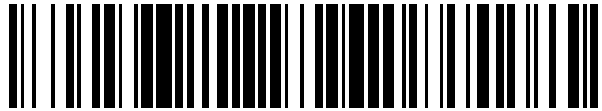


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 351 449**

21 Número de solicitud: 200901183

51 Int. Cl.:
A01K 67/033 (2006.01)
A01N 63/02 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación: **08.05.2009**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **04.02.2011**

Fecha de la concesión: **16.11.2011**

45 Fecha de anuncio de la concesión: **28.11.2011**

45 Fecha de publicación del folleto de la patente:
28.11.2011

73 Titular/es:
AGROCONTROL 2007, S.L.
CTRA. NACIONAL, 340 - KM. 419
04745 LA MOJONERA, ALMERIA, ES

72 Inventor/es:
VILA RIFA, ENRIQUE y
CABELLO GARCIA, TOMAS

74 Agente: **Riera Blanco, Juan Carlos**

54 Título: **PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCIÓN DE UNA ESPECIE DE PARASITOIDE AUTÓCTONO DE LA ESPECIE TRICHOGRAMMA ACHAEAE Y SU UTILIZACIÓN DEL MISMO PARA EL CONTROL DE LEPIDÓPTEROS PLAGA DE CULTIVOS.**

57 Resumen:

En general, la presente invención se refiere a un procedimiento para la producción y a la utilización de una especie de parasitoide autóctono para el control biológico de lepidópteros plaga de cultivos. En particular, la presente invención se refiere a un procedimiento de producción y a la utilización de la especie autóctona *Trichogramma achaeae* Nagaraja & Nagarkatti (Hym.: Trichogrammatidae), parasitoide de huevos de lepidópteros, en programas de control biológico, en especial para el control del lepidóptero exótico *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lep.: Gelechiidae) y otras especies del género *Chrysodeixis* y *Helicoverpa* (Lep.: Noctuidae).

ES 2 351 449 B1

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la producción de una especie de parasitoide autóctono de la especie *Trichogramma achaeae* y su utilización para el control de lepidópteros plaga de cultivos.

En general, la presente invención se refiere a un procedimiento para la producción y a la utilización de una especie de parasitoide autóctono para el control biológico de lepidópteros plaga de cultivos. En particular, la presente invención se refiere a un procedimiento de producción y a la utilización de la especie autóctona *Trichogramma achaeae* Nagaraja & Nagarkatti (Hym. Trichogrammatidae), parasitoide de huevos de lepidópteros, en programas de control biológico, en especial para el control del lepidóptero exótico *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lep.: Gelechiidae) y otras especies del género *Chrysodeixis* y *Helicoverpa* (Lep.: Noctuidae).

La introducción de programas biológicos que emplean especies de artrópodos como agentes de control viene despertando, desde la segunda mitad del siglo XX, un continuo interés por parte de los productores de una amplia gama de cultivos, en particular de regiones geográficas cálidas, como es la cuenca Mediterránea. Tanto es así, que esta práctica ha pasado de una gestión conducida de forma amateur por los agricultores individuales a articularse bajo grandes explotaciones comerciales, donde las compañías internacionales producen los agentes beneficiosos en grandes cantidades durante todo el año, agentes que son suministrados a los países a escala mundial.

Así, la práctica del control biológico está creciendo constantemente, año tras año, de acuerdo con la creciente demanda de productos alimenticios libres de residuos químicos por parte de los legisladores gubernamentales sobre salud y seguridad, las empresas mayoristas y sus clientes al por menor.

Los beneficios obtenidos por los productores y los consumidores como consecuencia de la correspondiente disminución en el uso de plaguicidas químicos son evidentes y bastante considerables.

Un aspecto importante de la lucha biológica donde se emplean entomófagos (parasitoides y depredadores) viene determinado por las características biológicas de la población o de las poblaciones utilizadas. Así, en numerosas ocasiones se ha demostrado que la aplicación del concepto de especie taxonómica (basada sólo en caracteres morfológicos) es insuficiente para conseguir un agente de control biológico eficaz (Schlinger y Doult, 1984; Waterhouse, 1998; Huber y col., 2001; Waterhouse y Sands, 2001; Driesche y col., 2007). A este respecto, la eficacia del control biológico viene determinada entre otros parámetros, por la amplia variabilidad genética para una determinada especie, produciéndose una adaptación a las condiciones geográficas locales que resulta en unas múltiples y variadas características en cuanto a la biología, la ecología o la proporción huésped/presa. Así, debido a tal variabilidad, la efectividad también es muy diferente cuando el agente se aplica como agente de lucha biológica.

