

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 376 444**

21 Número de solicitud: 201030539

51 Int. Cl.:

A01N 63/04 (2006.01)

A01P 7/04 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **14.04.2010**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **14.03.2012**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
14.03.2012

71 Solicitante/s:
**UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA
AVDA. MEDINA AZAHARA 5
14071 CÓRDOBA, ES**

72 Inventor/es:
QUESADA MORAGA, ENRIQUE

74 Agente/Representante:
Arias Sanz, Juan

54 Título: **MÉTODO PARA LA PROTECCIÓN DE PLANTAS LEÑOSAS FRENTE A EUZOPHERA PINGUIS.**

57 Resumen:

La invención se relaciona con el uso de un microorganismo de la especie *Beauveria bassiana* para la protección de una planta leñosa frente al ataque de *Euzophera pinguis* Haw.

ES 2 376 444 A1

DESCRIPCIÓN

MÉTODO PARA LA PROTECCIÓN DE PLANTAS LEÑOSAS FRENTE

A Euzophera pinguis

CAMPO DE LA INVENCIÓN

5 La invención se relaciona, en general, con un método para el control biológico del insecto fitófago *Euzophera pinguis* Haw en plantas leñosas basado en el empleo de un microorganismo entomopatógeno de la especie *Beauveria bassiana*. La invención también se relaciona con un aislado de *B. bassiana* con capacidad para proteger plantas leñosas frente a *E. pinguis* Haw y sus aplicaciones.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

 El lepidóptero *Euzophera pinguis* Haw, conocido con los nombres vulgares de “barrenador de ramas” o “abichado” es un insecto fitófago que vive a expensas de plantas de la familia de las oleáceas. El adulto de *E. pinguis* Haw es una mariposa de
15 20-25 mm de envergadura alar de color marrón grisáceo con 2 bandas transversales más claras. Deposita unos huevos ovalados, aplanados y reticulados, de color blanquecino que posteriormente viran al rosa. Son difíciles de ver ya que miden 1x0,75 mm. La larva, blanquecina con matices amarillentos o verdosos, llega a alcanzar los 25 mm. La crisálida, de color marrón, se desarrolla dentro de una estructura de seda, poco tupida
20 [Alvarado, M; Civantos, M., y Durán, J. M. 2008. Plagas. En “El cultivo del olivo”, 6ª Edición. Coed. Mundi-Prensa, Consejería de Agricultura y Pesca de la Junta de Andalucía. Madrid. pp: 409-593].

 Este lepidóptero se encuentra presente en la mayor parte de Europa y en los países ribereños del Mediterráneo [Y. Arambourg, “Traité D'Entomologie Oleicole”,
25 pág. 80-83, Consejo Oleícola Internacional, 1986]. En estos últimos países, sus ataques van dirigidos principalmente al olivo (*Olea europaea*), mientras que en las zonas situadas más al norte su huésped más habitual es el fresno (*Fraxinus* spp. L.). Aunque las zonas olivareras de Andalucía, Marruecos y Túnez son reconocidas, desde mediados de la década pasada, como las que presentan una mayor población de este lepidóptero
30 [véase Y. Arambourg, *op. cit.*, pág. 82], los niveles de infestación detectados han sido tradicionalmente bajos y se consideraban de escasa o nula repercusión económica para ese cultivo. Sin embargo, en los últimos años, las poblaciones de *E. pinguis* Haw se

encuentran en expansión y comienzan a causar daños de importancia económica que resultan especialmente elevados en las plantaciones de olivos jóvenes, en donde llegan a producir la muerte de plantas completas.

En los olivares de Andalucía, las larvas de *E. pinguis* Haw pasan el invierno alimentándose, alojadas bajo la corteza de sus árboles huéspedes, sufriendo su transformación a crisálidas y posterior emergencia como mariposas adultas al producirse la subida de temperaturas que acompaña a la entrada de la primavera. Así, coincidiendo con los meses de marzo, abril y mayo suelen encontrarse las mayores poblaciones de individuos adultos. Las mariposas, durante su breve periodo de vida, se aparean y depositan sus huevos sobre la superficie de troncos y ramas, normalmente aprovechando heridas sufridas por la corteza del árbol para facilitar la penetración de las larvas recién eclosionadas.

La subida de temperaturas que se produce en verano hace que la nueva generación de insectos se mantenga en estadio larvario protegida bajo la corteza de la planta y alimentándose a expensas de la misma a la espera de la nueva moderación de temperaturas que se produce a la entrada del otoño, de tal modo que, en torno a los meses de septiembre y octubre, vuelve a producirse una nueva emergencia de adultos y un nuevo periodo reproductivo que dará lugar a la generación de larvas invernales [M. Alvarado, M. Civantos y J. M. Durán, capítulo “Plagas”, pág. 438-441 en “El cultivo del Olivo”, D. Barranco, R. Fernández-Escobar y L. Rallo, editores, Junta de Andalucía/Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, 1996].

En su fase larvaria es cuando *E. pinguis* Haw produce los daños que la convierten en un peligro para las plantas en las que se hospeda ya que, en ese estadio vital, se alimenta del floema (zona en donde se localiza el sistema vascular de conducción de savia) de sus plantas huésped, produciendo, especialmente en la base del tronco y de las ramas principales, galerías que discurren entre la corteza externa y la parte leñosa de los mismos; dichas galerías alojan a un único individuo y pueden tener hasta 10 cm de longitud con una trayectoria que tiende a formar un anillo alrededor de la rama o tronco al que afecta. De esta forma, al seccionar las conducciones de savia de la planta, se produce un decaimiento por falta de alimento en las ramas afectadas, que amarillean, pierden vigor y productividad, y puede terminar en el secado completo de las mismas o en caídas de estas ramas débiles ayudadas por factores externos, e.g.,

golpes de viento, etc. El problema es especialmente grave en el caso de las plantas jóvenes, puesto que la escasa sección de su tronco permite que el ataque de un número muy reducido de larvas de *E. pinguis* Haw corte en su totalidad las vías de savia en la base del tronco y ocasione la muerte del árbol completo.

5 El control de *E. pinguis* Haw resulta muy complicado debido a que dicho fitófago pasa la mayor parte de su vida en estado larvario en posición endofítica, dentro de las galerías que excava bajo la corteza de los árboles a los que parasita, en donde se encuentra protegido del contacto con los agentes insecticidas empleados en los tratamientos habituales para el control de las plagas que afectan al olivar. Además, casi
10 siempre están presentes larvas de todas las edades, huevos y crisálidas, debajo de la corteza de los árboles que parasita. Las larvas recién nacidas son las más sensibles y accesibles al control químico.

Actualmente, el control de *E. pinguis* Haw se lleva a cabo mediante el empleo de compuestos químicos, concretamente, una feromona y Clorpirifos [O,O-dietil O-(3,5,6-
15 tricloro-2-piridinil)-fosforotioato)], el único producto actualmente autorizado, recomendado en tratamientos de tronco y ramas principales pero sin mojar las partes verdes, debido al gran efecto del tratamiento sobre la fauna útil.

También se ha obtenido una buena eficacia en el control de *E. pinguis* Haw mediante la mezcla de Clorpirifos y aceite de verano en los meses de abril-mayo y
20 octubre. En este caso, el tratamiento debe realizarse huyendo de los días calurosos, con la mínima presión y mojando abundantemente el tronco y las ramas principales, no la copa.

