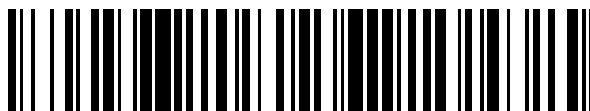


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 574 588**

51 Int. Cl.:

A01N 43/16 (2006.01)

A01N 63/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.02.2008** **E 08718466 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.03.2016** **EP 2113559**

54 Título: **Uso del quitosano para incrementar la esporulación de hongos**

30 Prioridad:

22.02.2007 ES 200700461

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

20.06.2016

73 Titular/es:

UNIVERSIDAD DE ALICANTE (100.0%)
Cr. San Vicente S/N Edif. Germán Bernacere
03690 San Vicente del Raspeig, Alicante, ES

72 Inventor/es:

PALMA GUERRERO, JAVIER;
LÓPEZ LLORCA, LUIS VICENTE;
JANSSON, HANS-BÖRJE;
SALINAS CALVETE, JESÚS y
GÜERRI AGULLÓ, BERENICE

74 Agente/Representante:

TEMIÑO CENICEROS, Ignacio

ES 2 574 588 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Uso del quitosano para incrementar la esporulación de hongos.

- 5 Esta invención se refiere a una composición en base a la utilización del quitosano que permite incrementar la esporulación de hongos, agentes de control biológico.

Antecedentes de la invención

- 10 La utilización de organismos naturales, como bacterias, virus y hongos, para el control de plagas y enfermedades, presenta un gran interés. En concreto, los hongos son organismos con gran potencial como agentes de control biológico, ya que tienen una capacidad de reproducción extremadamente alta, un tiempo de generación muy corto, y en ocasiones son muy específicos en su acción, atacando únicamente al huésped con el cual han co-evolucionado. Además, los hongos tienen fases saprofiticas en las cuales pueden sobrevivir sin el huésped, y permanecer en el medio hasta que éste vuelva a aparecer (12).

- 15 Los hongos nematófagos son un grupo de hongos antagonistas de nematodos (parásitos de plantas y animales) (18) y son, por tanto, buenos candidatos para su uso como agentes de control biológico de nematodos parásitos (31). Además de ello, también tienen la capacidad de infectar y colonizar otros organismos, incluyendo otros hongos y raíces de plantas (10).

- 20 *Pochonia chlamydosporia* es un buen ejemplo de este tipo de hongos, ya que es utilizado como agente de control biológico contra nematodos fitopatógenos (5, 11, 18), especialmente radicales, es un buen colonizador de la raíz de cereales (15) y diversas hortalizas (3, 4) y en experimentos in vitro es capaz de inhibir el crecimiento de estos hongos patógenos radicales (6, 9, 25).

Otros hongos nematófagos de especial interés son *Paecilomyces lilacinus*, *Lecanicillium lecanii* y *Pochonia rubescens*, capaces también de inhibir a varios fitopatógenos in vitro (6, 9, 23, 7).

- 30 Los hongos entomopatógenos son un grupo de hongos patógenos de insectos con numerosos ejemplos de su eficacia en la supresión de plagas de insectos, por lo que presentan gran potencial como agentes de control biológico (8). Los géneros *Beauveria*, *Metarhizium*, *Lecanicillium*, *Cordyceps* y *Paecilomyces* son los más importantes para su desarrollo como agentes de control biológico frente a plagas de vegetales (1).

- 35 Por ejemplo, el hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*, además de su papel en el control de plagas vegetales, es capaz de colonizar endofíticamente tejidos (7, 29, 19) y de inhibir, en experimentos in vitro, el crecimiento del hongo fitopatógeno *Penicillium vermoesenii* (1).

- 40 Por otro lado, el quitosano es, en su mayoría, un polímero de [beta] -1-4 glucosamina, una forma parcialmente desacetilada de la quitina. El quitosano se puede obtener por procesos químicos sometiendo la quitina a la acción de un medio alcalino muy concentrado, y a temperaturas superiores a 60 DEG C. En estas condiciones se produce la reacción de desacetilación, que consiste en la pérdida del resto acetilo del grupo amido del carbono 2 de la N-acetilglucosamina, quedando un grupo amino en esa posición. El quitosano se obtiene de fuentes naturales de quitina, principalmente a partir de caparazones de crustáceos y plumas de calamar, procedentes de las plantas procesadoras de marisco.

- 45 Se ha comprobado que el quitosano y sus derivados presentan actividad antimicrobiana frente a diferentes grupos de microorganismos, como bacterias y hongos. La acción bactericida del quitosano se debe a que desestabiliza las membranas celulares, provocando la pérdida del contenido celular (14). Asimismo, existen numerosas evidencias del efecto del quitosano sobre hongos fitopatógenos. En concreto, el quitosano inhibe la germinación de las esporas de hongos fitopatógenos (17), afecta a su crecimiento (24, 16, 20, 27), induciendo alteraciones morfológicas (13) y ultraestructurales en las hifas y provoca reducción de la producción de toxinas (21).

