

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 579 227**

51 Int. Cl.:

A01N 63/04 (2006.01)

A01P 7/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.12.2007 E 07871858 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.04.2016 EP 2096926**

54 Título: **Utilización del hongo entomopatógeno Beauveria bassiana como medio para la lucha biológica contra Paysandisia archon**

30 Prioridad:

13.12.2006 FR 0610867

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

08.08.2016

73 Titular/es:

**NATURAL PLANT PROTECTION (100.0%)
Route d'Artix BP 80
64150 Noguères, FR**

72 Inventor/es:

**BESSE, SAMANTHA y
BONHOMME, ANTOINE**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 579 227 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

Utilización del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* como medio para la lucha biológica contra *Paysandisia archon*

5 La presente invención se refiere al sector técnico de la lucha biológica contra los insectos perjudiciales. Se refiere más particularmente a la utilización del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* para luchar contra *Paysandisia archon*, una mariposa devastadora de las palmeras.

10 La mariposa *Paysandisia archon* es un lepidóptero devastador de las palmeras perteneciente a la familia de las *Castniidae*, subfamilia de las *Castniinae*. Este insecto palmívoro es originario de la Argentina y del Uruguay. En Argentina, *P. archon* ataca a las palmeras locales tales como *Trithrinax campestris* y *Butia yatay*, así como a las especies exóticas tales como *Latania*, *Chamaerops* o *Phoenix canariensis* (Drescher y Dufay, 2002).

15 Poco estudiado, este insecto hace pocos destrozos en el continente suramericano. Parecería que un enemigo natural mantiene su población en equilibrio, aunque no se ha puesto en evidencia ningún lazo factual entre *P. archon* y un supuesto enemigo natural (Sarto I Monteys y Aguilar, 2005). Se podría tratar de un pájaro (por ejemplo urraca, ruiseñor o *Mimus saturninus*) o de un insecto (por ejemplo un icneumónido del género *ophion*). Así, Sarto I Monteys y Aguilar, 2005 informan que las larvas de nemátodos, ácaros y moscas fueron observadas en un cadáver de larva de *P. archon*. Siempre según Sarto I Monteys y Aguilar, 2005 las características morfológicas de ciertos huevos de *P. archon* sugieren la posibilidad de que sean parasitados por himenópteros o hemípteros. Sin embargo, estos estudios no permiten determinar con exactitud si existe efectivamente un enemigo natural de *P. archon*.

20 En el curso de los años 1990, *Paysandisia archon* fue introducida accidentalmente en España y en Francia por importaciones de palmeras adultas procedentes de Argentina.

Desde su introducción, la mariposa se propaga en Europa a la vez por el vuelo de los adultos (dispersión natural) y por el transporte de las palmeras infectadas, asegurando su diseminación del mal a largas distancias.

25 Actualmente, la zona de distribución del insecto en Europa concierne esencialmente el sur de España, el sur de Italia y Francia. En Francia atañe numerosos departamentos del sur y del oeste. Así, *Paysandisia archon* fue detectada en el Var (1999), el Hérault (2001) y en toda la costa del Rosellón, en los Pirineos medios (2004) y en la ciudad de Rennes (2006).

30 Los estudios realizados en Francia sugieren que esta mariposa posee un largo ciclo de desarrollo (Drescher y Dufay, antes citados): los adultos, activos durante el día, se observan de junio a septiembre. *P. archon* pone sus huevos sobre las hojas de la palmera. Las larvas (orugas) cavan galerías en el estípite (tronco) o en las hojas nuevas, y se nutren a continuación del corazón de la palmera. Resistentes al frío, pasan al estado de crisálida gracias a un capullo confeccionado en el interior de las galerías con las fibras de las palmas. Al final de su desarrollo, la mariposa adulta se libera de la envoltura a nivel del extremo del capullo situado enfrente de la salida de la galería. Los estragos observados sobre la palmera son característicos del paso de *P. archon* (Sarto I Monteys y Aguilar, 2005):

- 35
- presencia de serrín en la base de la corona y/o del estípite;
 - palmas perforadas o roídas;
 - presencia de galerías axiales y transversales en el estípite;
 - desarrollo anormal de los brotes axilares;
 - deformación o torsión (bucle) anormal del estípite;
- 40
- desecado anormal de las palmas y especialmente de las hojas centrales;

El debilitamiento de la palmera tiene lugar en un lapso de tiempo variable, que depende del número de larvas. Cuando éstas son numerosas, la muerte puede tener lugar en un plazo bastante breve (1 a 2 años).