No obstante, estos tratamientos químicos presentan importantes inconvenientes, entre los que se encuentran:

- 25 - son económicamente costosos: porque se necesitan dosis elevadas de insecticida y aceite para lograr una penetración efectiva bajo la corteza del árbol;
- son muy agresivos para la planta: los aceites que se emplean como dispersantes del insecticida y vehículos penetrantes de la corteza son tóxicos; los recubrimientos de la corteza de la planta con estos aceites producen fácilmente
30 resecaamiento y agrietamientos de la misma, así como clorosis y sequedad de las hojas (quemaduras), especialmente en tiempo caluroso;

- son ambientalmente muy agresivos: porque se utilizan concentraciones altas de insecticida y su actuación es indiscriminada tanto para especies de insectos perjudiciales al cultivo como para aquellas otras que resultan beneficiosas por su carácter de depredadores de otros insectos perjudiciales; y
- 5 - son un peligro potencial de contaminación del fruto: dado que al buscarse una penetración hasta la zona vascular de la planta existe el riesgo de que los productos utilizados o algunos de sus subproductos de degradación se incorporen a las vías de savia y acaben siendo transportados hasta los frutos, en especial en tratamientos de otoño.

10 Además, algunos insectos fitófagos pueden desarrollar resistencia a los productos químicos utilizados para el control de la plaga, lo que impide su empleo en el futuro.

La patente española ES 2149073 describe un sistema de detección y captura de *E. pinguis* Haw basado en el empleo de un atrayente específico para *E. pinguis* Haw, en donde dicho atrayente consiste en una mezcla de los compuestos Z9,E12-tetradecadienol (I) y acetato de Z9,E12-tetradecadienilo (II); no obstante, este método
15 requiere el empleo de un procedimiento de captura, e.g., trampas, lo que eleva el coste del control de la plaga, por lo que su empleo en la actualidad se circunscribe al seguimiento de poblaciones del lepidóptero.

Por tanto, resulta necesario desarrollar un método alternativo a los tratamientos
20 químicos para el control de *E. pinguis* Haw que satisfaga los requisitos económicos, ambientales y sociales que emanan de la agricultura sostenible y de su herramienta en el control integrado de dichas plagas.

En este sentido, el control biológico de los insectos fitófagos constituye una alternativa más atractiva que la de los productos químicos. Esta alternativa comprende
25 el empleo de agentes de control biológico que existen en la naturaleza y son los enemigos naturales de los insectos fitófagos a controlar. Los agentes de control biológico (organismos vivos y compuestos producidos por dichos microorganismos) son más seguros, biodegradables y menos perjudiciales para el medio ambiente que los compuestos químicos habitualmente utilizados para proteger o tratar enfermedades de
30 plantas. Sin embargo, el uso de dichos agentes de control biológico puede verse limitado por diferentes causas, por ejemplo, una identificación inadecuada de los agentes de control biológico, lo que ocasiona problemas de reproducibilidad.

Sería, por tanto, conveniente, desarrollar un método basado en el control biológico de *E. pinguis* Haw que satisfaga la totalidad o parte de los requisitos previamente mencionados.

5 **COMPENDIO DE LA INVENCION**

Los inventores de la presente invención han encontrado que un hongo entomopatógeno de la especie *Beauveria bassiana* (Ascomycota; Hypocreales) es capaz de reducir el número de larvas vivas de *E. pinguis* Haw presentes en plantas leñosas atacadas por dicho fitófago, por lo que dicho hongo (*B. bassiana*) puede ser utilizado
 10 como agente de control biológico para proteger a las plantas leñosas frente a *E. pinguis* Haw, constituyendo de este modo una alternativa biológica a los métodos actuales, basados en el empleo de productos químicos, para el control del fitófago y superando, de ese modo, los problemas e inconvenientes que presentan tales métodos.

En concreto, ensayos realizados por los inventores han puesto de manifiesto que
 15 el tratamiento con dicho microorganismo, en particular con la cepa *B. bassiana* EABb 08/04-Ep (CECT 20746), tuvo un efecto significativo sobre el porcentaje de heridas en plantas de olivo que presentaron infestación de larvas de *E. pinguis* Haw así como sobre el porcentaje de heridas que presentaron larvas muertas de dicho fitófago y sobre el porcentaje de heridas que presentaron larvas no encontradas (Ejemplo 2), por lo que
 20 dicho microorganismo constituye una herramienta eficaz para el control biológico de *E. pinguis* Haw, en particular, en plantas leñosas.

Por tanto, en un aspecto, la invención se relaciona con el uso de un microorganismo de la especie *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuil. para el control biológico de *Euzophera pinguis* Haw.

25 En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de un microorganismo de la especie *B. bassiana* para la protección de una planta leñosa frente a *E. pinguis* Haw.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para proteger una planta leñosa frente a *E. pinguis* Haw, que comprende aplicar una cantidad eficaz de un microorganismo de la especie *B. bassiana* a dicha planta leñosa o una parte de la
 30 misma. En una realización particular, dicho microorganismo de la especie *B. bassiana* es *B. bassiana* EABb 08/04-Ep (CECT 20746), o un mutante del mismo que mantiene la capacidad de proteger a una planta leñosa frente a *E. pinguis* Haw.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para el tratamiento de la infestación causada por *E. pinguis* Haw en una planta leñosa que comprende aplicar una cantidad eficaz de un microorganismo de la especie *B. bassiana* a los huevos y a las larvas de *E. pinguis* Haw presentes en dicha planta leñosa.

5 En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para reducir la población larvaria de *E. pinguis* Haw que comprende poner en contacto una población de larvas de *E. pinguis* Haw con una cantidad eficaz de un microorganismo de la especie *B. bassiana*.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un microorganismo de la especie
10 *B. bassiana* cepa EABb 08/04-Ep depositado en la Colección Española de Cultivos tipo (CECT) con número de acceso 20746, con capacidad de proteger a una planta leñosa frente a *E. pinguis* Haw, o un mutante de dicho microorganismo que mantiene dicha capacidad de proteger a una planta leñosa frente a *E. pinguis* Haw.

Aspectos adicionales de la presente invención lo constituyen un cultivo
15 biológicamente puro de dicho microorganismo, una conidia de dicho microorganismo y una composición agrícola que comprende dicho microorganismo, o dicho cultivo biológicamente puro, o dicha conidia, y un vehículo agrícolamente aceptable.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

20 Microorganismo de la invención

Como se ha mencionado previamente, el insecto fitófago *E. pinguis* Haw causa daños de importancia económica en plantas leñosas, especialmente en olivos jóvenes, en donde llega a producir la muerte de plantas completas. Ahora se ha aislado un microorganismo de la especie *B. bassiana*, más concretamente la cepa de *B. bassiana*
25 EABb 08/04-Ep, que, sorprendentemente, protege a las plantas leñosas del ataque de dicho fitófago, por lo que puede ser utilizado en el control biológico de las plagas producidas por *E. pinguis* Haw. Un cultivo de dicha cepa *B. bassiana* EABb 08/04-Ep ha sido depositado en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) asignándosele el número de acceso CECT 20746.

30 Por tanto, en un aspecto, la invención se relaciona con un microorganismo, en adelante microorganismo de la invención, de la especie *B. bassiana* cepa EABb 08/04-Ep depositado en la CECT con número de acceso CECT 20746, con capacidad de

proteger a una planta leñosa frente a *E. pinguis* Haw, o un mutante de dicho microorganismo que mantiene dicha capacidad de proteger a una planta leñosa frente a *E. pinguis* Haw.

La cepa de *B. bassiana* EABb 08/04-Ep (CECT 20746) ha sido aislada a partir
5 de una larva de *E. pinguis* Haw muerta que presentaba los síntomas característicos asociados con la infección por ascomicetos mitospóricos entomopatógenos, mediante el procedimiento descrito en el Ejemplo 1.