A esto hay que añadir que la existencia de especies hermanas ("sibling species") y especies crípticas ("cryptic species"), ambas presentando caracteres morfológicos idénticos pero con comportamientos biológicos totalmente distintos, ha provocado que, en casos concretos de utilización como agentes de lucha biológica, se produzcan importantes fracasos, tanto cuando se aplican estos agentes como parasitoides y como depredadores (Schlinger y Doult, 1984; Waterhouse, 1998; Huber y col., 2001; Waterhouse y Sands, 2001; Driesche y col., 2007). Estos efectos anteriores han sido documentados en la utilización de al menos una especie del género *Trichogramma* (Sorati y col., 1996; Thomson y col., 2004).

En el sureste Español, en particular en los últimos años, se ha producido un rápido aumento de la superficie de cultivos en los cuales se aplican programas de control integrado de plagas. En concreto en Almería, que es una de las mayores zonas productoras de hortalizas de Europa, la superficie donde se practica un control integrado ha aumentado de 1.400 hectáreas en la campaña 2006/07 hasta más de 18.000 hectáreas en 2008/09. Este incremento de los programas de control integrado de plagas plantea un reto sin precedentes y es especialmente necesario para que el sector hortícola almeriense continúe siendo competitivo en vista de la evolución de los mercados. Sin embargo, la aplicación del control integrado de plagas no se ha llevado a cabo por igual en los diferentes cultivos. Por ejemplo, en los cultivos de tomate de invernadero el control biológico se aplica todavía en un bajo porcentaje. Además, para este tipo de cultivo, recientemente ha aparecido una plaga exótica, el lepidóptero *Tuta absoluta*, que está causando graves problemas y para la que, hasta la fecha, no existe en España una solución satisfactoria.

Tuta absoluta se ha extendido desde América Central hacia la mayor parte de América del Sur y es considerada una de las principales plagas del tomate y de otras solanáceas (EPPO, 2005). Su control químico es difícil por diversas razones. En primer lugar debido a la biología del lepidóptero *Tuta absoluta*, ya que las larvas se localizan dentro de las hojas o de los frutos (Branco y Franca, 1993; Urbaneja y col., 2007), lo que provoca la necesidad de un uso intensivo del control químico. En segundo lugar, debido a la aparición de resistencias a las materias activas hasta ahora empleadas (EPPO, 2005). Por ello, varios países de Suramérica han desarrollado y aplicado el control biológico de la especie plaga con especies de parasitoides oófagos, en especial con *Trichogramma pretiosum* (Riley) y *T. nerudai* Pintureau y Gerding (Riquelme y Botto, 2003, Parra y Zucchim, 2004, Bueno, 2005; Faria y col. 2008).

Tuta absoluta se introdujo en Castellón, España, en 2006, dispersándose desde la Comunidad Valenciana a Murcia e Ibiza (Urbaneja y col., 2007; EPPO, 2008) y en 2008 se observaron los primeros ataques en cultivos en invernaderos de Almería. La plaga ha desarrollado una gran severidad en las últimas campañas en cultivos de tomate en invernaderos del área de Murcia (Lucas y col., 2009). Se está extendiendo rápidamente por todo el país, incluyendo las Islas Cana-

rias, y también por otros países Europeos, donde también está provocando daños, aunque por ahora menos graves. En España se han evaluado diversos depredadores autóctonos para el control de *Tuta absoluta*, por ejemplo mediante la utilización de las chinches depredadoras *Nesidiocoris tenuis* (Reuter) y *Macrolophus pygmaeus* (Rambur) (Urbaneja y col., 2008), pero ninguno de estos depredadores es capaz de proporcionar un control satisfactorio de *Tuta absoluta*.
 5 Las especies de parasitoides disponibles comercialmente para el control de esta plaga proceden de Suramérica y son exóticas en Europa; por ello, su introducción en España constituiría un riesgo medioambiental.

Por tanto, existe una gran necesidad de encontrar una solución para esta plaga de cuarentena, que puede poner en riesgo las exportaciones de tomates. Es especialmente necesaria la posibilidad de disponer de una especie autóctona y,
 10 por tanto sin riesgos para el medio ambiente, que pueda llevar a cabo un control adecuado. Además, esta especie debe ser relativamente fácil de criar a gran escala, de forma que pueda estar disponible en las cantidades necesarias y a un precio asequible para los agricultores.

Según un primer aspecto de la invención, un objeto de la misma es la producción a escala comercial de la especie
 15 de parasitoide autóctona *Trichogramma achaeae* mediante la utilización de un nuevo procedimiento de cría.

En un segundo aspecto, la invención se refiere a la utilización de la especie de parasitoide autóctona *Trichogramma achaeae* para el control de lepidópteros plaga de cultivos. Por tanto, otro objeto de la invención es la utilización de la especie de parasitoide autóctona *Trichogramma achaeae* producida según el primer aspecto de la invención para el
 20 control de lepidópteros plaga de cultivos.