45 Además de las especies originarias de América del sur, tales como las mencionadas anteriormente, los huéspedes conocidos en Francia de *P. archon* son especialmente las especies siguientes: *Chamaerops humilis*, *Livistona chinensis*, *L. decipiens*, *L. saribus*, *Sabal spp.*, *Phoenix canariensis*, *P. dacylifera*, *P. reclinata*, *Trachycarpus fortunei* y *Washingtonia filifera* (Drecher y Dufay, 2001). En España, la mariposa fue observada sobre *Trachycarpus fortunei*, *Phoenix canariensis*, *Washingtonia spp* y *Chamaerops humilis* (Aguilar, 2001).

50 Las especies *Trachycarpus fortunei* (o *Chamaerops excelsa*; palmera de China) y *Chamaerops humilis* (palmera enana) son particularmente sensibles ya que poseen un corazón tierno y las fibras de su estípite facilitan la puesta de los huevos.

Un gran número de palmerales, algunos de un gran valor histórico, están actualmente amenazados en Europa, y numerosas ciudades deben tomar medidas de arrancamiento.

Además de las palmeras, otros vegetales fueron descritos como que puede ser la diana de *Paysandisia archon*. En efecto, se han observado ataques contra los cereales tales como el maíz o también contra las plantas ornamentales, tales como yucas o canas provenzales.

Los medios de lucha contra *Paysandisia archon* son ahora muy limitadas y poco eficaces, En efecto, según Sarto I Monteys y Aguilar (antes citados):

- las larvas son casi exclusivamente endófagas, lo que hace el uso de insecticidas mucho menos eficaz que cuando son utilizados para luchar contra insectos exófagos;
- las trampas de luces son ineficaces porque la *Paysandisia archon* adulta es de actividad diurna;
- los cebos envenenados son inoperantes contra las mariposas adultas puesto que en este estado éstas no se alimentan;
- los controles por feromonas sintéticas podría ser igualmente inoperante en la medida que la hembra de *P. archon* parece que no produce un amplio espectro de feromonas sexuales;

MONTAGUT ALARIO, 2004 menciona los inconvenientes de los tratamientos actuales contra *P. archon* (coste, eficacia limitada) y evoca el interés potencial de utilizar un enemigo natural de esta mariposa. Sin embargo, MONTAGUT ALARIO no precisa qué enemigo se puede usar.

Se ha informado en 2006 en Internet que (i) para luchar contra *P. archon*, la lucha biológica “necesitaría años antes de responder” y (ii) la urgencia de un tratamiento prometedor que consiste en aplicar una pasta blanda sobre la palmera para pegar y cazar la mariposa adulta (<http://fr.Groups.yahoo.com/group/palmiers/mesage/8626>).

En 2007 se ha informado también en Internet que no existe actualmente ningún tratamiento biológico contra *P. archon* (http://palmae.free/paysandisia_archon.htm). Este documento propone ensayar un producto que contiene *Bacillus thuringiensis*.

Actualmente, los medios de lucha contra *Paysandisia archon* son de dos tipos: mecánico y químico:

- Medios mecánicos: los árboles infectados o susceptibles de serlo se recubren con un velo de hibernación o una red antigranizo. Además, deben ser arrancados sistemáticamente, triturados y después quemados.
- Medios químicos: se puede citar la utilización de compuestos organofosfóricos inhibidores de la colinesterasa, tales como clorpirifos (Suxon vert®, Nufarm), el acefato, el dimetoato (Dimezyl 40 EC®, Agriphyt) y el fosalone (Zolone®, Fertiligène). No obstante, son poco eficaces cuando las larvas ya se han encerrado en el interior de la palmera. Además, los capullos de *Paysandisia archon* son impermeables a los insecticidas (Sarto I Monteys y Aguilar (antes citados). Para superar estas dificultades, estos insecticidas se deben utilizar de forma repetida, según una frecuencia elegida en función de la importancia de la infección: por ejemplo, cuando la infección es débil, pueden ser suficientes dos tratamientos únicos, uno en junio y el otro en agosto; cuando la infección es importante, el tratamiento puede ser mensual desde finales de mayo a finales de septiembre (Sarto I Monteys y Aguilar (antes citados)).

Estos tratamientos químicos se pueden combinar con la utilización de un velo para la hibernación o por una red antigranizo de manera a ralentizar la evaporación del producto y evitar la evasión de mariposas procedentes de las eventuales larvas supervivientes.