Descripción de la invención

- 55 La presente invención permite incrementar la esporulación de hongos filamentosos mediante el uso del quitosano. Dichos hongos podrán ser utilizados posteriormente como agentes de control biológico.

Las esporas son el principal mecanismo de inoculación de estos hongos por lo que aumentar la esporulación de los hongos agentes de control biológico, permite incrementar la producción de inóculo de los hongos para su posterior formulación y aplicación.

- 5 El quitosano es un buen inductor de la esporulación de hongos agentes de control biológico presentando los hongos crecidos en medio de cultivo con quitosano valores de producción más de 40 veces mayores que en el medio control sin quitosano.

10 El quitosano aplicado en estos medios de cultivo presenta una serie de ventajas, que aunque comprenden, no se limitan a las siguientes:

- No afecta las características biológicas de los conidios; se ha comprobado experimentalmente que los conidios del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* producidos en medio con quitosano, no muestran diferencia en la viabilidad con respecto a los conidios control.
- 15 – No afecta a la patogenicidad de los conidios; los conidios procedentes de medio con quitosano no muestran cambios en su patogenicidad frente a insectos al compararlos con los conidios control.

20 Por lo tanto, un primer aspecto de la invención se refiere al uso del quitosano para aumentar la esporulación de hongos entomopatógenos u hongos nematófagos donde el hongo nematófago se selecciona de la lista que comprende: *Pochonia chlamydosporia*, *Pochonia rubescens* o *Paecilomyces lilacinus*, y el hongo entomopatógeno se selecciona de la lista que comprende: *Beauveria bassiana* o *Lecanicillium cf. Psalliotae*.

25 Otro aspecto de la invención se refiere al método para incrementar la esporulación de hongos entomopatógenos u hongos nematófagos que comprende: la selección del hongo entomopatógeno u hongos nematófago, donde el hongo nematófago se selecciona de la lista que comprende: *Pochonia chlamydosporia*, *Pochonia rubescens* o *Paecilomyces lilacinus*, y el hongo entomopatógeno se selecciona de la lista que comprende: *Beauveria bassiana* o *Lecanicillium cf. Psalliotae*, su inoculación a un medio de cultivo que incluye al menos quitosano y la incubación de dicho hongo inoculado en el medio de cultivo de la invención, en condiciones apropiadas para el crecimiento de hongos.

30 Otro aspecto de la invención se refiere al método para la obtención de esporas para su uso como agente de control biológico que comprende la selección del hongo entomopatógeno u hongos nematófago, donde el hongo nematófago se selecciona de la lista que comprende: *Pochonia chlamydosporia*, *Pochonia rubescens* o *Paecilomyces lilacinus*, y el hongo entomopatógeno se selecciona de la lista que comprende: *Beauveria bassiana* o *Lecanicillium cf. Psalliotae*, su inoculación a un medio de cultivo que incluye al menos quitosano, incubación del hongo en condiciones apropiadas para la esporulación y el aislamiento de las esporas producidas en el paso anterior.

35 En una realización preferida el medio de cultivo presenta una concentración de quitosano de entre 0,1 mg/ml y 2 mg/ml En una realización más preferida el medio de cultivo de la invención presenta una concentración de quitosano de entre 0,5 mg/ml y 1,5 mg/ml En una realización aún más preferida el medio de cultivo de la invención presenta una concentración de quitosano de 1 mg/ml.

45 A lo largo de la descripción y las reivindicaciones, la palabra comprende y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención.

Los siguientes ejemplos y figuras sirven para ilustrar la invención y no deben ser considerados como limitativos del alcance de la misma.

50 Descripción de las figuras

Figura 1: Se muestra el resultado obtenido en la esporulación del hongo entomopatógeno *B. bassiana* (aislado 119, colonias de 18 días) al añadir concentraciones crecientes de quitosano al medio de cultivo. En la gráfica se puede observar que el aumento de la concentración de quitosano va acompañado de un aumento de la esporulación, alcanzando el valor máximo a la concentración de quitosano de 1 mg/ml.

Figura 2: Se refleja el efecto del quitosano aplicado a concentraciones de 2 mg/ml en medio CMA (agar extracto de

maíz), sobre la esporulación de hongos agentes de control biológico.

