *P. somniferum* frente a *I. luteipes* por acción de *B. bassiana* EABb 04/01-Tip (CECT 20744), las conidias de *B. bassiana* se pusieron en contacto con las plantas de *P. somniferum*. El ensayo consistió en 4 tratamientos con diferentes maneras de aplicación del hongo: (i) por incorporación al suelo antes de la siembra, (ii) por aplicación a las semillas, (iii) por pulverización de la planta en estado de roseta y (iv) testigo sin tratamiento (Tabla 2). Los ensayos se llevaron a cabo en la finca “La Proveedora”, en Écija (Sevilla), siendo la unidad  
10 experimental elegida una parcela rectangular de 20 m<sup>2</sup> (2 m x 10 m) de superficie. Se realizaron 4 repeticiones por tratamiento y testigo, con disposición en bloques al azar. El experimento se repitió tres veces durante las tres campañas agrícolas 2004/05, 2005/06 y 2006/07.

TABLA 2

15 *Tratamientos con B. bassiana EABb 04/01-Tip en la campañas 2004/2005; 2005/2006 y 2006/2007*

20 <b>Tratamiento</b>	<b>Dosis (esporas/ml)</b>	<b>Descripción</b>
Testigo	0	Sembradora manual a chorrillo
Suelo	1,3 x 10 <sup>7</sup>	Pulverizador Europulvé volumen y presión controlados
25 Semilla	1,05 x 10 <sup>8</sup>	Pulverización vía húmeda con aerógrafo
Roseta (2-4 hojas verdaderas)	6,1x10 <sup>7</sup>	Pulverizador Europulvé volumen y presión controlados

*Monitorización de la población de I. luteipes*

35 Con el fin de detectar la presencia del fitófago y la evolución de sus poblaciones, se colocaron cinco trampas cromáticas con una solución que contenía un detergente al 1%, dispuestas en los cuatro vértices y en el centro de la parcela. De acuerdo con estudios anteriores (Goerlich *et al.*, 1997. Trabajo Profesional Fin de Carrera. Universidad de Córdoba), el comienzo del periodo de vuelo del insecto tiene lugar aproximadamente durante la última semana de Marzo. Por ello, las trampas se colocaron el día 1 de Marzo. Se recogieron muestras de las trampas cada dos días y se  
40 procedió a la cuantificación del número de larvas de *I. luteipes*.

*Recolección de datos*

45 El efecto del tratamiento en la incidencia de la infección se analizó recogiendo muestras de 20 plantas al azar. Los tallos se cortaron longitudinalmente y se contaron el número de larvas total por planta. Los datos recogidos del número de larvas, así como el de insectos adultos, se analizaron estadísticamente utilizando un programa informático (ANOVA).

**2. Resultados**

50 El vuelo de *I. luteipes* en la finca “La Proveedora” se inició a mediados de Abril en el año 2005, a principios de Abril en 2006 y a finales de Marzo en 2007 (Figura 2). La progresión del brote del insecto no fue uniforme durante las tres campañas, con diferencias importantes en la duración del periodo de despunte del himenóptero, que duró 16, 20 y 41 días en 2005, 2006 y 2007 respectivamente (Figura 2). Además, la población del himenóptero aumentó de forma  
55 sucesiva durante las tres campañas agrícolas, con el máximo número de adultos capturados en el año 2007 (Figura 2).

60 El aumento progresivo en la población de *I. luteipes* a lo largo de las tres campañas se correspondía con un aumento en paralelo de la infestación de las larvas en la planta, con una media de número de larvas por planta en las plantas control de 4,1 ± 0,6 en 2005, 25,9 ± 1,8 en 2006 y 119,8 ± 4,0 en 2007 (Figura 3). Sin embargo, en las tres campañas, el tratamiento con *B. bassiana* tuvo un efecto significativo en la disminución del número de larvas por planta, presentando un número más pequeño de larvas las plantas inoculadas que el control (Figura 3). En la campaña de 2005, los tres métodos de inoculación fueron estadísticamente similares en cuanto a la reducción del número de larvas por planta, con una reducción de entre el 36,5% y el 58,5% con respecto a los controles. En la campaña de 2006, la inoculación en suelo, en la semilla y la aplicación tópica en el estado de roseta fueron equivalentes, mostrando  
65 reducciones de 64,4%-73,4%, comparando con las plantas control. Sin embargo, las tres formas de aplicación fueron mejores que la aplicación tópica en el tallo. Finalmente, en la campaña de 2007, todos los métodos de inoculación fueron estadísticamente similares en la reducción del número de larvas por planta, con una reducción con respecto a los controles de 51,9%-57,2% (Figura 3).