La introducción de la utilización comercial de esta especie en España incrementará la cartera de agentes biológicos disponibles para el control de lepidópteros, ofreciendo soluciones para determinadas plagas para las que, hasta la fecha, no se habían encontrado métodos satisfactorios de control, y generando al mismo tiempo, para otras plagas que
 25 sí disponían de enemigos naturales, competencia entre los productores, reduciendo de esta manera los costes para los agricultores.

Personas cualificadas de la firma solicitante han evaluado las diferentes especies de parasitoides autóctonas que podrían ser fácilmente criadas a gran escala (unas 50 especies). De entre ellas, se ha seleccionado la especie autóctona
 30 *T. achaeae*. Esta especie presenta una amplia distribución mundial. *T. achaeae* ha sido descrita en Asia (China, India y Rusia), Europa (Francia, Rusia), África (Cabo Verde) y en el Nuevo Mundo (Argentina, Barbados, Chile, Trinidad y Tobago, U.S.A.) y recientemente en España. *T. achaeae* es una especie parasitoide de huevos de 26 especies de lepidópteros pertenecientes a 10 familias: Gelechiidae, Geometridae, Noctuidae, Notodontidae, Oecophoridae, Pieridae, Pyralidae, Sphingidae, Tortricidae y Yponomeutidae (Polaszek, datos no publicados). *T. achaeae* se ha evaluado como agente de control biológico de diferentes lepidópteros plaga (Jalali y col., 2001; Jalali y Singh, 2002; Jalali y col.,
 35 2002; Chandrashekar y col., 2003; Yadav y Anand, 2003).

Para la selección del material biológico adecuado (3 poblaciones o “strains” del agente parasitoide) la solicitante ha encontrado que estas poblaciones se diferencian entre sí, y con respecto a otras descritas en la literatura, por sus
 40 diferentes características biológicas, evaluadas por los parámetros de sus tablas de vida, y por el porcentaje de parasitismo sobre las especies de lepidópteros plaga. Además, dichas poblaciones, pertenecientes a una misma especie, pueden ser fácil y rápidamente diferenciadas empleando una combinación de la técnica PCR y la digestión con endonucleasas de restricción de los fragmentos amplificados. Cada población del parasitoide posee una actividad parasítica característica para los huevos de *Tuta absoluta* que determina una diferente mortalidad inducida (expresada por la Tasa Marginal de Ataque). La mezcla de dos o más de dichas poblaciones tiene una actividad parasítica significativamente mayor que la de los genotipos individuales. Esto se debe a la mezcla y apareamiento selectivos de los adultos de cada población, lo cual se lleva a cabo con una generación anterior a la de su utilización, en condiciones de campo, con el objetivo de aplicarlos como agentes de lucha biológica, obteniéndose así un vigor híbrido.

T. achaeae cumple todos los requisitos para el éxito del desarrollo comercial, ya que se trata de un sistema simple,
 50 fiable y barato que aporta grandes poblaciones sostenibles para su utilización como parasitoide de plagas agrícolas, siendo además una especie de cría rápida y económica.

A este respecto, *T. achaeae* se cría de forma sencilla, como otras especies del mismo género (Cabello, 1985),
 55 sobre el huésped facticio *Ephesttia kuheniella*. Un huésped facticio es una especie que habita hábitats completamente diferentes que la especie de parasitoide, pero que aún así permite el desarrollo de algunos estadios del parasitoide (en este caso de la larva y pupa) en alguna de sus fases de desarrollo (en este caso el huevo). *E. kuheniella* son polillas plaga de productos de naturaleza farinácea, y son muy comunes en productos alimenticios de almacén, nunca habiendo sido descritas en plantas o cultivos. El uso de los huéspedes facticios permite multiplicar las poblaciones por
 60 35 en 10 días, y los requisitos físicos para el éxito de la cría son muy razonables, preferentemente una temperatura de aproximadamente 20-25°C, preferentemente 22°C, y una humedad relativa del 65-85%. Igualmente, *T. achaeae* se mantiene en un contenedor apropiado para el desarrollo adecuado del parasitoide garantizando el intercambio de oxígeno y permitiendo la salida de los adultos de la especie de parasitoide emergidos de los huevos de su huésped alternativo.

En referencia al segundo aspecto de la invención, ésta se refiere a la utilización del parasitoide *T. achaeae*, producido en el sistema mencionado anteriormente según los procedimientos de cría descritos, para el control biológico de plagas agrícolas de acuerdo con los métodos y procedimientos según la invención en programas de control biológico

en cultivos agrícolas. En una forma de realización especialmente preferente de la utilización según la invención, el parasitoide *T. achaeae* se utiliza para controlar la polilla exótica *Tuta absoluta*, con la cual el parasitoide no ha tenido anteriormente ningún contacto en la naturaleza.