La expresión “capacidad de proteger a una planta leñosa frente a *E. pinguis*
Haw”, tal como aquí se utiliza, significa que el microorganismo, o un mutante del
10 mismo, es capaz de prevenir, reducir, atenuar y/o eliminar en una planta leñosa los síntomas provocados por el fitófago *E. pinguis* Haw. Entre los síntomas manifestados por una planta leñosa infestada por *E. pinguis* Haw se encuentran el decaimiento de la planta por falta de alimento en las partes de la planta afectadas (e.g., ramas, tronco, etc.), el amarilleamiento de las partes afectadas, y la pérdida de vigorosidad y
15 productividad, para terminar, finalmente, con el secado completo del tronco y/o las ramas. Aunque no se desea estar vinculado por ninguna teoría, se cree que *B. bassiana* ejerce su acción por su efecto ovicida y larvicida, evitando de ese modo que *E. pinguis* Haw se desarrolle dentro de la planta leñosa y excave galerías a lo largo del tronco.

La capacidad de un microorganismo de proteger a una planta leñosa frente a *E.*
20 *pinguis* Haw puede ser evaluada mediante un ensayo que comprende aplicar dicho microorganismo sobre heridas practicadas en el tronco o ramas de una planta leñosa e infestadas, de forma natural o artificial, con *E. pinguis* Haw y determinar la presencia o ausencia de larvas de *E. pinguis* Haw, vivas o muertas en dichas heridas, tal como se describe en el Ejemplo 2.

El término “mutante”, tal como aquí se utiliza, incluye cualquier
25 microorganismo resultante de una mutación o cambio en el ADN de un gen en un microorganismo que da como resultado un carácter (fenotipo) que no se encuentra en el tipo salvaje (“wild-type”). De acuerdo con la presente invención, el mutante de la cepa *B. bassiana* EABb 08/04-Ep (CECT 20746) mantiene la capacidad de proteger a una
30 planta frente al ataque de un fitófago de la especie *E. pinguis* Haw. Por lo tanto, el microorganismo de la invención no sólo comprende la cepa aislada de *B. bassiana* cepa EABb 08/04-Ep (CECT 20746) sino cualquier mutante de dicho microorganismo que

mantiene la capacidad de proteger a una planta leñosa frente a *E. pinguis* Haw, tal como se ha definido previamente.

5 El microorganismo de la invención puede encontrarse aislado en un cultivo microbiológicamente puro, en donde todos los microorganismos presentes en el cultivo pertenecen a la misma cepa, es decir, a la cepa *B. bassiana* cepa EABb 08/04-Ep (CECT 20746) o bien a un mismo mutante de dicho microorganismo que mantiene dicha capacidad de proteger a una planta leñosa frente a *E. pinguis* Haw. Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con un cultivo microbiológicamente puro del microorganismo de la invención.

10 El microorganismo de la invención es un hongo que, en cultivo, crece como un moho blanquecino y produce conidias o esporas en forma de esferas blancas, haploides e hidrofóbicas; dichas conidias constituyen un aspecto adicional de la presente invención. Por tanto, en este contexto, el microorganismo de la invención puede presentarse en forma de conidias o esporas, o en otras formas tales como blastosporas o
15 conidias sumergidas.

El microorganismo de la invención, así como un cultivo microbiológicamente puro de un microorganismo de la invención y las conidias de dicho microorganismo de la invención, pueden ser utilizados, entre otras aplicaciones, en el control biológico de *E. pinguis* Haw, en particular, en el control biológico de dicho insecto fitófago en
20 plantas leñosas, o bien para proteger plantas leñosas frente a *E. pinguis* Haw, o bien para tratar una infestación causada por *E. pinguis* Haw en plantas leñosas o bien para reducir la población larvaria de *E. pinguis* Haw, tal como se describirá con mayor detalle mas adelante

En general, para su aplicación sobre una planta leñosa, tanto el microorganismo
25 de la invención, como el cultivo biológicamente puro o la conidia anteriormente mencionados, pueden encontrarse formando parte de una composición agrícola junto con un vehículo agrícolamente aceptable. Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con una composición, en adelante composición de la invención, que comprende un microorganismo de la invención, un cultivo microbiológicamente puro de
30 un microorganismo de la invención o una conidia de un microorganismo de la invención, y un vehículo agrícolamente aceptable. En una realización particular, dicha composición de la invención puede contener, además de un microorganismo de la

invención, uno o más microorganismos diferentes al microorganismo de la invención (e.g., pertenecientes a especies diferentes, etc.).

La concentración de microorganismo de la invención en la composición agrícola proporcionada por esta invención puede variar dentro de un amplio intervalo; no obstante, en una realización particular se utiliza una suspensión de conidias que comprende desde, al menos, 10^5 conidias/ml hasta 10^9 conidias/ml, típicamente alrededor de 10^8 conidias/ml, aunque dependerá en gran medida del tipo de aplicación a la que vaya destinada. La concentración de la suspensión fúngica puede determinarse por métodos convencionales, por ejemplo, mediante el empleo de un hemocitómetro tal como la cámara Thoma o Malassez.

Características técnicas adicionales de dicha composición agrícola, por ejemplo, los vehículos agrícolamente aceptables que pueden utilizarse, los componentes adicionales que puede incorporar, su forma de presentación, su procedimiento de obtención, etc., se describirán más adelante de forma detallada.

15

Uso de *B. bassiana* para el control biológico de *E. pinguis* Haw

Como se ha mencionado previamente, la presente invención se basa en el descubrimiento de que un microorganismo de la especie *B. bassiana*, en particular, la cepa *B. bassiana* EABb 08/04-Ep (CECT 20746), tiene la capacidad de proteger a las plantas leñosas frente a *E. pinguis* Haw, por lo que dicho microorganismo puede ser utilizado agente de control biológico de las plagas producidas por dicho fitófago.

20

Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de un microorganismo de la especie *B. bassiana* para el control biológico de *E. pinguis* Haw. Expresado de otro modo, según este aspecto, la invención se relaciona con un método para el control biológico de *E. pinguis* Haw que comprende poner en contacto dicho *E. pinguis* Haw con un microorganismo de la especie *B. bassiana*. En una realización particular, dicho microorganismo de la especie *B. bassiana* es *B. bassiana* EABb 08/04-Ep (CECT 20746), o un mutante del mismo que mantiene la capacidad de proteger a una planta leñosa frente a *E. pinguis* Haw.

25

En general, para los fines de la presente invención dicho microorganismo de la especie *B. bassiana* puede encontrarse en forma de conidias o en otras formas tales como blastosporas o conidias sumergidas.

30

El término “control biológico” tal como aquí se utiliza, se refiere al empleo de (micro)organismos vivos (e.g., en la presente invención, *B. bassiana*) con objeto de controlar la población de un insecto fitófago (e.g, en la presente invención, *E. pinguis* Haw), es decir, controlar su desarrollo, reproducción, número de individuos, etc., bien de forma directa (por acción de los (micro)organismos utilizados como agentes de control biológico) o indirecta (como resultado de los compuestos producidos por dichos (micro)organismos).

Diversos ensayos realizados por los inventores han puesto de manifiesto que el microorganismo de la especie *B. bassiana* es capaz de controlar biológicamente al fitófago *E. pinguis* Haw en plantas leñosas, y, de este modo, proteger a dicha planta leñosa frente al ataque de *E. pinguis* Haw (Ejemplo 2). Parece, aunque no se desea estar vinculado a ninguna hipótesis, que dicho microorganismo de la especie *B. bassiana* tiene efecto ovidica y larvicida, evitando de ese modo que *E. pinguis* Haw se desarrolle dentro de la planta leñosa y excave galerías a lo largo del tronco.

Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de un microorganismo de la especie *B. bassiana* para la protección de una planta leñosa frente a *E. pinguis* Haw, o, expresado de otro modo, con un método para proteger una planta leñosa frente a *E. pinguis* Haw, que comprende aplicar una cantidad eficaz de un microorganismo de la especie *B. bassiana* a dicha planta leñosa o una parte de la misma.

En una realización particular, dicho microorganismo de la especie *B. bassiana* es *B. bassiana* EABb 08/04-Ep (CECT 20746), o un mutante del mismo que mantiene la capacidad de proteger a una planta leñosa frente a *E. pinguis* Haw.

Como se ha mencionado previamente, dicho microorganismo de la especie *B. bassiana* puede encontrarse en forma de conidias o en otras formas tales como blastosporas o conidias sumergidas.

La aplicación de dicho microorganismo de la especie *B. bassiana* sobre las plantas leñosas protege, como consecuencia directa o indirecta de dicho microorganismo, tanto a plantas leñosas infestadas con *E. pinguis* Haw, mediante la reducción, atenuación o eliminación de los síntomas provocados por *E. pinguis* Haw, como a plantas leñosas no infestadas por dicho fitófago, haciéndolas más resistentes a *E. pinguis* Haw.

Tal como se utiliza en la presente invención, se entiende por “planta leñosa” cualquier planta vascular con un tallo perenne, por encima de la superficie del suelo, y cubierto de una capa de espesa corteza.

Aunque el microorganismo de la especie *B. bassiana* puede aplicarse sobre cualquier planta leñosa con fines preventivos frente a *E. pinguis* Haw, en una
 5 realización particular, la planta leñosa sobre la que se aplica dicho microorganismo de *B. bassiana* es una planta leñosa que presenta una o más heridas, típicamente, en la corteza, por ejemplo, en tronco, ramas, etc., pues en dicha situación es especialmente susceptible de ser infestada por *E. pinguis* Haw.

En el contexto de la presente invención, se entiende por “herida” cualquier
 10 lesión que se produce en la superficie de una planta, e.g., tronco, ramas, etc., de una planta, generalmente causada por daños mecánicos, que deja a la planta expuesta al ataque de agentes fitopatógenos (e.g., hongos, insectos, bacterias, virus, etc.); entre dichos daños mecánicos se encuentran, a modo ilustrativo no limitativo, los daños
 15 causados por la poda, el paso de ganado, los fenómenos atmosféricos (heladas, granizo, viento, tormentas, etc.), etc., y, en general, cualquier acción que pueda provocar la pérdida de la corteza protectora de una planta leñosa.

Aunque, en principio, cualquier planta leñosa puede ser tratada con el microorganismo de la especie *B. bassiana* para protegerla frente a *E. pinguis* Haw, en
 20 una realización particular, dicha planta leñosa es una planta leñosa susceptible de ser infestada por dicho fitófago. Como es conocido, el lepidóptero *E. pinguis* Haw ataca principalmente a especies de la familia *Oleaceae*, entre las que se encuentran especies del género *Abeliophyllum* sp., *Chionanthus* sp., *Comoranthus* sp., *Fontanesia* sp., *Forestiera* sp., *Forsythia* sp., *Fraxinus* sp., *Haenianthus* sp., *Hesperelaea* sp., *Jasminum*
 25 sp., *Ligustrum* sp., *Linociera* sp., *Menodora* sp., *Myxopyrum* sp., *Nestegis* sp., *Noronhia* sp., *Notelaea* sp., *Nyctanthes* sp., *Olea* sp., *Osmanthus* sp., *Phyllyrea* sp., *Picconia* sp., *Schrebera* sp., *Syringa* sp. y *Tessarandra* sp.; no obstante, dicho fitófago ataca de forma más específica a especies de plantas leñosas del género *Fraxinus* sp., e.g., el fresno, y del género *Olea* sp., e.g., el olivo (*O. europea*). Por lo tanto, en una realización
 30 particular, la planta leñosa es una planta leñosa que pertenece a la familia *Oleaceae*, preferiblemente al género *Olea* sp. o al género *Fraxinus* sp., más preferiblemente a la especie *O. europea* (olivo).

El método para proteger una planta leñosa frente a *E. pinguis* Haw previamente descrito comprende la aplicación de dicho microorganismo de la especie *B. bassiana*, en una cantidad eficaz, a dicha planta leñosa o una parte de la misma.

En el sentido utilizado en esta descripción, el término “cantidad eficaz” se refiere a la cantidad necesaria para paliar, mejorar, estabilizar, impedir, retardar o retrasar la progresión de estadios de desarrollo del agente fitófago en cuestión en la planta y obtener, de este modo, unos resultados beneficiosos o deseados. Dicha cantidad eficaz puede aplicarse en una única administración o en varias administraciones. Aunque la cantidad eficaz de microorganismo de la especie *B. bassiana* que puede aplicarse sobre la planta leñosa para protegerla de *E. pinguis* Haw puede variar dentro de un amplio intervalo, en una realización particular, dicha cantidad eficaz está comprendida desde, al menos, 10^5 conidas/ml hasta 10^9 conidas/ml, típicamente alrededor de 10^8 conidas/ml, aunque dependerá en gran medida del tipo de aplicación a la que vaya destinada.

El microorganismo de la especie *B. bassiana* a aplicar a la planta leñosa a tratar puede aplicarse bien sobre la totalidad de la planta leñosa, o, alternativamente, sobre algunas partes de dicha planta leñosa; en general, se aplica sobre la superficie de la corteza de la planta leñosa, preferentemente sobre el tronco y/o las ramas de dicha planta leñosa, más preferentemente, sobre las heridas presentes en el tronco y/o ramas de la planta leñosa ya que esa suele ser la vía de entrada más habitual de *E. pinguis* Haw en una planta leñosa para infestarla.

El microorganismo de la especie *B. bassiana* puede aplicarse a la planta leñosa a tratar por cualquier técnica o método adecuado, utilizando los aparatos, equipos y dispositivos apropiados. El experto en la materia conoce las técnicas y métodos, así como los aparatos, equipos y dispositivos apropiados, para la aplicación de agentes de control biológico sobre una planta leñosa. En una realización particular, el microorganismo de la especie *B. bassiana* se formula en forma de una composición agrícola adecuada para su administración a una planta leñosa por cualquier técnica o método convencional y utilizando cualquier dispositivo convencional, por ejemplo, por pulverización, espolvoreo, o por cualquier otro método de administración agrícola apropiado, e.g., mediante el método denominado “mastic” o “pintura insecticida” mediante el cual, la composición agrícola a aplicar se aplica sobre la superficie de la

planta a tratar mediante el empleo de un dispositivo apropiado, por ejemplo, una brocha (e.g., una brocha de pintor).

Por tanto, para su empleo en los fines de la presente invención, se proporciona una composición agrícola que comprende un microorganismo de la especie *B. bassiana* y un vehículo agrícolamente aceptable; dicha composición agrícola puede ser utilizada para proteger a las plantas leñosas frente a *E. pinguis* Haw. El empleo de dicha composición agrícola que comprende un microorganismo de la especie *B. bassiana* junto con un vehículo agrícolamente aceptable para proteger una planta leñosa frente a *E. pinguis* Haw constituye un aspecto adicional de la presente invención. Dicho microorganismo de la especie *B. bassiana* puede encontrarse en forma de conidias o en otras formas tales como blastosporas o conidias sumergidas.