En general, no se observaron efectos adversos por la inoculación de *B. bassiana* ni en los parámetros de crecimiento de la plantas ni en los parámetros de rendimiento.

### 3. Conclusiones

5

Este ejemplo pone de manifiesto que el tratamiento de las plantas de adormidera con el aislado EABb 04/01-Tip de *B. bassiana* (CECT 20744), durante las tres campañas agrícolas estudiadas, redujo considerablemente el número de larvas de *I. luteipes*, lo que confirma el potencial uso como agente de control biológico de dicho microorganismo en *P. somniferum*.

10

Los resultados de este estudio indican que la aplicación de *B. bassiana* EABb 04/01-Tip (CECT 20744), tanto en el suelo, en la semilla, como en la planta en estado de roseta, fueron estadísticamente equivalentes, reduciendo el número de larvas comparado con el control, con reducciones del 36,5-58,5%, 64,4-73,4% y 51,9-57,2% en 2005, 2006 y 2007, respectivamente.

15

En algunos casos, la inoculación tópica y la inoculación de semillas han mostrado ser los métodos más efectivos de inoculación de *B. bassiana* en maíz, mientras que en otros, como en el plátano, la más eficiente fue la inoculación tópica. En el caso de la invención, se puede concluir que cualquier método de inoculación se podría utilizar para reducir la infección del insecto, aunque parece ser que la inoculación de la semilla requiere menor cantidad de inóculo, de manera que se reducen los costes de la aplicación y el impacto ambiental.

20

Dependiendo de la incidencia de la infección y del valor económico, la cepa del hongo *B. bassiana* EABb 04/01-Tip (CECT 20744) se puede utilizar sola o en combinación con un producto químico dirigido a los insectos adultos. El producto químico podría proporcionar una reducción inmediata de la infección del insecto, mientras que la cepa fúngica podría proporcionar un control continuo.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

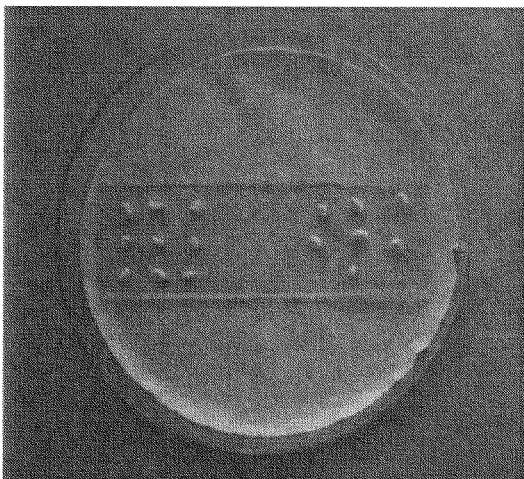
- 5 1. Un microorganismo de la especie *Beauveria bassiana* depositado en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con número de acceso 20744, con capacidad para proteger de forma sistémica a la planta *Papaver somniferum* frente al ataque del insecto *Iraella luteipes* o un mutante de dicho microorganismo que mantiene dicha capacidad de proteger de forma sistémica a una planta frente al ataque de *I. luteipes*.
- 10 2. Un cultivo biológicamente puro de un microorganismo según la reivindicación 1.
3. Una espora de un microorganismo según la reivindicación 1.
- 15 4. Una composición que comprende un microorganismo según la reivindicación 1, un cultivo según la reivindicación 2, o una espora según la reivindicación 3, y un vehículo agrícolamente aceptable.
5. Una semilla recubierta total o parcialmente con un microorganismo según la reivindicación 1 o con una espora según la reivindicación 3.
- 20 6. Semilla según la reivindicación 5, en donde dicha semilla es una semilla de *Papaver somniferum*.
7. Una planta recubierta total o parcialmente con un microorganismo según la reivindicación 1 o con una espora según la reivindicación 3.
- 25 8. Planta según la reivindicación 7, en donde dicha planta es una planta de *Papaver somniferum*.
9. Uso de un microorganismo según la reivindicación 1, de un cultivo según la reivindicación 2, de una espora según la reivindicación 3, o de una composición según la reivindicación 4, para proteger *Papaver somniferum* frente a *Iraella luteipes*.
- 30 10. Un método para proteger una planta de *Papaver somniferum* frente a *Iraella luteipes*, que comprende aplicar una cantidad eficaz de un microorganismo según la reivindicación 1, de un cultivo según la reivindicación 2, de una espora según la reivindicación 3, o de una composición según la reivindicación 4 al suelo que rodea dicha planta o directamente sobre la planta o partes de la misma.
- 35 11. Un método para proteger una planta de *Papaver somniferum* frente a *Iraella luteipes*, que comprende sembrar una semilla según la reivindicación 6 y cultivarla bajo condiciones que permiten la germinación y desarrollo de la planta.
- 40 12. Un método para reducir la población larvaria de *Iraella luteipes*, que comprende poner en contacto dicha larva con una cantidad eficaz de un microorganismo según la reivindicación 1, de un cultivo según la reivindicación 2, de una espora según la reivindicación 3, o de una composición según la reivindicación 4.
- 45 13. Método según cualquiera de las reivindicaciones 10 ó 12, en el que la aplicación de dicho microorganismo según la reivindicación 1, de un cultivo según la reivindicación 2, de una espora según la reivindicación 3, o de una composición según la reivindicación 4, se realiza mediante inoculación, pulverización o inmersión.