Figura 3: Esta gráfica muestra el valor de LT50 (tiempo letal medio, tiempo que tarda un organismo patógeno en matar a la mitad de la población del organismo diana) del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* (aislado 119) inoculado en larvas de *Galleria mellonella* estadios L3-L4. Los tratamientos aplicados a las larvas de *G. mellonella* son los siguientes:

- *B. bassiana* 119: Bbl19 CMA; se trata de conidios de *B. bassiana* cepa 119 crecidos en medio de cultivo CMA
- Bb119 CMA+HCl; se trata de conidios de *B. bassiana* cepa 119 crecidos en medio de cultivo CMA con HCl
- Bb119 CMA+T8s; se trata de conidios de *B. bassiana* cepa 119 crecidos en medio de cultivo CMA con quitosano a 2 mg/ml
- Controles sin *B. bassiana* 119: Control H2O-T8s; consiste en agua recogida de placas de medio de cultivo CMA con quitosano
- Control H2O-HCl; consiste en agua recogida de placas de medio de cultivo CMA con HCl
- Control H2O; consiste en agua recogida de placas de medio de cultivo CMA
- Control H2O-SL, consiste en agua recogida de placas de medio de cultivo CMA, sin pasarla por lana de vidrio
- Control SN, se trata de un control en el que no se añade nada a las larvas.

Exposición detallada de modos de realización

Ejemplo 1

Efecto del quitosano en la esporulación

Se estudió el efecto del quitosano en la esporulación de hongos nematófagos y hongos entomopatógenos. Los hongos utilizados fueron los siguientes:

- *Pochonia chlamydosporia* (P.c.), hongo nematófago, 9 cepas aisladas de distinta procedencia geográfica:

P.c.123 (Sevilla, aislado de *Heterodea avenae*),
 P.c.BK69 (Nueva Zelanda),
 P.c.BK132 (Kenia),
 P.c.BK309 (Zimbawe),
 P.c.BK392 (Cuba),
 P.c.BK 399 (China),
 P.c. 4624 (Perth, Australia),
 P.c.64 (Tarragona, aislado de *Meloidogyne* sp.),
 P.c.75 (Valladolid, aislado de *Heterodea schachtii*, c).

- *Pochonia rubescens*, hongo nematófago (Escocia, aislado de *Heterodea avenae*).

- *Paecilomyces lilacinus*, hongo nematófago

- *Beauveria bassiana*, hongo entomopatógeno, 3 cepas aisladas de distinta procedencia geográfica:

B.b119 (Orihuela, Alicante, aislado de coleóptero),
 B.b193 (Valencia, aislado de *Rhynchophorus ferrugineus*),
 B.b203 (Elche, Alicante, aislado de *Rhynchophorus ferrugineus*).

- *Lecanicillium cf. psalliotae*, hongo entomopatógeno (Elche, Alicante, aislado de *Phoenicococcus marlatti*).

El quitosano utilizado fue el denominado T8s, (Marine BioProducts GMBH). Se trata de un quitosano con un peso molecular de 70 KDa, y un grado de desacetilación del 79.6%.

Para utilizar experimentalmente el quitosano, previamente debe disolverse. Para ello, el quitosano en polvo se disolvió con Ácido Clorhídrico 0.25 M y se ajustó el pH a 5.6 con Hidróxido de Sodio 1 M. La disolución de quitosano se sometió a diálisis en agua destilada a 4 DEG C, con dos cambios al día, a lo largo de tres días, para eliminar las

sales presentes en el quitosano, o formadas al ajustar el pH del HCl a 5.6 con NaOH (2). Tras la diálisis se comprobó que el pH del quitosano se mantuvo estable a 5.6. Se utilizó un pH de 5.6 para que el pH no afectase a los hongos. A un pH más básico el quitosano no es soluble y un pH más ácido puede influir en el crecimiento del hongo. Asimismo, el ajuste de pH se realizó con HCl y NaOH debido a que el producto de la neutralización, NaCl es muy soluble y se puede eliminar fácilmente por diálisis.

Finalmente, se sometió el quitosano disuelto a esterilización mediante vapor húmedo en autoclave.

El medio de cultivo suplementado con quitosano se realizó preparando el medio de cultivo CMA (agar extracto de maíz, BBL). Se eligió el medio CMA para estudiar el efecto en la esporulación debido a que es el medio de cultivo en el que los hongos estudiados muestran mayor esporulación. Una vez esterilizado con vapor húmedo en autoclave (20 minutos a 120 DEG C), se añadió el volumen de quitosano necesario para obtener la concentración de quitosano deseada. (13). Por último, se dispuso el medio de cultivo en placas Petri de plástico estériles de nueve centímetros de diámetro. Como control se utilizaron placas conteniendo CMA sin quitosano.

Se realizó un segundo control añadiendo al medio de cultivo Ácido Clorhídrico 0.25M con pH 5.6 ajustado con Hidróxido de Sodio, y dializado. Para este segundo control se usó el mismo volumen de HCl a pH 5.6 que el volumen de quitosano utilizado para preparar la mayor concentración de quitosano (2 mg/ml). Este segundo control se realizó para descartar posibles efectos inhibitorios debidos al Cloruro Sódico producido al ajustar el pH del Ácido Clorhídrico con el Hidróxido de Sodio.

Las placas con el medio descrito se inocularon en el centro con discos de 5 mm tomados del borde de colonias, de los distintos hongos creciendo activamente, y se incubaron a 25 DEG C en oscuridad. Se realizaron tres réplicas por tratamiento.