En Francia, la importancia de los estragos ocasionados por *P. archon* y el riesgo que representa esta mariposa para los palmerales son tales que la *Paysandisia archon* ha sido objeto de un acuerdo para la lucha biológica obligatoria (Journal Officiel del 21 febrero 2002). Sin embargo, los medios de lucha (mecánicos y químicos) actuales contra *P. archon* presentan el inconveniente mayor de no producir resultados satisfactorios. Existe por lo tanto una necesidad real de mejorar la lucha contra *Paysandisia archon* y, más particularmente, una necesidad de mejorar los tratamientos existentes y/o de desarrollar estrategias de lucha alternativas o complementarias, más eficaces.

La solicitud internacional WO 02/28189 se refiere a la utilización de hongos entomopatógenos como insecticidas. Este documento divulga las utilidades de hongos especialmente contra lepidóptero de la familia de las pirálidas o de la familia de las noctuidas. Este documento propone utilizar hongos en estado de micelio “preconidial” como agentes atractivos y/o patógenos. Este documento cita ejemplos de hongos e informa que especialmente *Beauveria bassiana*, *Matarhizium anisopliae*, *Paecilomyces farinosus* y *Zoopthora radicans* tienen un amplio espectro de huéspedes, pudiendo infectar la *B. bassiana* más de 700 especies de artrópodos. Este documento cita igualmente numerosos ejemplos de insectos que pueden ser atrapados y especialmente numerosos lepidópteros. Este documento menciona, además, que un hongo patógeno y virulento para una especie de insecto podría ser ineficaz contra otras especies, comprendiendo aquí especies de la misma familia o del mismo género. Por otra parte, según

este documento, ocurre frecuentemente que en pleno campo hongos con un amplio espectro de huéspedes son todavía más específicos y atacan a un solo huésped, incluso cuando un huésped emparentado está igualmente presente. La patente US 5,516,513 tiene por objeto identificar un agente biológico que tenga una actividad ovicida contra los lepidópteros. Este documento propone la utilización de un aislado de *B. bassiana* (ATCC 74040), ya conocido por su virulencia especialmente contra lepidópteros de la familia de los noctuidos o piralidades. Este documento describe igualmente un procedimiento de protección de una planta contra dichos lepidópteros, que comprende la aplicación de este aislado en la parte foliar de la planta.

GAFUROVA et al., 1980 informan que la pulverización en laboratorio de endotoxinas de *Aspergillus ochraceus*, de *B. bassiana*, de *Gymnoascus reesi* y de *Paecilomyces* sobre insectos provoca 40% a 53% de mortalidad. La identidad de estos insectos no se ha precisado. Los autores informan, además, que las toxinas de *B. Bassiana* tienen un efecto sinérgico sobre una solución de boverina al 1% utilizada contra las orugas de *Carpocapsa* (lepidóptero de la superfamilia de las Tortricoidea).

FORNELLI et al., 2004, describen el estudio de la toxicidad de diez y seis metabolitos de hongos sobre la línea celular SF9 (línea procedente de células de *Spodoptera frugiperda* (superfamilia de las Noctuoidea)) con ayuda de dos ensayos colorimétricos *in vitro*, a saber la exclusión del Bleu Trypan y la coloración por MTT.

VILCINSKAS et al., 1999, se refiere al estudio del efecto de los metabolitos peptídicos cíclicos beauverolide L y ciclosporina A sobre la respuesta inmunitaria celular y hormonal de larvas de la polilla de la cera *Galleria mellonella*.

La solicitud EP 1297746 se refiere a la utilización de *Paecilomyces tenuipes* T1 FERM BP-7861 para la preparación de insecticidas dirigidos especialmente contra ciertos lepidópteros.

La patente US 5,227,396 describe la utilización de varios compuestos indólicos procedentes de *Aspergillus sulphureus* y de *Aspergillus flavus* para luchar contra los lepidópteros tales como *Helicoverpa zea* (superfamilia de las Noctuoidea).

Por consiguiente, los inventores tienen por objeto de proveer medios de lucha eficaces contra *Paysandisia archon* que respondan mejor a las necesidades de la práctica que los medios utilizados hasta el presente.

Así, han puesto a punto un método de lucha biológica contra *P. archon*, que emplea el hongo entomopatógeno *Bauveria bassiana*.