50

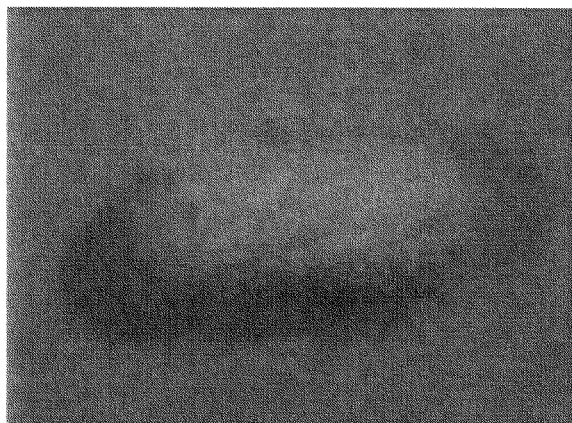
55

60

65



**FIGURA 1A**



**FIGURA 1B**

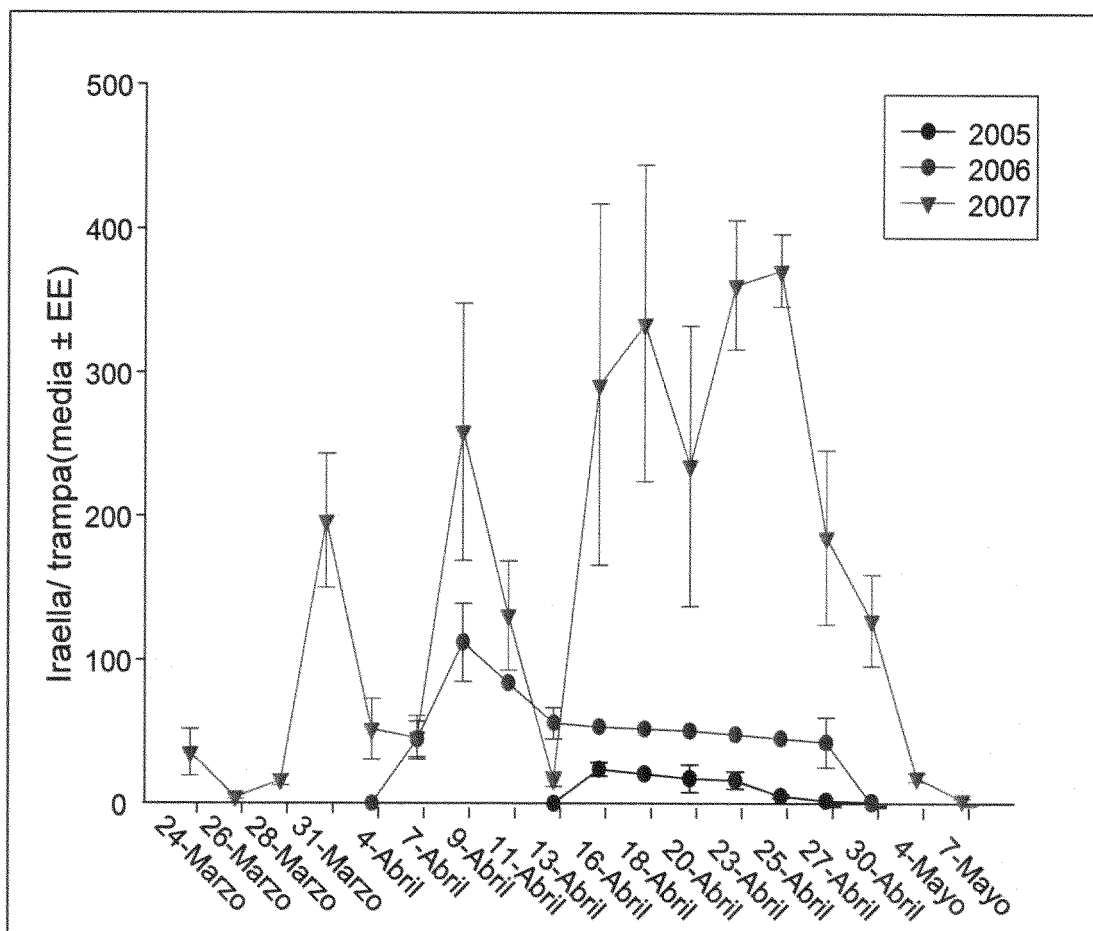


FIGURA 2

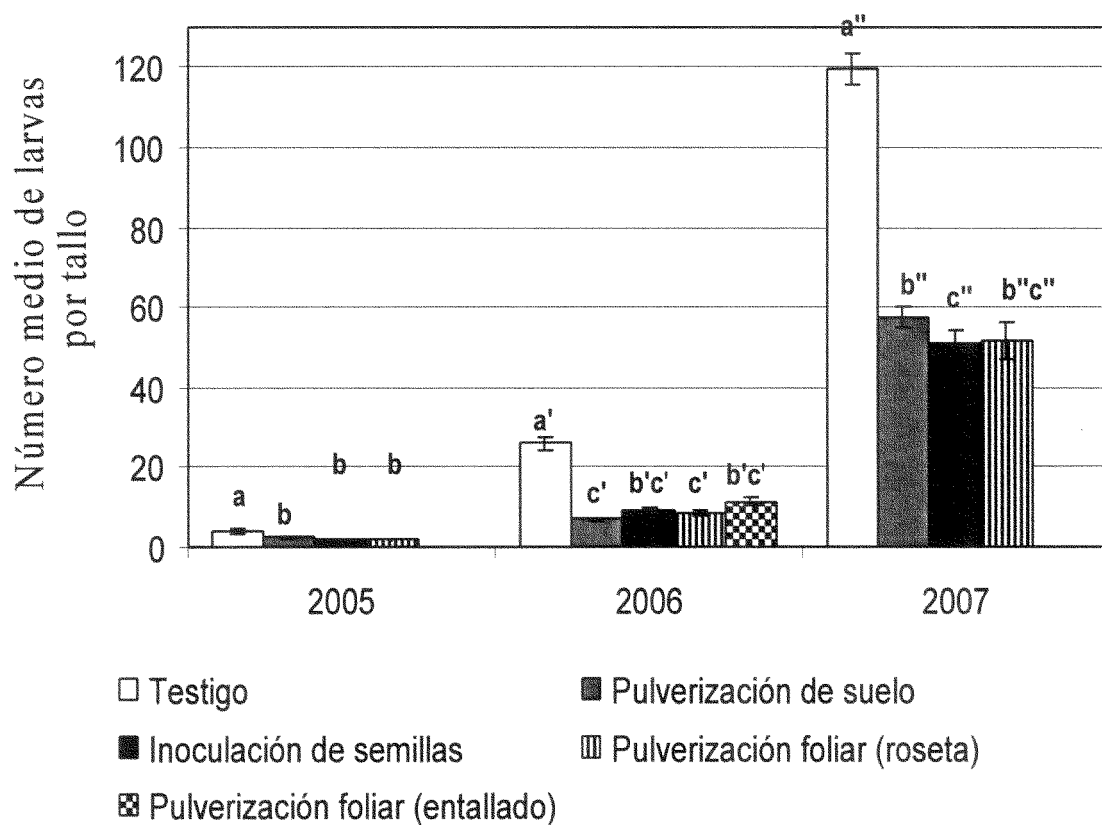


FIGURA 3



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 344 096

② Nº de solicitud: 200900437

③ Fecha de presentación de la solicitud: 16.02.2009

④ Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ **Int. Cl.:** Ver hoja adicional

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	QUESADA-MORAGA E. et al. Endophytic colonisation of opium poppy, <i>Papaver somniferum</i> , by an entomopathogenic <i>Beauveria bassiana</i> strain. <i>Mycopathologia</i> MAY 2006. Vol. 161, No. 5, páginas 323-329. ISSN 0301-486X.	1-13
A	MEYLING N. V. et al. Ecology of the entomopathogenic fungi <i>Beauveria bassiana</i> and <i>Metarhizium anisopliae</i> in temperate agroecosystems: Potential for conservation biological control. <i>Biological Control</i> . 2007. Vol. 43, No. 2, páginas 145-155, en especial páginas 145-148. ISSN 1049-9644.	1-13
A	SEDIVY, J; CIHLAR, P. Infestation of poppy cultures with the poppy gall wasp ( <i>Timaspis papaveris</i> ) Cynipidae: Hymenoptera. <i>Plant Protection Science</i> . 2005. Vol. 41, No. 2, páginas 73-79. ISSN 1212-2580.	1-13