Cuando las colonias tenían entre 18 y 21 días (próximas a alcanzar el borde de la placa) se extrajeron los conidios y se cuantificaron.

Para extraer los conidios se trabajó en una cámara de flujo laminar, con material esterilizado por vapor húmedo en autoclave, y con el instrumental flameado previamente. Se añadió agua destilada estéril sobre la placa, se arrastraron los conidios utilizando un asa de vidrio, se recogieron con una micropipeta y se dispusieron en tubos Eppendorf estériles de 1,5 ml. La concentración de conidios se calculó utilizando una cámara de Neubauer de 0,025 mm² de área y 0,1 mm de profundidad. De esta forma se calculó el número de conidios por cm².

En la figura 1 se puede observar que el aumento de la concentración de quitosano va acompañado de un aumento de la esporulación del hongo *B. bassiana* (aislado 119), alcanzando el valor máximo a la concentración de quitosano de 1 mg/ml.

Los resultados del efecto del quitosano en la esporulación en los hongos agentes de control biológico se resumen en la Tabla 1 y Figura 2. Podemos observar que tanto en los hongos nematófagos como en los hongos entomopatógenos hay un claro aumento de la esporulación por cm². En algunas especies o cepas la esporulación llega a incrementarse más de 40 veces respecto al control (*B. bassiana*, aislado 119).

TABLA 1

Efecto del quitosano a 2 mg/ml sobre la esporulación de hongos agentes de control biológico en medio CMA

Hongos		Tratamiento	Conidios/cm ² ± DE	% conidios/cm ² ± DE (medio con quitosano respecto a medio control)
Nematófagos	P.c.123	Control	$1,72 \cdot 10^4 \pm 5,39 \cdot 10^3$	3096,30 ± 453,24
		T8	$5,31 \cdot 10^5 \pm 7,78310^4$	
	P.c.BK69	Control	$3,05 \cdot 10^5 \pm 2,67 \cdot 10^4$	580,18 ± 52,67
		T8	$1,77 \cdot 10^6 \pm 1,61 \cdot 10^5$	
	P.c.BK132	Control	$1,69 \cdot 10^5 \pm 1,65 \cdot 10^4$	380,73 ± 40,88
		T8	$6,43 \cdot 10^5 \pm 6,9 \cdot 10^4$	
	P.c.BK309	Control	$1,10 \cdot 10^4 \pm 1,57 \cdot 10^3$	3235,71 ± 774,32
		T8	$3,56 \cdot 10^5 \pm 8,51 \cdot 10^4$	
	P.c.BK392	Control	$1,01 \cdot 10^5 \pm 2,40 \cdot 10^4$	1039,55 ± 221,68
		T8	$1,05 \cdot 10^6 \pm 5,86 \cdot 10^5$	
	P.c.BK399	Control	$5,64 \cdot 10^4 \pm 1,29 \cdot 10^4$	1109,58 ± 233,54
		T8	$6,25 \cdot 10^5 \pm 1,32 \cdot 10^5$	
	P.c.4624	Control	$8,83 \cdot 10^5 \pm 1,40 \cdot 10^5$	1163,37 ± 72,29
		T8	$1,03 \cdot 10^7 \pm 6,38 \cdot 10^5$	
	P.c.64	Control	$1,07 \cdot 10^5 \pm 2,16 \cdot 10^4$	713,89 ± 165,24
		T8	$7,60 \cdot 10^5 \pm 1,76 \cdot 10^5$	
	P.c.75	Control	$1,34 \cdot 10^4 \pm 3,46 \cdot 10^3$	1697,49 ± 242,30
		T8	$2,27 \cdot 10^5 \pm 3,24 \cdot 10^4$	
	<i>P. rubescens</i>	Control	$8,39 \cdot 10^4 \pm 9,73 \cdot 10^3$	614,47 ± 138,26
		T8	$5,18 \cdot 10^5 \pm 1,16 \cdot 10^5$	
	<i>P. lilacinus</i>	Control	$1,03 \cdot 10^5 \pm 2,66 \cdot 10^4$	2821,86 ± 910,61
		T8	$2,91 \cdot 10^6 \pm 9,39 \cdot 10^5$	
Entomopatógenos	B.b.119	Control	$2,44 \cdot 10^4 \pm 4,65 \cdot 10^3$	4301,32 ± 964,70
		T8	$1,05 \cdot 10^6 \pm 2,63 \cdot 10^5$	
	B.b.193	Control	$8,05 \cdot 10^4 \pm 2,34 \cdot 10^4$	536,94 ± 28,55
		T8	$4,32 \cdot 10^5 \pm 2,96 \cdot 10^4$	
	B.b.203	Control	$8,73 \cdot 10^5 \pm 1,88 \cdot 10^5$	691,00 ± 14,71
		T8	$6,03 \cdot 10^6 \pm 3,2 \cdot 10^5$	
	<i>L. cf. psalliotae</i>	Control	$2,62 \cdot 10^5 \pm 3,57 \cdot 10^4$	1634,16 ± 230,64
		T8	$4,28 \cdot 10^6 \pm 6,04 \cdot 10^5$	