Los hongos entomopatógenos son microorganismos capaces de provocar desórdenes patológicos en algunos insectos. Se enumeran más de setecientas especies de hongos patógenos para los insectos (Feng et al., 1994). Estos agentes son particularmente interesantes por el hecho de su aptitud para infectar el huésped por ingestión o por simple contacto en todos los estados de desarrollo de los insectos (huevos, larvas, adultos).

El descubrimiento de aislados de hongos en los cadáveres de insectos ha permitido descubrir su poder patógeno contra sus huéspedes de origen.

Como ejemplo, *Pannolis flammea* y *Castnia licus*, lepidópteros alejados de *Paysandisia archon* son respectivamente huéspedes de un aislado de *Beauveria bassiana* y de un aislado de *Beauveria brongniarti* (Hicks et al., 2000; Humber et Hansen, 2005). *Castnia licus* se describe, además, como un huésped de aislados de *Beauveria brongniarti* (Humber et Hansen, 2005) y de aislados de *Metarhizium anisopliae* (Figueiredo et al., 2002).

Existen además doscientos huéspedes del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*, principalmente en los lepidópteros tales como *Castnia licus* y *Panolis flammea* y en los coleópteros. No obstante las epizootias causadas por *Beauveria bassiana* se dan con poca frecuencia (Feng et al., 1994). De manera general, los aislados de *Beauveria bassiana* son sobretodo patógenos contra sus huéspedes de origen o de especies próximas en la clasificación (Feng et al., antes citado: Moore et al., 1993).

La utilización de hongos entomopatógenos como agentes de control de insectos nocivos existe desde hace tiempo (Bartlett y Jaronsky, 1988). Los géneros más estudiados como micoinsecticidas son *Beauveria bassiana*, *Metarhizium*, *Verticillium*, *Hirsutella*, *Erynia*, (o *Zoophtora*), *Nomurae*, *Aspergillus*, *Aschersonia*, *Paecilomyces*, *Tolypocladium*, *Leptolegnia*, *Culicinomyces*, *Coelomomyces* y *Lagenidium* (Moore y Prior, 1993). Por ejemplo, el aislado *Beauveria bassiana* GHA (Bb GHA, o Bb GHA 1991 depositado en la ATCC (American Type Culture Collection) bajo el número 74250), cuyo huésped original es la *Chrysomela maculata* del pepino (*Diabrotica undecimpunctata*), se comercializa como micoinsecticida (*Botaniguard*® ; el aislado *Beauveria bassiana* 147 (Bb 147) (igualmente a veces denominado 111B004 y depositado en la C.N.C.M con el número I-2960) se comercializa especialmente como medio de lucha contra su huésped original, la piral del maíz, *Ostrinia nubilalis* (*Ostrinil*®, Natural Plant Protection (FR).

Está generalmente admitido que un hongo patógeno y virulento respecto a un insecto de una especie dada puede ser ineficaz contra otras especies comprendidas en especies de la misma familia o del mismo género (WO 02/28189).

De manera sorprendente, los inventores han demostrado ahora que es posible utilizar el hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* para luchar contra *Paysandisia archon*. Efectivamente, dichos hongos se pueden sustituir por medios actuales de lucha, tanto a título preventivo como a título curativo. Por otra parte, dichos hongos se pueden asociar a medios mecánicos o químicos, para mejorar su eficacia. Además, dichos hongos constituyen un medio de lucha biológica perfectamente adaptado a la lucha contra la mariposa especialmente en medios urbanos.

Tal resultado no se ha considerado porque ningún hongo ha sido considerado hasta ahora como patógeno contra *Paysandisia archon*. Efectivamente, no se ha encontrado ningún hongo en los cadáveres de *P. archon*. Además, en lo referente a *Beauveria bassiana*, este resultado no se ha considerado igualmente porque esta mariposa es originaria de América del sur, mientras que los huéspedes conocido de *Beauveria bassiana* se presentan poco en el continente americano (Aquilino de Muro et al., 2003).

La presente invención tiene por lo tanto por objeto la utilización de un hongo entomopatógeno de la especie *Beauveria bassiana* como medio de lucha biológica contra *Paysandisia archon*.

La presente invención tiene igualmente por objeto la utilización de un hongo entomopatógeno de la especie *Beauveria bassiana* para el tratamiento de un vegetal contra la infección por *Paysandisia archon*.