A	POSADA F. et al. Inoculation of coffee plants with the fungal entomopathogen <i>Beauveria bassiana</i> (Ascomycota: Hypocreales). <i>Mycological Research</i> . 2007. Vol. 111, No. 6, páginas 748-757. ISSN 0953-7562.	1-13
A	MARANNINO, P. et al. A new bioassay method reveals pathogenicity of <i>Metarhizium anisopliae</i> and <i>Beauveria bassiana</i> against early stages of <i>Capnodis tenebrionis</i> (Coleoptera; Buprestidae). <i>Journal of Invertebrate Pathology</i> . 01.11.2006. Vol. 93, No. 3, páginas 210-213, especialmente páginas 210 y 211. ISSN 0022-2011.	1-13
A	OWNLEY B. H. et al. <i>Beauveria bassiana</i> : Endophytic colonization and plant disease control. <i>Journal of Invertebrate Pathology</i> . 2008. Vol. 98, No. 3, páginas 267-270. ISSN 0022-2011.	1-13

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

#### El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

<b>Fecha de realización del informe</b> 19.04.2010	<b>Examinador</b> E. Ulloa Calvo	Página 1/5
---	-------------------------------------	---------------

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

**A01N 63/04** (2006.01)

**C12N 1/14** (2006.01)

**C12R 1/645** (2006.01)

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

A01N, C12N, C12R