5 Se han completado ensayos tanto de laboratorio como de campo sobre el porcentaje de reducción de daños por *Tuta absoluta* obtenidos después de, la suelta de diversas poblaciones de *T. achaeae* obtenidas según la presente invención en cultivos de tomate. Estos ensayos demuestran efectividades de hasta un 97% de reducción de daños (véase el Ejemplo 1). Tales resultados demuestran que las poblaciones de *T. achaeae* obtenidas según el método de cría descrito en esta invención presenta considerables ventajas frente a otras especies conocidas por ser parasitoides de *Tuta absoluta*. Por un lado, *T. achaeae* es una especie autóctona y, por tanto, sin riesgos ambientales y, por otro lado, se han alcanzado efectividades mayores que las descritas por otros autores en América del Sur con otras especies del mismo género tales como *T. pretiosum*.

15 De acuerdo con este segundo aspecto de la invención, *T. achaeae* se introduce en cultivos de tomate de invernadero y al aire libre para controlar la polilla plaga *Tuta absoluta*, utilizando tarjetas de cartón que se cuelgan de las plantas, para su distribución por el cultivo. Se distribuye del orden de 50 a 400 recipientes de cartón por hectárea con cantidades de hasta 12.000 pupas de *T. achaeae* cada uno por un invernadero semanalmente. Con introducciones semanales de entre 500.000 y 1.000.000 de individuos durante las épocas de vuelo de los adultos de *Tuta absoluta* se consigue un control exitoso. Igualmente, *T. achaeae* se introduce en cultivos de tomate de invernadero y al aire libre para controlar la polilla plaga *Tuta absoluta* adherida a un material inerte que actúa como portador, pudiéndose distribuir por el cultivo con espolvoreo directo.

25 En otra forma de realización de la invención, y de acuerdo con este segundo aspecto de la misma, *T. achaeae* se utiliza para controlar la polilla plaga *T. absoluta* en otros hortícolas diferentes del tomate donde esta plaga está causando daños, por ejemplo patata, berenjena, entre otros, utilizando la misma metodología descrita para el tomate.

30 De acuerdo con otra forma de realización de la invención, *T. achaeae* se utiliza para controlar otras especies de lepidópteros plaga de cultivos, como es el caso de la polilla *Chrysodeixis chalcites* (Esper, 1789) (Lepidoptera: Noctuidae) en cultivo de platanera en las Islas Canarias y *Helicoverpa armigera* (= *Heliothis armigera*) (Lepidoptera: Noctuidae) en tomate (tanto en invernadero como en cultivos al aire libre) y en algodónero. En los últimos años la “lagarta o bicho camello”, *Chrysodeixis chalcites*, se ha convertido en uno de los noctuidos plaga más importante en los cultivos de platanera de Canarias, presentando su control diversas dificultades debido al bajo nivel de la eficacia de los insecticidas de origen químico o biológico y al empleo de estrategias de lucha no adecuadas. Igualmente, se ha constatado un incremento de los daños causados por este y otros noctuidos plaga, como *H. armigera*, en distintos cultivos hortícolas debidos a la escasa efectividad del control químico a causa de la resistencia de las plagas a la mayoría de las materias activas disponibles.

40 Así, según tales realizaciones de la invención, las poblaciones de *T. achaeae* obtenidas según el procedimiento descrito anteriormente, serán utilizadas en múltiples programas de control biológico como arma de control biológico contra algunas de las plagas de lepidópteros más graves, a saber las especies de *Tuta absoluta*, *Chrysodeixis chalcites* y *Helicoverpa armigera*. Preferentemente, el cultivo comercial se selecciona de entre cultivos hortícolas protegidos de invernaderos de cristal, de plástico o cultivos bajo malla y también de cultivos al aire libre, por ejemplo de tomate y berenjena, y también fresa o frambuesa, cultivo de algodón y platanera.

45 Ejemplos

Ensayos técnicos para evaluar el potencial de control de Tuta absoluta con el parasitoide autóctono T. achaeae en un cultivo de tomate de invernadero

50 El objetivo de los ensayos era evaluar la efectividad de las poblaciones de *T. achaeae* para controlar poblaciones de *T. absoluta* en cultivos de tomate de invernadero. Para ello se han realizado ensayos bajo condiciones de laboratorio, de semicampo y de campo, en ciclo de verano y otoño (Ejemplo 1) y en ciclo de invierno y primavera (Ejemplos 2 y 3).

Ejemplo 1

Ensayos de laboratorio y de semicampo en cultivos de tomate con ciclo de verano-otoño

60 Materiales y métodos

Cría de los insectos

65 Los ejemplares de *T. absoluta* empleados en todos los ensayos fueron obtenidos de poblaciones criadas bajo condiciones de laboratorio sobre hojas de tomate. A su vez, la cría de *T. achaeae*, también en laboratorio, se llevó a cabo utilizando como huésped facticio *Ephestia kuehniella* Zeller, según la metodología empleada descrita en la presente invención.