Preferentemente, dicho hongo entomopatógeno se selecciona del grupo constituido por:

- la cepa de *Beauveria bassiana*, denominada Bb INRA pyr, depositada en la colección Nacional de Cultivos de Microorganismos (C.N.C.M.) bajo el número I-867 el 7 de junio 1989 (patente FR 2648677, depositada bajo el nº 8908553),
- la cepa de *Beauveria bassiana*, denominada 111B004, depositada en la C.N.C.M. bajo el número I-2960 el 3 de diciembre 2002; y
- la cepa de *Beauveria bassiana*, denominada Bb GHA, depositada en la ATCC (American Type Culture Collection) bajo el número 74250 el 11 de octubre 1993 (patente US 5,939,065).

Según otro modo de empleo ventajoso de dichas utilidades, este hongo entomopatógeno se utiliza en forma de esporas o en forma de micelio. Cuando se utiliza en forma de spora, se trata por ejemplo de conidias (o conidiosporas) o bien de blastosporas. Preferentemente, este hongo se utiliza en forma de conidias.

La preparación de las esporas de hongos entomopatógenos apela a técnicas conocidas por el experto en la materia.

Cuando está en forma de esporas, el hongo se puede formular, por ejemplo, o bien en forma de un producto sólido, o bien en forma de un producto líquido.

Producto sólido: es especialmente posible utilizar directamente las esporas puras. No obstante, es preferible asociar las esporas liofilizadas con un emulsionante adaptado de manera a obtener un polvo humedecible ("wetttable powder"). Por ejemplo, la patente francesa a nombre de INRA, FR 2648677 describe la formulación de esporas puras sobre sus sustratos de fermentación a base de gránulos de arcilla. Como ilustración de la formulación en forma de polvo humedecible, se puede citar el compuesto BotanigardWP® preparado a partir de un polvo humedecible que comprende esporas de la cepa Bb GHA de *Beauveria bassiana*.

Producto líquido: se pueden citar especialmente las suspensiones de esporas preparadas a partir de polvos humedecibles tales como las suspensiones de conidias revestidas con arcilla o las suspensiones de conidias revestidas con gránulos de alginato, descritas en la patente francesa FR 2648677 anteriormente citada. Se pueden citar igualmente las mezclas de esporas con un aceite mineral o vegetal. Ventajosamente, este tipo de mezcla comprende, además, un emulsionante adaptado, de manera a hacer el producto miscible en agua. Este tipo de preparación, que comprende una suspensión de esporas en una emulsión, se describe especialmente en la patente US 5,939,065 (Clifford et al.,), que aplica esta técnica al aislado *B. bassiana* Bb GHA con vistas a una aplicación como micoinsecticida, especialmente contra las abejas, los coleópteros, las chinches de cama o los saltamontes.

Preferentemente, la composición de hongos entomopatógenos utilizable en la presente invención es una composición que, por otro lado, ya ha pasado sus pruebas como agente micoinsecticida contra otros insectos que *P. archon*. Por ejemplo, es posible utilizar el compuesto Botanigard® que comprende esporas de la cepa Bb GHA de *Beauveria bassiana*. Es igualmente posible utilizar el compuesto Ostrinil® que comprende esporas de la cepa Bb 147 de *Beauveria bassiana*. Dicha composición se puede utilizar tal cual o bien diluida por ejemplo en agua o en una emulsión H/E (aceite /emulsionante).

Cuando está en forma de micelio, el hongo se puede formular por ejemplo en forma de un producto líquido tal como una suspensión de micelio del tipo de la suspensión descrita en la patente FR 2648677, anteriormente citada.

Se pueden emplear otras técnicas por el experto en la materia para preparar esporas de hongos entomopatógenos. Por ejemplo, el artículo de síntesis de Feng et al., expone técnicas de fermentación adaptadas a la producción