La composición agrícola proporcionada por esta invención puede contener una población de microorganismos de una única especie, es decir de la especie *B. bassiana*, o, alternativamente, además, de dicho microorganismo de la especie *B. bassiana*, puede contener microorganismos pertenecientes a otras especies diferentes a *B. bassiana* (e.g., microorganismos pertenecientes a especies diferentes del género *Beauveria*, o especies pertenecientes a otros géneros, por ejemplo, especies de otros hongos entomopatógenos tales como *Metarhizium anisopliae* (Metch.) Sorok, etc.).

En una realización particular, el microorganismo de la especie *B. bassiana* presente en dicha composición agrícola es *B. bassiana* EABb 08/04-Ep (CECT 20746), o un mutante del mismo que mantiene la capacidad de proteger a una planta leñosa frente a *E. pinguis* Haw.

En el sentido utilizado en esta descripción, el término “vehículo agrícolamente aceptable” incluye cualquier sustancia o combinación de sustancias que puede ser utilizada en el sector agrícola, e incluye cualquier material líquido o sólido agrícolamente aceptable que pueda añadirse y/o mezclarse con el microorganismo de la especie *B. bassiana*, 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 agrícola, (microorganismo de la especie *B. bassiana*), dicho vehículo agrícolamente aceptable tiene que permitir, o no perjudicar ni comprometer, la viabilidad de dicho microorganismo.

La concentración de microorganismo de la especie *B. bassiana* en dicha composición agrícola puede variar dentro de un amplio intervalo; no obstante, en una realización particular se utiliza una suspensión de conidias que comprende desde, al menos, 10^5 conidas/ml hasta 10^9 conidas/ml, típicamente alrededor de 10^8 conidas/ml, aunque dependerá en gran medida del tipo de aplicación a la que vaya destinada.

La composición agrícola proporcionada por esta invención, que comprende un microorganismo de la especie *B. bassiana* y un vehículo agrícola aceptable, puede utilizarse 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 o bien en forma de una suspensión. Dichas composiciones pueden obtenerse de manera tradicional, por ejemplo, mezclando dicho microorganismo con un diluyente y opcionalmente con otros ingredientes de la formulación, conocidos por los expertos en la materia. En una realización particular, la composición agrícola proporcionada por esta invención se formula en forma de una suspensión concentrada que contiene agua (89,9% p/p), mojante (jabón potasio 0,1% p/p) y conidias de un microorganismo de la especie *B. bassiana* (10% p/p), mientras que, en otra realización particular, la composición agrícola proporcionada por esta invención se formula en forma de un polvo humectable que contiene caolín (89,9% p/p), talco (0,1% p/p) y conidias de un microorganismo de la especie *B. bassiana* (10% p/p).

La composición agrícola proporcionada por esta invención puede contener, si se desea, además, otros ingredientes o constituyentes empleados habitualmente en las composiciones agrícolas, tales como, pero no limitados a, solventes, agentes activos o reguladores de pH, fertilizantes, etc., siempre y cuando todos ellos permitan o no perjudiquen ni comprometan la viabilidad del microorganismo presente en la composición agrícola. Dichos ingredientes o constituyentes empleados habitualmente en las composiciones agrícolas son, en general, conocidos por los expertos en la materia.

La composición agrícola proporcionada por esta invención puede obtenerse por métodos convencionales basados, generalmente, en la mezcla de los distintos componentes de la composición agrícola en las cantidades apropiadas.

Además, para su aplicación sobre la planta leñosa, la composición agrícola proporcionada por esta invención puede formularse de manera que resulte apta para su administración por cualquier técnica o método convencional, por ejemplo,

pulverización, espolvoreo, mastic (pintura insecticida), etc. Para ello se elegirán los vehículos agrícolamente aceptables adecuados para formular dicha composición agrícola en la forma de aplicación elegida. El experto en la materia conoce los vehículos agrícolamente aceptables que se deben elegir para formular una composición agrícola en una determinada forma de aplicación (e.g., polvo humectable, concentrado emulsionable, suspensión, etc.).

Como se ha mencionado previamente parece que *B. bassiana* ejerce su acción protectora de las plantas leñosas por su efecto larvicida y ovicida frente a *E. pinguis* Haw.

Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con un método para el tratamiento de la infestación causada por *E. pinguis* Haw en una planta leñosa que comprende aplicar una cantidad eficaz de un microorganismo de la especie *B. bassiana* a los huevos y a las larvas de *E. pinguis* Haw presentes en dicha planta leñosa. Dicho microorganismo de la especie *B. bassiana* puede encontrarse en forma de conidias o en formas tales como blastosporas o conidias sumergidas.

El microorganismo de la especie *B. bassiana* puede ser aplicado a los huevos y larvas de *E. pinguis* Haw presentes en la planta leñosa a tratar, por ejemplo, en las heridas o en sus proximidades, o en el floema de la planta leñosa, etc., por métodos convencionales, tal como se ha descrito previamente en relación con el método para proteger una planta leñosa frente a *E. pinguis* Haw. Las características de las plantas leñosas susceptibles de ser infestadas por el fitófago *E. pinguis* Haw también han sido mencionadas previamente en relación con dicho método para proteger una planta leñosa frente a *E. pinguis* Haw.

En una realización particular, dicho microorganismo de la especie *B. bassiana* es *B. bassiana* EABb 08/04-Ep (CECT 20746), o un mutante del mismo que mantiene la capacidad de proteger a una planta leñosa frente a *E. pinguis* Haw.

En una realización particular, dicha planta leñosa es una planta leñosa pertenecientes a la familia *Oleaceae*, preferentemente al género *Olea* o *Fraxinus*; más preferentemente, dicha planta leñosa es una planta de olivo (*O. europea*).

En otra realización particular, la aplicación del microorganismo de la especie *B. bassiana* se realiza mediante pulverización o pintura insecticida.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para reducir la población larvaria de *E. pinguis* Haw que comprende poner en contacto una población de larvas de *E. pinguis* Haw con una cantidad eficaz de un microorganismo de la especie *B. bassiana*. Dicho microorganismo de la especie *B. bassiana* puede encontrarse en forma de conidias o en otras formas tales como blastosporas o conidias sumergidas.

En una realización particular, dicho microorganismo de la especie *B. bassiana* es *B. bassiana* EABb 08/04-Ep (CECT 20746), o un mutante del mismo que mantiene la capacidad de proteger a una planta leñosa frente a *E. pinguis* Haw.

El microorganismo de la especie *B. bassiana* puede ser aplicado a las larvas de *E. pinguis* Haw por cualquier método convencional que posibilite el contacto entre dichas larvas y *B. bassiana*.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención y no deben ser considerados como limitativos del alcance de la presente invención.

15

EJEMPLO 1

Aislamiento y caracterización de una cepa de *B. bassiana* virulenta frente a larvas de *E. pinguis* Haw

En el año 2008, en una prospección de las poblaciones naturales del lepidóptero *E. pinguis* Haw en la provincia de Jaén (España) dirigida a la búsqueda de sus enemigos naturales, se obtuvo, a partir de unas larvas de *E. pinguis* Haw muertas, un aislado de un hongo que resultó ser del ascomiceto mitospórico entomopatógeno *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., que mostró una gran virulencia frente a dichas larvas de *E. pinguis* Haw en laboratorio. Tras comprobar los postulados de Koch, se obtuvo una Concentración Letal Media (CL₅₀) de $1,5 \times 10^7$ conidias/ml en larvas de tercera edad. La cepa de *B. bassiana* aislada tal como se describe a continuación fue identificada como *B. bassiana* EABb 08/04-Ep y ha sido depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT).