Ensayos de laboratorio

Para evaluar la aceptación y parasitación de los huevos de *T. absoluta* por las hembras del parasitoide se llevó a cabo un ensayo previo, bajo condiciones de laboratorio ($25 \pm 1^\circ\text{C}$, 60-80% H.R. y 16:8 horas L:D). Para ello se utilizó la metodología empleada por Brotdjojo & Walter (2006), con la excepción de que a cada hembra se le ofertaron 10 huevos de *T. absoluta* de menos de 24 h. El número de repeticiones fue de 10. Los huevos en los que se había observado parasitación fueron evolucionados hasta la emergencia de los parasitoides adultos.

Ensayos de semicampo en invernaderos comerciales

El ensayo se llevó a cabo en un invernadero comercial de Almería entre el 27 de agosto y el 22 de septiembre de 2008. Dentro del invernadero se dispusieron 8 jaulones de 8 m^2 con plantas de tomate transplantadas en macetas (20 plantas/jaulón) de la variedad Cherry. Cuando las plantas tuvieron una altura de 1 m fueron infestadas con adultos de *T. absoluta* (sueitas de 4 adultos/planta). En 4 jaulones se realizaron un total de 7 sueitas de *T. achaeae* (30 adultos/planta) cada 3 ó 4 días; otros 4 jaulones fueron dejados como control. Después de 27 días desde la infestación, se contabilizó el número de larvas de *T. absoluta*, las hojas con galerías y los frutos dañados. Se realizó un Análisis de la Varianza y se compararon las medias mediante mínima diferencia significativa, utilizando el software SPSS v. 15 (SPSS, 2006).

*Resultados**Ensayos de laboratorio*

Se encontró que los huevos huéspedes fueron bien aceptados por las hembras de *T. achaeae*, ya que el 100% de los huevos recibieron una puesta del parasitoide. El 83,3% de los huevos viraron a color negro (parasitismo aparente; cuando el parasitoide ha alcanzado el estadio de pupa), el resto no lo hizo, quedando finalmente colapsados. Ello puede ser debido al pequeño tamaño del huevo huésped (longitud = $372,46 \pm 9,24 \mu$ y anchura = $233,98 \pm 6,39 \mu$; n=25).

Ensayos de invernadero

En la Tabla 1 se presentan los resultados del número de larvas de *T. absoluta*, así como el número de galerías en hojas y frutos dañados por planta, en tomate en invernadero, a los 27 días de iniciado el ensayo. Durante dicho periodo, las temperaturas oscilaron entre los extremos de $38,6^\circ\text{C}$ (máxima absoluta) y $22,2^\circ\text{C}$ (mínima absoluta) con una valor promedio de $29,0^\circ\text{C}$. En los análisis de la varianza se ha encontrado efectos altamente significativos del tratamiento ($P < 0,01$) en el número de larvas y galerías, y significativo ($P < 0,05$) en el número de frutos dañados. El número de larvas de la especie plaga era casi 12 veces inferior en las parcelas de sueitas de *T. achaeae* respecto al control, lo cual representa una eficacia del 91,74%.

TABLA 1

Número de larvas de Tuta absoluta y daños en cultivo de tomate en invernadero según tratamiento, en condiciones de verano
(las medias con letras diferentes son diferentes estadísticamente)

Número por planta	Control	Con sueitas de <i>T.achaeae</i>
Larvas de <i>T. absoluta</i>	5,0a	0,4b
Minas de <i>T. absoluta</i>	23,5a	5,8b
Frutos dañados	0,9a	0,1b

Las dosis de sueitas empleadas en el bioensayo son equivalentes a las empleadas a nivel comercial en Brasil para *T. pretiosum*. La eficacia encontrada (91,74%) es superior a los valores máximos reportados para *T. pretiosum* (87,7%) en dicha zona (Parra & Zucchim 2004).

Ejemplo 2

*Ensayos de campo en cultivo de tomate con ciclo de invierno-verano*5 *Materiales y métodos**Cría de los insectos*

10 Los individuos de *T. absoluta* y de *T. achaeae* procedían de las mismas condiciones de crías descritas anteriormente en el Ejemplo 1.