Ejemplo 2

Viabilidad de los conidios

- 5 Se comprobó la viabilidad de los conidios procedentes de los hongos creciendo en medio con quitosano según lo descrito en el ejemplo 1, comparando su germinación respecto a la de los conidios procedentes de las placas control (sin quitosano).
- 10 Para ello, los conidios se lavaron varias veces por centrifugación a 13500 rpm durante 5 minutos, y resuspensión en agua destilada estéril. De esta forma se eliminan posibles inhibidores de la germinación producidos por los propios conidios (22). Se ajustó la concentración a 106 conidios/ml, utilizando agua destilada estéril. Los conidios se dispusieron en portaobjetos con diez pocillos de 6 mm de diámetro (ICN Biomedicals) como se indica a continuación:
- 15 Se añadieron 25 [mu] l de la suspensión de conidios por pocillo, con tres réplicas por tratamiento, y dos pocillos por réplica (en total seis pocillos por tratamiento). Los portaobjetos se dispusieron dentro de una placa de petri estéril, sobre un trozo de papel estéril humedecido, formando una cámara húmeda.
- 20 Tras 24 horas se contó al microscopio el número de conidios germinados y sin germinar de tres zonas al azar de cada pocillo y se calculó el porcentaje de conidios germinados. Se consideró que los conidios habían germinado cuando la longitud del tubo germinal media más de la mitad del diámetro del conidio (17).
- Por último, los conidios se sembraron en placas petri con medio de cultivo rico en nutrientes PDA (Agar dextrosa de patata) utilizando un asa de vidrio. A lo largo de las 72 horas siguientes se cuantificó el número de colonias.
- 25 No se observaron diferencias en la viabilidad de los conidios producidos en medio suplementado con quitosano respecto a los conidios producidos en medio sin quitosano.

Ejemplo 3

Efecto del quitosano en la patogenicidad de los conidios

- 30 Para la realización del ensayo de patogenicidad se utilizaron 15 larvas de estadio L3-L4 del lepidóptero *Galleria mellonella* repartidas en 3 réplicas. Como inóculo se utilizaron los conidios del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* (aislado 119) procedentes de placas sin quitosano y placas con quitosano a 2 mg/ml, ajustando su concentración a 2c 106 conidios/ml con agua destilada estéril.
- 35 Se pusieron 5 larvas en una placa Petri. A cada una de las larvas se le añadió una gota (20 mul) de las suspensiones de 2c 106 conidios/ml, inoculando 4c 104 conidios por larva. Se cerraron las placas para evitar fugas de los insectos. Se anotaron cada día, durante 10 días, los individuos muertos de cada uno de los tratamientos.
- 40 Como control se utilizaron extractos sin conidios obtenidos de placas de CMA con Quitosano, CMA con HCl y CMA. Todos estos extractos se prepararon pasando el contenido recogido de cada placa por lana de vidrio.
- 45 Se realizó un cuarto control en el que el contenido recogido de una placa de CMA no se pasó por lana de vidrio.
- Por último se utilizó un quinto control al que no se añadió nada (insectos sin tratar).
- Con todos los datos obtenidos se calculó la LT50 (tiempo letal medio, tiempo que tarda un organismo patógeno en matar a la mitad de la población del organismo diana).
- 50 Los resultados de los ensayos de patogenicidad se muestran en la Figura 3. No se observaron diferencias en el nivel de patogenicidad frente a *G. mellonella* entre los conidios procedentes de los distintos tratamientos (hongo crecido en placa de CMA, en placa de CMA con Quitosano o en placa de CMA con HCl), con valores de LT50 entorno a los 6-7 días. Los insectos de los tratamientos control superaron los 10 días de supervivencia, por lo tanto no se pudo
- 55 calcular la LT50.