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, XPESP, NPL, MEDLINE, CABA, CROPU, AGRICOLA, HCAPLUS, CROPU, SCISEARCH

**OPINIÓN ESCRITA**

Nº de solicitud: 200900437

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 19.04.2010

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones	_____	<b>SÍ</b>
	Reivindicaciones	1-13	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones	_____	<b>SÍ</b>
	Reivindicaciones	1-13	<b>NO</b>

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

**Base de la Opinión:**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.



**1. Documentos considerados:**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	QUESADA-MORAGA E. et al. Mycopathologia MAY 2006. Vol. 161, No. 5, páginas 323-329.	05/2006
D02	MEYLING N. V. et al. Biological Control. 2007. Vol. 43, No. 2, páginas 145 - 155, en especial páginas 145-148.	2007
D03	SEDIVY, J; CIHLAR, P. Plant Protection Science. 2005. Vol. 41, No.2, páginas 73-79.	2005
D04	POSADA F. et al. Mycological Research. 2007. Vol. 111, No. 6, páginas 748 - 757.	2007
D05	MARANNINO, P. et al. Journal of Invertebrate Pathology. 01.11.2006. Vol.93, No.3, páginas 210-213,especialmente páginas 210 y 211.	01/11/2006
D06	OWNLEY B. H. et al. Journal of Invertebrate Pathology. 2008. Vol.98, No. 3, páginas 267 - 270.	2008