- masiva de esporas de *Beauveria bassiana*, así como procedimientos de obtención de un polvo de esporas puro de *Beauveria bassiana*. Este artículo proporciona igualmente varios métodos de formulación del hongo *Beauveria bassiana* en forma de esporas (conidias o blastofores) o en forma de un micelio. Otros documentos describen otros procedimientos de preparación de micoinsecticidas (por ejemplo, la solicitud internacional WO 96/21358), utilizables en la presente invención.
- 5
- Según otro modo de empleos ventajosos de dichas utilidades, dicho hongo entomopatógeno se utiliza en combinación con uno u otros varios hongos entomopatógenos.
- Según una disposición ventajosa de este modo de empleo, este otro hongo entomopatógeno pertenece a una familia diferente de la de dicho hongo entomopatógeno.
- 10 Según otra disposición ventajosa de este modo de empleo, este otro hongo entomopatógeno pertenece a un género diferente del de dicho hongo entomopatógeno.
- Según también otra disposición ventajosa de este modo de empleo, este otro hongo entomopatógeno pertenece a una especie diferente de la de dicho hongo entomopatógeno.
- 15 Según otra disposición de este modo de empleo, este otro hongo entomopatógeno pertenece a la misma especie que la de dicho hongo entomopatógeno; ventajosamente se trata de la utilización combinada de las cepas Bb 147 y Bb GHA de *Beauveria bassiana*.
- Se entiende por utilización combinada o utilización en combinación, o bien la utilización de los hongos en forma de una mezcla de varios hongos, o bien la utilización de varias composiciones distintas, comprendiendo cada una un solo hongo. Puede tratarse igualmente de una utilización que asocia una o varias mezclas de varios hongos, con una o varias composiciones que comprenden cada una un solo hongo.
- 20
- En el caso de la utilización de dichos hongos entomopatógenos para tratar un vegetal:
- dicho vegetal se selecciona preferentemente del grupo constituido por (i) los cereales, tales como el maíz, (ii) las palmeras e (iii) las plantas ornamentales tales como las yucas, o las canas provenzales. Preferentemente se trata de una palmera tal como una palmera agrícola (por ejemplo palmera de aceite, datilera, cocotera) o también de una palmera ornamental. Dicha palmera se selecciona por ejemplo del grupo constituido por las palmeras de los géneros *Trithinax*, *Butia*, *Latania*, *Chamaerops*, *Phoenix*, *Livistona*, *Sabal*, *Trachycarpus* y *Washingtonia*; se trata por ejemplo de una palmera seleccionada entre *Chamaerops humilis* y *Trachycarpus fortunei*.
- 25
- dicho tratamiento es un tratamiento curativo. El término curativo se emplea aquí para calificar el tratamiento de un vegetal, tal como una palmera, ya infectada por *Paysandisia archon*. Es el caso, por ejemplo, cuando dicha palmera contiene huevos, larvas y/o crisálidas de *P. archon*. Es igualmente el caso cuando *P. archon* está en estado adulto, por ejemplo cuando está a punto de poner sobre las hojas de la palmera o bien cuando sale del capullo antes de escaparse de la palmera.
- 30
- Dicho tratamiento curativo se puede realizar cualquiera que sea el estado de desarrollo de *Paysandisia archon* (huevo, larva, crisálida, adulto); de manera ventajosa, dicho tratamiento curativo se realiza cuando *P. archon* está en estado de huevo; de manera preferida, se realiza cuando *P. archon* está en estado de larva. Preferentemente además, se realiza cuando *P. archon* está en estado de crisálida; de manera más preferida dicho tratamiento curativo se realiza cuando *P. archon* está en estado adulto.
- 35
- dicho tratamiento es un tratamiento preventivo. El término preventivo se emplea aquí para designar el tratamiento del vegetal, tal como una palmera, aún no infectada por *P. archon*. Designa igualmente el tratamiento de un vegetal que ya ha sido infectado al menos una vez, pero que no contiene más huevos, larvas, crisálidas o adultos de *P. archon*.
- 40
- La presente invención tiene igualmente por objeto un procedimiento para el tratamiento de un vegetal contra una infección por *Paysandisia archon* que comprende una etapa consistente en poner en contacto dicho vegetal con el hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*.
- 45
- La puesta en contacto del vegetal con el hongo entomopatógeno se puede realizar por cualquier tipo de procedimiento en sí conocido por el experto en la materia. Como ejemplo, la puesta en contacto puede comprender la aplicación sobre una, varias o todas las partes aéreas de dicho vegetal (por ejemplo el estípite y/o las palmas de la palmera) de una composición que comprende el hongo entomopatógeno. Dicha aplicación se puede realizar por riego (pulverización o aspersión). Por ejemplo, se puede realizar con ayuda de un pulverizador tal como un pulverizador de espalda, un pulverizador de tractor o cualquier otro tipo de pulverizador. El riego puede tener lugar desde el suelo (por ejemplo con ayuda de torniquete, de rampa o de cañón) o bien desde un punto elevado, tal como una barquilla o un vehículo aéreo. Tal aplicación está especialmente adaptada para un tratamiento preventivo. Conviene también para un tratamiento curativo.
- 50