Ensayo en invernadero

15 El ensayo de llevó a cabo en un invernadero experimental de 400 m² de la “Estación Experimental de la Fundación Cajamar Las Palmerillas”, en Almería, en invierno y primavera del 2009. En el invernadero se plantó un cultivo de tomate con una densidad de 2 plantas por m². El invernadero se dividió en dos parcelas, colocando una malla en el centro. Dos semanas después del trasplante, se introdujo el depredador *N. tenuis* a razón de 0,5 individuos por m² (dosis habitual de sueltas de este enemigo natural en cultivo de tomate de primavera en Almería). Se soltó también en
20 todo el cultivo 4 adultos de *T. absoluta* por planta 3 semanas después del trasplante del cultivo. Una parcela se utilizó como control, sin sueltas de parasitoides, y en la otra parcela se realizaron las sueltas de *T. achaeae*, que se iniciaron al día siguiente de las sueltas de *T. absoluta*. En la parcela con sueltas de *T. achaeae*, se introdujeron 60 individuos de *T. achaeae* por planta dos o tres veces por semana, todas las semanas en las que se observaron adultos activos de la plaga (capturas en trampas encoladas amarillas). Semanalmente se contabilizaron el número de huevos de *T. absoluta*,
25 el número de galerías con y sin larvas y los frutos dañados en un total de 20 plantas por parcela. También se recogieron semanalmente muestras de hojas con huevos de *T. absoluta* y se examinó en el laboratorio el porcentaje de huevos que estaban parasitados.

30 *Resultados*

Los resultados se han contabilizado durante las primeras 7 semanas de cultivo, periodo en el que ya se observan resultados muy claros de efectividad del parasitoide *T. achaeae*. Dentro de un rango de temperaturas muy amplio, con 42°C de máxima y 6°C de mínima, se obtuvo, mediante sueltas del parasitoide *T. achaeae*, un porcentaje de parasitismo
35 del 97,6%, con unas reducciones de daños por la plaga en hojas del 92,5% respecto al control, donde solo se introdujo el depredador *N. tenuis*. Las eficacias obtenidas son superiores a las descritas por otros autores utilizando otras especies de parasitoides en cultivos de tomate en Suramérica para el control de *T. absoluta*.

40 Ejemplo 3

*Ensayos de semicampo en cultivo de tomate para evaluar la compatibilidad de uso de T. achaeae con el depredador N. tenuis en cultivo de tomate, con ciclo de invierno-verano*45 *Materiales y métodos**Cría de los insectos*

50 Los individuos de *T. absoluta* y de *T. achaeae* procedían de las mismas condiciones de crías descritas anteriormente en el Ejemplo 1.

Ensayo en invernadero

55 El ensayo de llevó a cabo en un invernadero comercial de Almería, en la primavera del 2009. Dentro del invernadero se dispusieron 8 jaulones de 8 m² con plantas de tomate transplantadas en macetas (20 plantas/jaulón) de la variedad Cherry. Cuando las plantas tuvieron una altura de 1 m fueron infestadas con adultos de *T. absoluta* (sueitas de 4 adultos/planta). En 2 jaulones se realizó una única suelta de 20 individuos de *Nesidiocoris tenuis* (1 individuo/planta), en 2 jaulones se realizaron un total de 7 sueltas de 60 individuos de *T. achaeae* por planta, en tres semanas consecutivas (2-
60 3 sueltas por semana), en 2 jaulones se introdujo ambos enemigos naturales, *N. tenuis* y *T. achaeae*, a las mismas dosis que en los otros jaulones, y los dos últimos jaulones se dejaron sin enemigos naturales, como control. Se contabilizó semanalmente el número de larvas de *T. absoluta*, las hojas con galerías y los frutos dañados en 6 plantas de cada jaulón.

65

Resultados

En los jaulones con sueltas del parasitoide *T. achaeae* se alcanza un alto nivel de parasitismo (95,3%) y una fuerte reducción de daños respecto a los tratamientos con solo el depredador *N. tenuis* o sin enemigos naturales.

5

Los resultados sobre la efectividad de *T. achaeae* para controlar la plaga *T. absoluta* demuestran que los individuos del parasitoide seleccionados y producidos de acuerdo con el sistema descrito en la presente invención presentan múltiples ventajas frente a otras especies de parasitoides utilizadas, anteriormente en otros países. Por tanto, para el productor comercial de agentes de control biológico, *T. achaeae* es un enemigo natural eficaz, preferentemente para el control de *T. absoluta* y probablemente para el control de otros noctuidos plaga de pequeño tamaño, como *H. armigera* y *C. chalcites*.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Procedimiento de producción del parasitoide de la especie *Trichogramma achaeae* **caracterizado** porque la especie se cría durante una o dos generaciones sobre la polilla *Ephesia kuehniella* como huésped facticio.

2. Procedimiento de producción según la reivindicación 1, **caracterizado** porque los parasitoides de la especie *Trichogramma achaeae* se mantienen a una temperatura de 20-25°C, preferentemente 22°C, y con una humedad relativa del 65-85%.

10 3. Utilización del parasitoide de la especie *Trichogramma achaeae* producido según cualquiera de las reivindicaciones anteriores para el control biológico de plagas en cultivos comerciales.

15 4. Utilización según la reivindicación 3, **caracterizada** porque las plagas de los cultivos se seleccionan de entre los lepidópteros gelechiidos, tales como la especie *Tuta absoluta*, y los noctuidos tales como las especies *Helicoverpa armigera* y *Chrysodeixis chalcites*.