Referencias bibliográficas

1. Asensio, L. (2004). Control biològic de plagues i malalties de palmeres per fongs entomopatògens. Tesis doctoral. Universidad de Alicante, 256pp.
- 5 2. Benhamou, N., Lafontaine, P.J., & Nicole, M. (1994). Seed treatment with chitosan induces systemic resistance to Fusarium crown and root rot in tomato plants. *Phytopathology* 84, 1432-1444.
3. Bordallo, J.J., López-Llorca, L.V., Jansson, H. B., Salinas, J., Persmark, L. & Asensio, L. (2002). Colonization of plant roots by egg-parasitic and nematode-trapping fungi. *New Phytologist* 154, 491-499.
- 10 4. Bourne, J. M., Kerry, B. R. & De Leij, F. A. A. M. (1996). The importance of the host plant on the interaction between root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) and the nematophagous fungus *Verticillium chlamydosporium* Goddard. *Biocontrol Science and Technology* 6, 539-548.
- 15 5. De Leij, F. A. A. M., Kerry, B. R. & Dennehy, J. A. (1993). *Verticillium chlamydosporium* as a biocontrol agent for *Meloidogyne incognita* and *M. hapla* in pot and microplot tests, *Nematologica* 39, 115-126.
6. Ehteshamul, H. S., Zaki, M. J., Abid, M. & Ghaffar, A. (1994). Use of *Verticillium chlamydosporium* in the biological control of root-rot disease of chickpea. *Pakistan Journal of Botany* 26, 229-233.
- 20 7. Gómez-Vidal, S., López-Llorca, L.V., Jansson, H.-B. & Salinas, J. (2006). Endophytic colonisation of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) leaves by entomopathogenic fungi. *Micron* 37, 624-632.
8. Inglis, G.D., Goettel, M.S., Butt, T.M. & Strasser, H. (2001). Use of Hyphomycetous fungi for managing insect pests. En: *Fungi as Biocontrol agents*. CABI Publishing. p.p. 23-69.
- 25 9. Jacobs, H., Gray, S. N. & Crump, D. H. (2003). Interactions between nematophagous fungi and consequences for their potencial as biological agents for the control of potato cyst nematodes. *Mycological Research* 107, 47-56.
- 30 10. Jansson, H-B., & López-Llorca, L.V. (2004). Control of nematode by fungi. Arora DK ed. *Fungal biotechnology in agriculture, food, and environmental applications*. Marcel Dekker, New York, p.p. 205-215.
11. Kerry, B. R. & Bourne, J.M. (1996). Importance of rhizosphere interactions in the biological control of plant-parasitic nematodes- a case of study using *Verticillium chlamydosporium*. *Pesticide Science* 47, 69-75.
- 35 12. Kendrick, B. (1985). *The fifth kingdom*. Micologue Publications. 363pp.
13. Laflamme, P., Benhamou, N., Bussieres, G., & Dessureault, M. (1999). Differential effect of chitosan on root rot fungal pathogens in forest nurseries. *Canadian Journal of Botany* 77, 1460-1468.
- 40 14. Liu, H., Du, Y., Wang, X. & Sun, L. (2004). Chitosan kills bacteria through cell membrane damage. *International Journal of Food Microbiology* 95, 145-155.
15. López-Llorca, L.V., Olivares-Bernabeu, C.M., Salinas, J. & Jansson, H.B. (2002). Pre-penetration events in fungal parasites of nematode eggs. *Mycological Research* 106, 499-506.
- 45 16. Park, R.D., Jo, K.J., Jo, Y.Y., Jin, Y.L., Kim, K.Y., Shim, J.H., & Kim, Y.W. (2002). Variation of antifungal activities of chitosans on plant pathogens. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 12, 84-88.
17. Plascencia-Jatomea, M., Viniegra, G., Olaya, R., Castillo-Ortega, M.M., & Shirai, K. (2003). Effect of chitosan and temperature on spore germination of *Aspergillus niger*. *Macromolecular Bioscience* 3, 582-586.
- 50 18. Poinar G.O. (1983). *The natural history of nematodes*. Prentice-Hall, Englewood Cliffs.
19. Quesada-Moraga, E., Landa, B.B., Muñoz-Ledesma, J., Jiménez-Díaz, R.M. & Santiago-Alvarez, C. (2006). Endophytic colonisation of Opium poppy, *Papaver somniferum*, by an entomopathogenic *Beauveria bassiana* strain. *Mycopathologia* 161, 323-329.
- 55 20. Rabea, E.I., Badawy, Mohamed E.T., Estevens, Christian V., Smagghe, G., & Steurbault, W. (2003). Review:

Chitosan as antimicrobial agent: Applications and mode of action. *BioMacromolecules* 4, 1458-1465.

21. Reddy, M.V.B., Arul, J., Ait-Barka, E., Angers, P., Richard, C. & Castaigne, F. (1998). Effect of chitosan on growth and toxin production by *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici*. *Biocontrol Science and Technology* 8, 33-43.

22. Robinson, P.M. (1978). *Practical fungal physiology*. Wiley. 123pp.

23. Romero, D., Rivera, M. E., Cazorla, F. M., de Vicente, A. & Pérez-García, A. (2003). Effect of mycoparasitic fungi on the development of *Sphaeroteca fusca* in melon leaves. *Mycological Research* 107, 64-71.

24. Saniewska, A. (2001). The effect of chitosan on limitation of growth and development of some pathogenic fungi for ornamental plants. *Acta Agrobotanica* 54 (1), 17-29.

25. Siddiqui, I. A. & Shaukat, S. S. (2003). Combination of *Pseudomonas aeruginosa* and *Pochonia chlamydosporia* for control of root-infecting fungi in tomato. *Journal of Phytopathology* 151 (4), 215-222.