- 5 La puesta en contacto del vegetal con el hongo entomopatógeno también puede comprender la aplicación de la solución en el interior de dicho vegetal. Por ejemplo, en el caso de una palmera, una aplicación así se puede realizar por inyección a presión de la solución en el estípite (tronco) mediante un inyector adaptado. Se puede efectuar igualmente por perfusión en el estípite (tronco) de la solución que penetra por gravedad entre las fibras del estípite y se reparte allí por capilaridad. La solución también se puede verter directamente en las galerías cavadas por las larvas de *Paysandisia archon*. Tal aplicación es conveniente particularmente para un tratamiento curativo. Se puede realizar además igualmente en el marco de un tratamiento preventivo.
- 10 Según un modo de empleo ventajoso de dicho procedimiento, dicho tratamiento es un tratamiento curativo tal como se ha definido anteriormente; preferentemente, dicho tratamiento se efectúa cuando *P. archon* está en estado de huevo; de manera más preferida se efectúa cuando *P. archon* está en estado de larva; preferentemente también, se efectúa cuando *P. archon* está en estado de crisálida; de manera aún más preferida dicho tratamiento se emplea cuando *P. archon* está en estado adulto.
- 15 Según otro modo de empleo ventajoso de dicho procedimiento, dicho tratamiento es un tratamiento preventivo, tal como se ha definido anteriormente.
- Según además otro modo de empleo ventajoso de dicho procedimiento, dicho hongo entomopatógeno es tal como se ha definido anteriormente.
- 20 Según además otro modo de empleo ventajoso de dicho procedimiento, dicho hongo entomopatógeno está en forma de esporas, tales como las conidias (o conidiosporas) o de blastosporas, o en forma de micelio. De manera ventajosa, dicho hongo está en forma de conidias.
- Según otro modo de empleo ventajoso de dicho procedimiento, dicho hongo entomopatógeno se utiliza en combinación con uno u otros varios hongos entomopatógenos.
- Según una disposición ventajosa de este modo de realización, este otro hongo entomopatógeno pertenece a una familia diferente de la de dicho hongo entomopatógeno
- 25 Según otra disposición ventajosa de este modo de realización, este otro hongo entomopatógeno pertenece a un género diferente del de dicho hongo entomopatógeno.
- Según además otra disposición ventajosa de este modo de realización, este otro hongo entomopatógeno pertenece a una especie diferente de la de dicho hongo entomopatógeno.
- 30 Según otra disposición de este modo de realización, este otro hongo entomopatógeno pertenece a la misma especie que la de dicho hongo entomopatógeno; ventajosamente se trata de la utilización combinada de las cepas Bb 147 y Bb GHA de *Beauveria bassiana*.
- Según una disposición ventajosa de este modo de realización, dicho vegetal se selecciona del grupo constituido por (i) los cereales, tales como maíz, (ii) las palmeras e (iii) las plantas ornamentales tales como las yucas y canas provenzales.
- 35 Preferentemente, dicho vegetal es una palmera tal como una palmera agrícola (por ejemplo palmera de aceite, datilera, cocotera) o también una palmera ornamental. Dicha palmera se selecciona por ejemplo del grupo constituido por las palmeras de los géneros *Trithrinax*, *Butia*, *Latania*, *Chamaerops*, *Phoenix*, *Livistona*, *Sabal*, *Tarchycarpus* y *Washington*; se trata por ejemplo de una palmera seleccionada entre *Chamaerops humilis* y *Trachycarpus fortunei*.
- 40 Además de las disposiciones precedentes, la invención comprende también otras disposiciones que surgirán a partir de la descripción siguiente, que se refiere a ejemplos de realización del objeto de la presente invención. Sin embargo, debe quedar bien entendido que estos ejemplos de dan únicamente a título de ilustración del objeto de la invención, los cuales no constituyen de ningún modo una limitación.
- Ejemplo I: Materiales y métodos**
- 1) Origen de los insectos y de los hongos**
- 45 Los huevos de *Paysandisia archon* proceden de la sociedad VEGETECH (FR).
- Los huevos de *Ostrinia nubilalis* fueron suministrados por el Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) de Surgères (Francia).
- Las larvas de *Cydia pomonella* y de *Plutella xylostella* proceden de la sociedad Natural Plant Protection (Francia).
- 50 La cepa de *Beauveria bassiana* Bb 147 es la cepa utilizada para el producto Ostrinilo® (Arysta Lifescience). Esta cepa fue depositada en la Collection Nationale de Culture de Microorganisme (C.N.C.M.) el 3 de diciembre 2002 bajo el número I-2960) como se ha precisado anteriormente.