Brevemente, dicha cepa de *B. bassiana* EABb 08/04-Ep fue aislada a partir de una larva de *E. pinguis* Haw muerta que presentaba los síntomas característicos asociados con la infección por ascomicetos mitospóricos entomopatógenos, tales como aparición de zonas melanizadas en la cutícula y fosilización del cadáver. Dicha larva fue desinfectada superficialmente y colocada en una cámara húmeda, con condiciones de

30

100% de humedad relativa para promover la etapa de crecimiento saprotrofo del hongo y posterior esporulación en el exterior de la larva. Posteriormente, se procedió a aislar el hongo en medio de malta-agar, a partir de un inóculo del exterior de la larva, para promover su crecimiento y desarrollo en la placa, con el fin de identificarlos mediante observación en el microscopio de las estructuras de las características típicas que forman cada tipo de hongos. El microorganismo así aislado fue caracterizado como un hongo perteneciente a la especie *B. bassiana* y la cepa aislada fue identificada como EABb 08/04-Ep y depositada en la CECT el 27 de noviembre de 2008 con el número de acceso CECT 20746.

10

EJEMPLO 2

Protección de un olivar frente al ataque de *E. pinguis* Haw mediante aplicación de la cepa *B. bassiana* EABb 08/04-Ep a heridas en el tronco

15

1. Materiales y Métodos

1.1 Preparación del inóculo fúngico

Se obtuvo un inóculo de la cepa de *B. bassiana* EABb 08/04-Ep (CECT 20746) 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 (10^8 conidias/ml) de *B. bassiana* EABb 08/04-Ep (CECT 20746), 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. La concentración de la suspensión de conidias usada para el ensayo se ajustó diluyendo las conidias en Tween® 80 (Polisorbato 80) al 0,01% hasta una concentración final de $4,1 \times 10^7$ conidias/ml.

30

1.2 Finca

La finca donde se realizó el estudio se encuentra situada en el término municipal de Mancha Real (Jaén) (37° 56.176" N, 003° 36.709" W), a 303 metros de altitud. El experimento se ha realizado durante los años 2008 y 2009, con 2 tratamientos por año, uno en primavera (abril) y otro en otoño (septiembre). Los tratamientos realizados

5 fueron los siguientes:

- Primavera 2008: Testigo, Clorpirifos, WP Beauveria;
- Otoño 2008: Testigo, Clorpirifos, WP Beauveria;
- Primavera 2009: Testigo, Clorpirifos, WP Beauveria, Mastic Beauveria; y
- Otoño 2009: Testigo, Clorpirifos, WP Beauveria, Mastic Beauveria.

10 Testigo: Excipiente, esto es, solución acuosa de Tween® al 0,01%

Clorpirifos: Control positivo - Clorpirifos (Warrior®), aplicado a la dosis 400 cm³/hl.

WP Beauveria: *B. bassiana* EABb 08/04-Ep (CECT 20746), aplicada mediante pulverización 200 g/hl a una dosis de 10⁸ conidias/ml.

15 Mastic Beauveria: *B. bassiana* EABb 08/04-Ep (CECT 20746), aplicada mediante brocha a una dosis de 10⁹ conidias/ml.

Para cada tratamiento se utilizaron 60 olivos (3x20) en el año 2008 y 80 olivos (4x20) en el 2009, distribuidos al azar para cada tratamiento, en una superficie total de unas 20 hectáreas. Para conocer la evolución de la población del fitófago se dispusieron

20 dos polilleros tipo Funnel por hectárea.

1.3 Tratamiento de campo a heridas en troncos de olivo y evaluación de la eficacia

En cada olivo se practicaron heridas cuadradas de aproximadamente 3 cm de lado en los troncos con el fin de estimular la puesta del lepidóptero *E. pinguis* Haw. Una vez realizadas las heridas, éstas fueron tratadas bien con el excipiente [tratamiento testigo] o bien con *B. bassiana* EABb 08/04-Ep (CECT 20746) En relación con este tratamiento, en el año 2008, se aplicó una suspensión de *B. bassiana* EABb 08/04-Ep (CECT 20746), a una concentración de 1,0x10⁸ conidas./ml, mediante pulverización [tratamiento WP Beauveria] sobre las heridas, pero en el 2009, además de dicho

25

30 tratamiento por pulverización [tratamiento WP Beauveria], se aplicó otro tratamiento con el producto [suspensión de *B. bassiana* EABb 08/04-Ep (CECT 20746)] más concentrado 1,0x10⁹ conidas/ml y aplicado con una brocha de pintor sobre las heridas

[tratamiento Mastic Beauveria]. En todos los casos se utilizó como control positivo Clorpirifos [tratamiento Clorpirifos] a la dosis recomendada por el fabricante (única materia activa actualmente autorizada para el control de *E. pinguis* Haw). Una vez realizados los tratamientos, se evaluó el experimento durante 2 meses, con el fin de
5 disponer al final del mismo de los siguientes datos:

- (1) número de heridas infestadas sin larva presente;
- (2) número de heridas infestadas con larva presente, bien viva o muerta; y
- (3) número de heridas no infestadas.

10 1.4 Evaluación de la presencia de *B. bassiana* en las heridas al final del experimento

Para investigar la presencia (o ausencia) de larvas de *E. pinguis* Haw, vivas o muertas, a partir de otoño de 2008, se tomaron, en el momento de abrir las heridas, varios trozos de corteza que se conservaron en bolsas de plástico hasta su traslado al laboratorio. Además, la superficie de cada herida fue “limpiada” con un bastoncillo de
15 algodón estéril, que también fue transportado al laboratorio. Mediante el empleo de medio de cultivo Agar de Sabouraud + cloranfenicol, se estudió la presencia o ausencia de *B. bassiana* EABb 08/04-Ep (CECT 20746) tanto en los trozos de corteza como en los bastoncillos.

20 **2. Resultados**

2.1 Evolución de la población de *E. pinguis* en la zona de estudio

Estudios realizados por los inventores confirmaron la existencia de 2 vuelos o picos poblacionales del agente fitófago *E. pinguis* Haw durante 1 año, uno de los picos, el mayor, en primavera y el otro, menor, en otoño (datos no mostrados), tal y como
25 indica la literatura existente (Alvarado, M; Civantos, M., y Durán, J. M. 2008. Plagas. En “El cultivo del olivo”, 6ª Edición. Coed. Mundi-Prensa, Consejería de Agricultura y Pesca de la Junta de Andalucía. Madrid. pp: 409-593).

30 2.2 Experimento de primavera de 2008

El tipo de tratamiento tuvo un efecto significativo sobre el porcentaje de heridas que presentaron infestación larvaria ($F_{2,8}=4,88$; $P=0,05$) [“F” es el símbolo de F de

Snedecor que es el test estadístico que se aplica para ver la variación de las fuentes de varianza en el análisis de varianza (los dígitos indican los grados de libertad de las fuentes de variación (en este caso, el tratamiento); “P” es la probabilidad de error, que se establece, en general, en el 5%). El tratamiento con Clorpirifos (tratamiento
 5 Cloripirifos) redujo significativamente, con respecto al tratamiento testigo el porcentaje de infestación de heridas, mientras que no existieron diferencias significativas entre el tratamiento Clorpirifos y el tratamiento WP Beauveria [*B. bassiana* EABb 08/04-Ep (CECT 20746) - pulverización], tal como se observa en la Tabla 1.