26. Stirling. (1991). *Biological control of plant parasitic nematodes. Progress, problems and prospects*. CAB International, Wallingford.

27. Tikhonov, V.E., Stepnova, E.A., Babak, V.G., Yamskov, I.A., Palma-Guerrero, J., Jansson, H-B., López-Llorca, L.V., Salinas, J., Gerasimenko, D.V., Avdienko, I.D. & Varlamov, V.P. (2006). Bactericidal and antifungal activities of a low molecular weight chitosan and its N-2(3)-(dodec-2-enyl)succinoyl/-derivatives. *Carbohydrate Polymers* 64, 66-72.

28. Verdejo-Lucas, S., Sorbías, F.J., Ornat, C. & Galeano, M. (2003). Evaluating *Pochonia chlamydosporia* in a double-cropping system of lettuce and tomato in plastic houses infested with *Meloidogyne javanica*. *Plant Pathology* 52, 521-528.

29. Wagner, B.L. & Lewis, L.C. (2000). Colonization of Corn, *Zea mays*, by the Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana*. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 3468-3473.

REIVINDICACIONES

1. Uso del quitosano para incrementar la esporulación de hongos entomopatógenos u hongos nematófagos, donde el hongo nematófago se selecciona del grupo que consiste en: *Pochonia chlamydosporia*, *Pochonia rubescens* o *Paecilomyces lilacinus* y el hongo entomopatógeno se selecciona del grupo que consiste en: *Beauveria bassiana* o *Lecanicillium cf. psalliotae*.
5
2. Método para incrementar la esporulación de hongos entomopatógenos u hongos nematófagos que comprende:
10
 - A. Selección del hongo hongos entomopatógenos u hongos nematófagos, donde el hongo nematófago se selecciona del grupo que consiste en: *Pochonia chlamydosporia*, *Pochonia rubescens* o *Paecilomyces lilacinus* y el hongo entomopatógeno se selecciona del grupo que consiste en: *Beauveria bassiana* o *Lecanicillium cf. psalliotae*.
15
 - B. Inoculación al medio de cultivo que comprende al menos quitosano.
 - C. Incubación en condiciones apropiadas para la esporulación de hongos.
3. Método para la obtención de esporas para su uso como agente de control biológico que comprende:
20
 - A. Selección del hongo hongos entomopatógenos u hongos nematófagos, donde el hongo nematófago se selecciona del grupo que consiste en: *Pochonia chlamydosporia*, *Pochonia rubescens* o *Paecilomyces lilacinus* y el hongo entomopatógeno se selecciona del grupo que consiste en: *Beauveria bassiana* o *Lecanicillium cf. psalliotae*.
25
 - B. Inoculación al medio de cultivo que comprende al menos quitosano.
 - C. Incubación en condiciones apropiadas para la esporulación de hongos.
 - D. Aislamiento de las esporas producidas en el paso anterior.
4. Medio de cultivo según cualquiera de las reivindicaciones 2 o 3, donde el quitosano está a una concentración de entre 0,1 mg/ml y 2 mg/ml.
5. Medio de cultivo según la reivindicación 4, donde el quitosano está a una concentración de entre 0,5 mg/ml y 1,5 mg/ml.
35
6. Medio de cultivo según la reivindicación 5, donde el quitosano está en una concentración de 1 mg/ml.
40