20 5. Utilización según la reivindicación 4, **caracterizada** porque el cultivo comercial se selecciona de entre cultivos hortícolas protegidos, de invernaderos de cristal, de plástico o cultivos bajo malla y también cultivos al aire libre.

25 6. Utilización según las reivindicaciones 3-5, **caracterizada** porque la especie *Trichogramma achaeae* producida según las reivindicaciones 1-2 se distribuye en los cultivos adherida a un material inerte que actúa como portador, pudiéndose distribuir por el cultivo con espolvoreo directo.

30

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

21 N.º solicitud: 200901183

22 Fecha de presentación de la solicitud: 08.05.2009

32 Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

51 Int. Cl.: **A01K67/033** (01.01.2006)
A01N63/02 (01.01.2006)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	CONSOLI, F.L. Side effects of insecticides used in tomato fields on the egg parasitoid <i>Trichogramma pretiosum</i> Riley (Hym., Trichogrammatidae), a natural enemy of <i>Tuta absoluta</i> (Meyrick) (Lep., Gelechiidae). J. Appl. Ent., 1998, vol. 122, páginas 43-47. Ver material y métodos.	1,2
X	ES 2011068 A6 (SOCIÉTÉ COOPERATIVE AGRICOLE DE SEMENCES DE LIMAGNE "LIMAGRAIN") 16.04.1988, columna 1, 1-11.	1,2
X	US 4370946 A (INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE) 01.02.1983, columna 2, líneas 9-17.	1,2
X	US 5178094 A (CROP GENETICS INTERNATIONAL CORPORATION) 12.01.1993, columna 12, líneas 51-60.	1,2
X	CHANDRASHEKHAR, K. Evaluation of parasitization efficiency of different species of <i>Trichogramma</i> on eggs of chilli fruit borer, <i>Helicoverpa armigera</i> (Hübner). Proceedings of the symposium of biological control of lepidopteran pests, 2002, julio 17-18.	3-6
X	JALALI, S.K. y SINGH, S.P. Selection and host age preference of natural enemies of <i>Chilo partellus</i> (Swinhoe) (Lepidoptera: Pyralidae). Pest Management and Economy Zoology, 202, vol. 10 (2), páginas 149-157.	3
X	JALALI, S.K. et al. Selection of promising species of trichogrammatid egg parasitoid for field evaluation against coconut leaf eating caterpillar, <i>Opisina arenosella</i> Walker. Journal of Plantation Crops, 2002, vol. 30 (2), páginas 30-32.	3
A	La polilla del tomate. Una nueva plaga. <i>Tuta absoluta</i> (Meyrick). [en línea] Recuperado de Internet [recuperado el 22.12.2010] <URL: http://www.terraia.com/index.php?revista=69&articulo=441 >	3-6

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
22.12.2010

Examinador
A. Polo Díez

Página
1/5

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

A01K, A01N

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, CLUSTER AGRICOLA (STN)

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 22.12.2010

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1,2	SI
	Reivindicaciones 3,4,5,6	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-6	NO

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

Base de la Opinión.-

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

1. Documentos considerados.-

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	CONSOLI, F.L. Side effects of insecticides used in tomato fields on the egg parasitoid <i>Trichogramma pretiosum</i> Riley (Hym., Trichogrammatidae), a natural enemy of <i>Tuta absoluta</i> (Meyrick) (Lep., Gelechiidae). J. Appl. Ent., 1998, vol. 122, páginas 43-47.	
D02	ES 2011068 A6 (SOCIÉTÉ COOPERATIVE AGRICOLE DE SEMENCES DE LIMAGNE "LIMAGRAIN")	16.04.1988
D03	US 4370946 A (INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE)	01.02.1983
D04	US 5178094 A (CROP GENETICS INTERNATIONAL CORPORATION)	12.01.1993
D05	CHANDRASHEKHAR, K. Evaluation of parasitization efficiency of different species of <i>Trichogramma</i> on eggs of chilli fruit borer, <i>Helicoverpa armigera</i> (Hübner). Proceedings of the symposium of biological control of lepidopteran pests, 2002, julio 17-18.	
D06	JALALI, S.K. y SINGH, S.P. Selection and host age preference of natural enemies of <i>Chilo partellus</i> (Swinhoe) (Lepidoptera: Pyralidae). Pest Management and Economy Zoology, 202, vol. 10 (2), páginas 149-157.	
D07	JALALI, S.K. et al. Selection of promising species of trichogrammatid egg parasitoid for field evaluation against coconut leaf eating caterpillar, <i>Opisina arenosella</i> Walker. Journal of Plantation Crops, 2002, vol. 30 (2), páginas 30-32.	
D08	La polilla del tomate. Una nueva plaga. <i>Tuta absoluta</i> (Meyrick). [en línea] Recuperado de Internet [recuperado el 22.12.2010] <URL: http://www.terraia.com/index.php?revista=69&articulo=441 >	

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

La invención se refiere a un procedimiento de producción del himenóptero *Trichogramma achaeae* que consiste en la cría del mismo durante una o dos generaciones sobre el lepidóptero *Ephestia kuehniella* en determinadas condiciones (reivindicaciones 1-2).