10

Tabla 1
Infestación de heridas de troncos de olivo por *E. pinguis*
Haw en tratamientos con Clorpirifos y *B. bassiana* en
primavera de 2008

Tratamiento	Porcentaje de infestación de heridas (media ± error estándar)*
Testigo	63,3 ± 7,2 a
Clorpirifos	22,3 ± 8,4 b
WP Beauveria	41,6 ± 11,6 ab

15

* Valores seguidos de la misma letra en cada columna indican que no existieron diferencias significativas en un test LSD ($\alpha=0,05$) [LSD es un test de comparación de medias]

2.3 Experimento de otoño de 2008

20

El tipo de tratamiento tuvo un efecto significativo sobre el porcentaje de heridas que presentaron infestación larvaria ($F_{2,8}=16,77$; $P=0,0035$), observándose una reducción significativa con respecto al tratamiento testigo cuando se aplicaron los tratamientos Clorpirifos y WP Beauveria, aunque no hubo diferencias apreciables entre estos, tal como se muestra en la Tabla 2.

25

Tabla 2
Infestación de heridas de troncos de olivo por *E. pinguis* en
tratamientos con Clorpirifos y *B. bassiana* en otoño de 2008

5	Tratamiento	Porcentaje de infestación de heridas (media \pm error estándar)*
	Testigo	43,3 \pm 1,6 a
	Clorpirifos	26,7 \pm 4,4 b
	WP Beauveria	26,7 \pm 1,6 b

* Valores seguidos de la misma letra en cada columna indican que no existieron diferencias significativas en un test LSD ($\alpha=0,05$)

10 Por otra parte, a los 2 meses de iniciado el experimento, en el momento de abrir las heridas, se detectó la presencia de *B. bassiana* en el 100% de los bastoncillos, es decir, en todos los árboles tratados, y en el 60% de las heridas (según la técnica de los trozos de corteza).

15 2.4 Experimento de primavera de 2009

El tipo de tratamiento tuvo un efecto significativo sobre:

- 1) el porcentaje de heridas que presentaron infestación larvaria ($F_{3,11}=10,29$; $P=0,004$);
- 2) el porcentaje de heridas que presentaron larvas muertas ($F_{3,11}=9,84$; $P=0,0046$); y
- 20 3) el porcentaje de heridas que presentaron larvas no encontradas ($F_{3,11}=3,86$; $P=0,05$).

El menor porcentaje de heridas infestadas se observó en los tratamientos con Clorpirifos, que mejoró significativamente al tratamiento WP Beauveria [*B. bassiana* 25 EABb 08/04-Ep (CECT 20746) – pulverización] pero no el tratamiento Mastic Beauveria [*B. bassiana* EABb 08/04-Ep (CECT 20746) - brocha]. Además, el mayor porcentaje de heridas con larvas muertas se encontró en el tratamiento Mastic Beauveria.

Tabla 3
Infestación de heridas de troncos de olivo por *E. pinguis* en tratamientos con Clorpirifos y *B. bassiana* en primavera de 2009

Tratamiento	% infestación total de heridas (media ± EE)*	% heridas con larvas muertas (media ± EE)	% heridas con larvas no encontradas (media ± EE)
Testigo	88,3 ± 3,37 a	0 a	0
Clorpirifos	10,3 ± 2,6 c	0 a	10,3 ± 2,6
Mastic Beauveria	40,0 ± 12,5 bc	20,0 ± 7,6 b	18,3 ± 9,3
WP Beauveria	58,3 ± 16,4 ab	3,3 ± 1,6 a	22,4 ± 7,2

5 * Valores seguidos de la misma letra en cada columna indican que no existieron diferencias significativas en un test LSD ($\alpha=0,05$)

A los 2 meses de iniciado el experimento, en el momento de abrir las heridas, se detectó la presencia de *B. bassiana* en el 60% de los árboles tratados, tanto por el
 10 método de los bastoncillos de algodón como por el de los trozos de corteza.

2.5 Experimento de otoño de 2009

Este experimento ha estado claramente marcado por el anómalo período de lluvias ocurrido en la región jienense durante los meses de noviembre, diciembre y
 15 enero. La población del agente fitófago *E. pinguis* Haw ha sido más baja, y esto se ha extendido a la evaluación de los productos.

El tipo de tratamiento tuvo un efecto significativo sobre el porcentaje de heridas que presentaron infestación larvaria ($F_{3,11}=11,38$; $P=0,003$), y sobre el porcentaje de heridas que presentaron larvas no encontradas ($F_{3,11}=9,55$; $P=0,005$). El menor
 20 porcentaje de heridas infestadas se observó en el tratamiento con Clorpirifos [tratamiento Clorpirifos], que mejoró significativamente al tratamiento Mastic Beauveria [*B. bassiana* EABb 08/04-Ep (CECT 20746) - brocha] pero no al tratamiento WP Beauveria [*B. bassiana* EABb 08/04-Ep (CECT 20746) – pulverización]. Además, el mayor porcentaje de heridas con larvas muertas se encontró en el tratamiento Mastic
 25 Beauveria.

Tabla 4
Infestación de heridas de troncos de olivo por *E. pinguis* Haw en tratamientos con Clorpirifos y *B. bassiana* en otoño de 2009

Tratamiento	% infestación total de heridas (media \pm EE)*	% heridas con larvas muertas (media \pm EE)	% heridas con larvas no encontradas (media \pm EE)
Testigo	41,6 \pm 7,2 a	0a	25,0 \pm 7,6 a
Clorpirifos	0c	0 a	0 b
Mastic Beauveria	23,3 \pm 1,6 b	0 a	18,3 \pm 1,6 a
WP Beauveria	13,3 \pm 7,2 bc	2,0b	1,6 \pm 1,6 b

5 * Valores seguidos de la misma letra en cada columna indican que no existieron diferencias significativas en un test LSD ($\alpha=0,05$)

10 A los 2 meses de iniciado el experimento, en el momento de abrir las heridas, se detectó la presencia de *B. bassiana* en el 40% de los árboles tratados, tanto por el método de los bastoncillos de algodón como por el de los trozos de corteza. El lavado del producto debido a la intensidad de las precipitaciones ha sido superior al de los experimentos anteriores.

3. Conclusiones

15

La cepa EABb 08/04-Ep de *B. bassiana* aplicada a las heridas de poda, granizo etc., constituye una herramienta eficaz para el control biológico de *E. pinguis* Haw en olivar, o para su integración en una estrategia de control integrado, siempre en función de la densidad poblacional de dicho agente fitófago.

20

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de un microorganismo de la especie *Beauveria bassiana* para el control biológico de *Euzophera pinguis* Haw.
2. Uso de un microorganismo de la especie *Beauveria bassiana* para la protección de una planta leñosa frente a *Euzophera pinguis* Haw.
- 10 3. Un método para proteger una planta leñosa frente a *Euzophera pinguis* Haw, que comprende aplicar una cantidad eficaz de un microorganismo de la especie *Beauveria bassiana* a dicha planta leñosa o una parte de la misma.
- 15 4. Método según la reivindicación 3, en el que dicho microorganismo de la especie *B. bassiana* es *B. bassiana* EABb 08/04-Ep (CECT 20746), o un mutante del mismo que mantiene la capacidad de proteger a una planta leñosa frente a *E. pinguis* Haw.
- 20 5. Método según la reivindicación 3 ó 4, en el que dicho microorganismo de la especie *B. bassiana* se encuentra en forma de conidias.
6. Método según la reivindicación 3, en el que dicho microorganismo de la especie *B. bassiana* se aplica sobre una herida presente en dicha planta leñosa.
- 25 7. Método según la reivindicación 3, en el que dicha planta leñosa es una planta leñosa susceptible de ser infestada por *E. pinguis* Haw.
- 30 8. Método según la reivindicación 7, en el que dicha planta leñosa es una planta leñosa perteneciente a la familia *Oleaceae*.