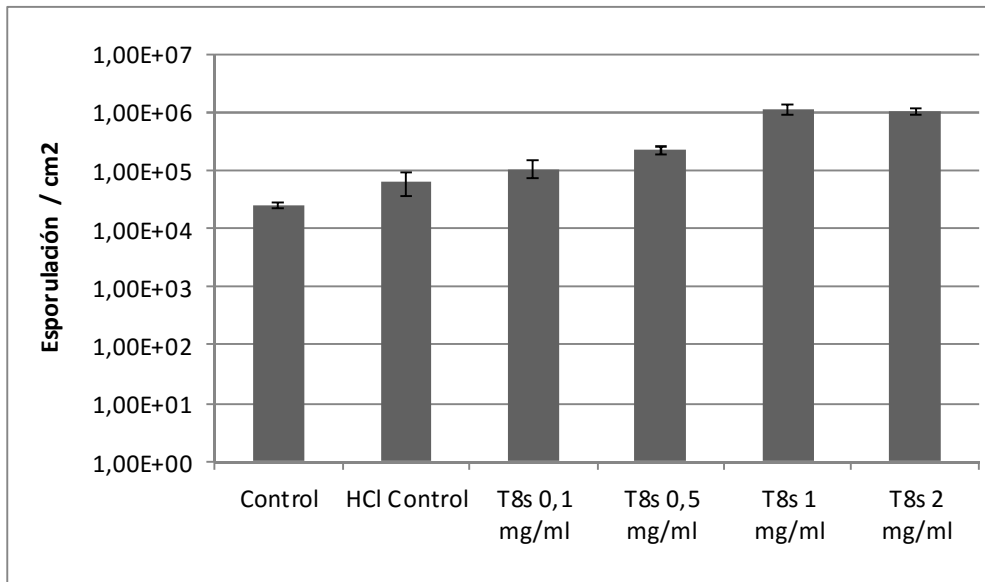


FIG.1

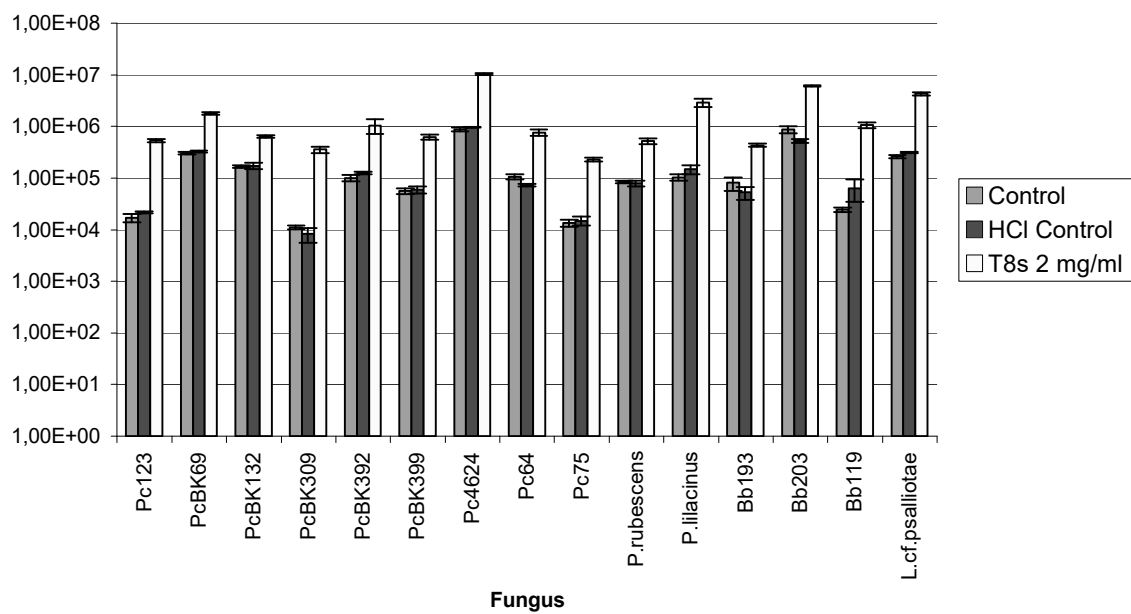


FIG.2

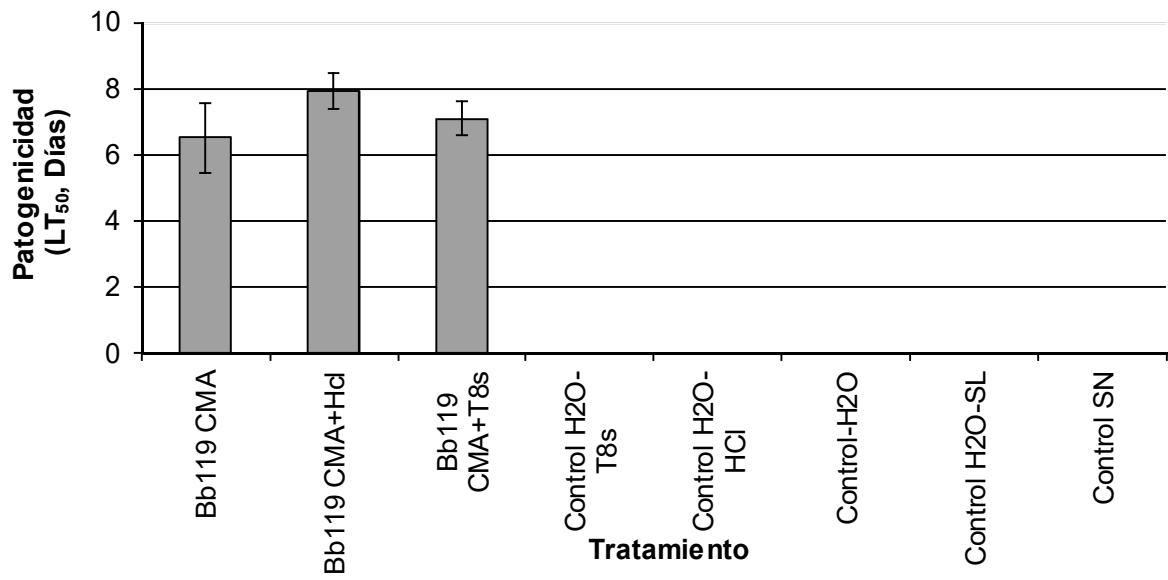


FIG. 3