La invención también se refiere a la utilización del himenóptero *Trichogramma achaeae* producido con el procedimiento anterior para el control biológico de cultivos comerciales en general (reivindicación 3) y de los cultivos afectados por *Tuta absoluta*, *Helicoverpa armigera* o *Chrysodeixis chalcites* (reivindicaciones 4-6)

Novedad y actividad inventiva (art. 6 y 8 de la L.P)

Varios documentos del estado de la técnica divulgan métodos y aparatos para cultivar especies del género *Trichogramma* sobre la polilla de la harina *E. kuehniella*. Estas especies del género *Trichogramma* se vienen utilizando hace tiempo como agentes de biocontrol contra diferentes plagas:

En el documento D1 se describe el cultivo de *Trichogramma pretiosum* sobre *E. kuehniella* para combatir *T. absoluta*.

El documento D2 se refiere a un procedimiento y aparato para cultivar insectos entomófagos para su posterior utilización contra parásitos de las cosechas. Concretamente se nombra al entomófago *Trichogramma maidis* cultivado sobre huevos de *E. kuehniella* (columna 1, líneas 1-11)

En el documento D3 se divulga la conservación de huevos de insectos oofagos, como *Trichogramma*, después de cultivarlos sobre de huevos de la polilla de la harina, en particular *E. kuhniella*, (columna 1, línea 1- columna 2, línea 24)

D4 describe un aparato para cultivar insectos parásitos que se usan comúnmente para el control de plagas. Entre ellos se mencionan a los del género *Trichogramma* que se pueden cultivar sobre *E. kuhniella* (columna 12, líneas 56-60).

Dado que todas las especies de *Trichogramma* utilizadas hasta ahora han sido cultivadas con éxito sobre la polilla de la harina *E. kuhniella*, y se ha descrito ampliamente la tecnología para llevar a cabo este tipo de cultivo, se considera que la elección de este sustrato para el cultivo de otra especie de *Trichogramma*, sería evidente para un experto en la materia.

Por ello, se considera que si bien, las reivindicaciones 1 y 2, son nuevas, ya que ningún documento cita explícitamente el cultivo de la especie *Trichogramma achaeae* sobre la polilla de la harina, dichas reivindicaciones carecen de actividad inventiva teniendo en cuenta cualquiera de los documentos D1 a D4 por separado.

Por otra parte, como se ha mencionado anteriormente, muchas de las especies del género *Trichogramma* y, en particular *T. achaeae*, han sido utilizadas para el control biológico de plagas de diferentes insectos.

En el documento D5 se prueban varias especies de *Trichogramma* (entre ellas *T. achaeae*) como agentes de control sobre *Helicoverpa armigera* (tabla 1)

En los documentos D6 y D7 se seleccionan, entre varias especies de *Trichogramma* que incluyen a *T. achaeae*, la más adecuada como enemigo de *Chilo partellus* (tabla 1) y de *Opinsina arenosella* (tabla 3).

Dado que el proceso de cultivo que se emplea para obtener la *T. achaeae* no otorga, en principio, ninguna característica que la haga diferente de otras *T. achaeae* cultivadas de otro modo y empleadas en la lucha biológica, se considera que la reivindicación 3 carece de novedad a la vista de cualquiera de los documentos D5, D6 y D7. El documento D5 afecta asimismo a la novedad de las reivindicaciones 4 a 6.

En estos documentos se muestra que no todas las especies de un mismo género son igualmente adecuadas para el control de una plaga concreta. Existe una alta especificidad entre el parásito y el entomopatógeno, lo que hace que la búsqueda de una especie adecuada para la lucha biológica sea un proceso de selección entre los enemigos naturales más adecuados para la misma.

De hecho, en el documento D5 aunque se utiliza *Trichogramma achaeae* contra la *Helicoverpa armigera*, no es esta especie la que da mejores resultados.

Por ello, se recomienda que se elabore una nueva reivindicación, conteniendo parte de la reivindicación 4 y ajustada a lo que realmente se ha ensayado y descrito en su solicitud, es decir, a la utilización de *T. achaeae* para combatir las plaga de *T. absoluta*. Esta nueva reivindicación podría tener novedad y actividad inventiva, ya que ningún documento de los encontrados en el estrado de la técnica divulga ni sugiere que el biocontrol de la *Tuta absoluta* se realice con esa especie concreta de *Trichogramma* (ver documento D8 que muestra los enemigos naturales y especies utilizadas hasta el momento en el biocontrol de esta plaga del tomate).