9. Método según la reivindicación 8, en el que dicha planta leñosa es una planta leñosa perteneciente al género *Olea* sp. o al género *Fraxinus* sp.
- 5 10. Método según la reivindicación 9, en el que dicha planta leñosa es una planta de olivo (*O. europea*).
- 10 11. Método según la reivindicación 3, en el que dicho microorganismo de la especie *B. bassiana* se aplica a la planta leñosa en forma de una composición agrícola que comprende, además, un vehículo agrícolamente aceptable.
- 15 12. Un método para el tratamiento de la infestación causada por *Euzophera pinguis* Haw en una planta leñosa que comprende aplicar una cantidad eficaz de un microorganismo de la especie *Beauveria bassiana* a los huevos y a las larvas de *E. pinguis* Haw presentes en dicha planta leñosa.
- 20 13. Método según la reivindicación 12, en el que dicho microorganismo de la especie *B. bassiana* se encuentra en forma de conidias.
- 25 14. Método según la reivindicación 12, en el que dicho microorganismo de la especie *B. bassiana* es *B. bassiana* EABb 08/04-Ep (CECT 20746), o un mutante del mismo que mantiene la capacidad de proteger a una planta leñosa frente a *E. pinguis* Haw.
- 30 15. Método según la reivindicación 12, en el que dicha planta leñosa es una planta leñosa perteneciente a la familia *Oleaceae*, preferentemente, una planta leñosa perteneciente al género *Olea* sp. o al género *Fraxinus* sp., más preferentemente, una planta de olivo (*O. europea*).
16. Un método para reducir la población larvaria de *Euzophera pinguis* Haw que comprende poner en contacto una población de larvas de *E. pinguis* Haw con una cantidad eficaz de un microorganismo de la especie *Beauveria bassiana*.

17. Método según la reivindicación 16, en el que dicho microorganismo de la especie *B. bassiana* es *B. bassiana* EABb 08/04-Ep (CECT 20746), o un mutante del mismo que mantiene la capacidad de proteger a una planta leñosa frente a *E. pinguis* Haw.
- 5
18. Un microorganismo de la especie *Beauveria bassiana* cepa EABb 08/04-Ep depositado en la Colección Española de Cultivos tipo (CECT) con número de acceso 20746, con capacidad de proteger a una planta leñosa frente a *Euzophera pinguis* Haw, o un mutante de dicho microorganismo que mantiene dicha capacidad de proteger a una planta leñosa frente a *E. pinguis* Haw.
- 10
19. Un cultivo biológicamente puro de un microorganismo según la reivindicación 18.
- 15
20. Una conidia de un microorganismo según la reivindicación 18.
21. Una composición agrícola que comprende un microorganismo según la reivindicación 18, un cultivo según la reivindicación 19, o una conidia según la reivindicación 20, y un vehículo agrícolamente aceptable.
- 20



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201030539

②② Fecha de presentación de la solicitud: 14.04.2010

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **A01N63/04** (2006.01)
A01P7/04 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	QUESADA-MORAGA E. et al. Endophytic colonization of opium poppy, <i>Papaver somniferum</i> , by an entomopathogenic <i>Beauveria bassiana</i> strain. Mycopathologia. 2006, Vol. 161, páginas 323-329, todo el documento.	1-21
A	OWNLEY B. H. et al. <i>Beauveria bassiana</i> : endophytic colonization and plant disease control. Journal of Invertebrate Pathology. 15.03.2008, Vol. 98, páginas 267-270, todo el documento.	1-21
A	QUESADA-MORAGA E. et al. Selection of <i>Beauveria bassiana</i> isolates for control of the whiteflies <i>Bemisia tabaci</i> and <i>Trialeurodes vaporariorum</i> on the basis of their virulence, thermal requirements and toxicogenic activity. Biological Control. 29.11.2005, Vol. 36, páginas 274-287, todo el documento.	1-21
A	SERRANO N. et al. <i>Euzophera pinguis</i> Haw: ciclo biológico y control químico en olivar. Revista de Fruticultura. Marzo-Abril/2010, N° 4, todo el documento.	1-21

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 n°:

Fecha de realización del informe
02.02.2012

Examinador
M. Cumbreño Galindo

Página
1/4

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

A01N, A01P

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, MEDLINE, NPL, EMBASE, AGRICOLA, BIOENG, BIOTECHNO, CABA

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 02.02.2012

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-21	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-21	SI
	Reivindicaciones	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	QUESADA-MORAGA E. et al. Mycopathologia. Vol. 161, páginas 323-329	2006
D02	OWNLEY B. H. et al. Journal of Invertebrate Pathology. Vol. 98, páginas 267-270	15.03.2008
D03	QUESADA-MORAGA E. et al. Biological Control. Vol. 36, páginas 274-287	29.11.2005
D04	SERRANO N. et al. Revista de Fruticultura. Nº 4	03.04.2010

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 presente invención tiene por objeto el uso de un microorganismo de la especie *Beauveria bassiana* para el control biológico de *Euzophera pinguis* Haw y un método para proteger una planta leñosa frente a *Euzophera pinguis* Haw o tratar una infestación causada por dicho insecto que comprende aplicar *Beauveria bassiana* EABb 08/04-Ep (CECT 20746) (reivindicaciones de la 1 a la 17). También tiene por objeto un microorganismo de la especie *Beauveria bassiana* cepa EABb 08/04-Ep depositado en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con número de acceso 20746, así como un cultivo biológicamente puro o una conidia del mismo y una composición agrícola que lo comprende (reivindicaciones de la 18 a la 21).

D01 explica el aislamiento del hongo *Beauveria bassiana* cepa EABb 04/01-Tip de la larva de *Timaspis papaveris*, la cual constituye una seria plaga para la adormidera en España, y estudia la colonización fúngica, así como su modo de penetración. Después de la inoculación de conidia con un espray foliar, los métodos microbiológicos demostraron que el 100% de las plantas examinadas eran colonizadas endofíticamente por el hongo y también se observaron en las hojas nuevas y en la envoltura de las semillas. Estos resultados pueden tener implicaciones en el control biológico de *T. papaveris* utilizando *Beauveria bassiana*.

D02 expone que la aplicación de *Beauveria bassiana* a las semillas produce la colonización endofítica de las plántulas del tomate y del algodón y confiere protección contra los patógenos *Rhizoctonia solani* y *Pythium myriotylum*, causantes del marchitamiento fúngico de plántulas y de la pudrición de la raíz. Comprueba que el grado de control de la enfermedad logrado depende de la densidad de población de las conidias de *Beauveria bassiana* en las semillas.

D03 evalúa la infectividad, los requerimientos térmicos y la actividad toxicogénica de 25 aislados del hongo *Beauveria bassiana* con el fin de seleccionar potenciales microinsecticidas para el control de las moscas blancas. En base a su virulencia y requerimientos térmicos, tres aislados resultaron ser buenos candidatos para el control de la mosca blanca en invernadero.

D04 describe el ciclo biológico de *Euzophera pinguis* Haw y su posible control químico.

NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA

Los documentos citados anticipan microorganismos de la especie *Beauveria bassiana* para el control biológico de diferentes plagas como las causadas por *Timaspis papaveris*, *Rhizoctonia solani*, *Pythium myriotylum* o *Bemisia tabaco*, siendo conocido en el estado de la técnica el uso de los hongos entomopatógenos del género *Beauveria* y, más concretamente, de la especie *B. bassiana* con tales fines. Sin embargo, en la documentación y bases de datos consultadas no se ha encontrado ningún documento en el que se haga referencia al uso de la especie *Beauveria bassiana* para el control biológico de *Euzophera pinguis* Haw ni tampoco a la cepa *Beauveria bassiana* EABb 08/04-Ep depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con número de acceso 20746. Por tanto, las reivindicaciones de la 1 a la 21 se pueden considerar nuevas a la vista del estado de la técnica y presentan actividad inventiva.