## Observaciones sobre documentos:

La solicitud describe un microorganismo de la especie *Beauveria Bassiana* en sus múltiples formas, así como los mutantes derivados de la misma, con capacidad para proteger a la planta *Papaver somniferum* frente al ataque del insecto *Iraella luteipes*. También reivindica el recubrimiento de semillas o plantas con este microorganismo, el uso del mismo para proteger *Papaver somniferum* frente a *Iraella luteipes*, y el método para llevar a cabo esa protección.

El documento D01 habla de la colonización endofítica de la adormidera (*Papaver somniferum*) por una cepa del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* (Cepa EABb 04/01-Tip).

El documento D02 estudia la existencia de cepas indígenas de *Beauveria bassiana* en agrosistemas de clima templado, para evaluar su potencial en el control biológico de plagas. Hay evidencias que demuestran la interacción entre *B.bassiana* y ciertas plantas, de forma que *B.bassiana* las coloniza endofíticamente y las protege frente a insectos herbívoros. Se citan como plantas ejemplos de esta interacción el maíz, el cacao, la adormidera, el café y el tomate (ver epígrafe 2.3.).

El documento D03 indica otra alternativa para el control biológico de la plaga *Timaspis papaveris* en cultivos de adormidera, especialmente eficaz sobre larvas situadas en la parte alta de la planta. Emplea para ello un himenóptero parásito del cinípido, *Trichomalus bracteatus*.

El documento D04 habla de la inoculación de plantas de café con el hongo entomopatógeno *B.bassiana*, para su empleo en el control biológico de la plaga *Hypothenemus hampei*.

El documento D05 anticipa la efectividad de *B.bassiana* como patógeno sobre la larva *Capnodis tenebrionis*, plaga de las orquídeas.

El documento D06 describe la aplicación de *B.bassiana* a semillas de tomate y algodón, que resulta en la colonización endofítica de *B.bassiana* sobre las plantas. Esta colonización les confiere protección contra patógenos y plagas.

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 6.1 y 8.1 L.P.)

Hoja adicional

El objeto técnico de la solicitud, en sus reivindicaciones 1-4, es un microorganismo de la especie *Beauveria Bassiana* en sus múltiples formas (como cultivo biológicamente puro, como espora o como composición que lo lleva), así como los mutantes derivados de la misma, con capacidad para proteger a la planta *Papaver somniferum* frente al ataque del insecto *Iraella luteipes*. También se protege el recubrimiento de semillas o plantas con este microorganismo (reivindicaciones 5-8), el uso del mismo para proteger *Papaver somniferum* frente a *Iraella luteipes* (reivindicación 9) y el método para llevar a cabo esa protección: aplicando el microorganismo al suelo, a la planta, o a partes de la misma (reivindicación 10), o bien sembrando una semilla recubierta con el mismo y cultivándola (reivindicación 11). La aplicación se realiza por inoculación, pulverización o inmersión (reivindicación 13). La reivindicación 12 describe un método para reducir la población larvaria de *I.luteipes* que consiste en poner en contacto la larva con el microorganismo.

El documento más cercano al estado de la técnica corresponde a D01.

El documento D01 anticipa un microorganismo de la especie *Beauveria bassiana* con capacidad para proteger a la planta *Papaver somniferum* frente al ataque del insecto *Iraella luteipes* (llamado en este artículo por un sinónimo suyo, *Timaspis papaveris*). En concreto habla de la misma cepa objeto de solicitud, la cepa EABb 04/01-Tip. En su página 324 indica la posibilidad de una protección sistémica de la adormidera frente a su plaga (*T.papaveris*) con *B.bassiana* siempre que este hongo entomopatógeno tenga capacidad de colonización endofítica en la planta, cosa que demuestra en el propio documento. El método consiste en pulverizar una suspensión de *B.bassiana* sobre la planta o la semilla.

Las características de las reivindicaciones 1-13 ya son conocidas del documento D01. Por lo tanto esas reivindicaciones no son nuevas a la vista del estado de la técnica conocido, y en consecuencia tampoco tienen actividad inventiva.