La cepa de *Beauveria bassiana* Bb GHA, igualmente denominada Bb GHA 1991, es la cepa utilizada en el producto Botanigard® (Mycotech). Fue objeto de depósito en la A.T.C.C. (American Type Culture Collection) bajo el número 74250, como se ha precisado anteriormente.

2) Métodos de crianza

5 *Paysandisia archon*

Huevos de *Paysandisia archon* de tres lotes diferentes, numerados lotes 1 a 3, se disponen en cajas rectangulares en el hueco de una pequeña casilla sobre arena fina humidificada.

Los huevos de los lotes 1 y 2 se incuban a 25°C bajo un fotoperiodo 16:8 (es decir según varios ciclos de 24 horas constituidos por 16 horas a la luz, seguidas de 8h a oscuras) y con una humedad elevada debida a la arena mojada, hasta su eclosión. Las larvas se crían entonces sobre raquis de palmera a 25°C bajo un fotoperiodo 16:8 esperando la inoculación.

Los huevos del lote 3 se inoculan, como se indica a continuación, después de la recepción sin dejar tiempo a la eclosión

Ostrinia nubilalis.

15 Los huevos de *Ostrinia nubilalis* se incuban a 25°C bajo un fotoperiodo 16:8 y bajo humedad ambiental hasta la eclosión.

Las larvas de *Ostrinia nubilalis* se instalan sobre su medio nutritivo semisintético antes de la inoculación (Darazy-Choubaya (2002)).

Cydia pomonella

20 Las larvas de *Cydia pomonella* se crían sobre un medio nutritivo semisintético (Sender, 1970) a 25°C bajo un fotoperiodo 16:8, hasta la inoculación.

Plutella xylostella

Las larvas de *Plutella xylostella* se crían sobre hojas de col, su planta huésped, a 25°C bajo un fotoperiodo 16:8, hasta la inoculación.

25 3) Producción de esporas de las cepas Bb 147 y Bb GHA de *Beauveria bassiana*

Las cepas Bb 147 y Bb GHA de *Beauveria bassiana* se cultivan en solución nutritiva líquida (sacarosa 115 g/l, proteína 70 g/l), durante 4 días bajo agitación. Las suspensiones así obtenidas, eventualmente ajustadas a 1.10^4 esporas/ml, se extienden entonces en una caja de PDA (Potatoe Dextrose Agar, Biokar Diagnostics) rectangular de tamaño 243 mm x 243 mm. Las cajas se incuban 7 a 10 días a 25°C. Entonces se recogen las esporas rascando la superficie de la gelosa con una rasqueta, después se secan en bolsas Osmofilm (Fischer Bioblock A16994) durante una decena de días a 25°C antes de pasar la bolsa bajo la campana de vacío para permitir una deshidratación aún más potente. Las esporas son separadas por tamiz 100 µm (Fischer Bioblock A82308) con el fin de eliminar los residuos de gelosa, después se conservan a 4°C, se envasan en bolsas de aluminio herméticamente cerradas, en espera de su formulación.

35 Se efectúa entonces un control de la humedad y de las propiedades germinativas de las esporas. Este ha permitido determinar que el porcentaje de humedad relativa es inferior a 5% y que el porcentaje de germinación, calculado en base de la numeración de las esporas, es superior a 95%.

4) Formulación de las esporas

Las composiciones “Bb 147” y “Bb GHA” se formulan como se indica en la Tabla I.

40 **Tabla I:** Composición de las formulaciones realizadas para los ensayos

Ingrediente (% p/p)	Blanco de formulación	“Bb 147”	“Bb GHA”
Esporas puras (tipo)	0%	16%	16%
Aceite mineral	85%	71%	71%
Emulsionante	15%	13%	13%

El blanco de formulación representa el testigo negativo en los ejemplos siguientes.

Una vez diluidas, estas composiciones se utilizarán, salvo que se indique lo contrario, para inocular los huevos y las larvas de *Paysandisia archon* y las larvas de *Ostrinia nubilalis*, de *Cydia pomonella* y de *Plutella xylostella*.

5 A continuación y salvo que se indique lo contrario, las composiciones “blanco de formulación”, “Bb 147” y “Bb GHA” son diluciones a la centésima parte (1/100) de las formulaciones obtenidas según la Tabla I.

Entre los emulsionantes utilizables, se pueden citar la lecitina de soja o también una mezcla en dispersión coloidal de alcohol cetosteárico y de emulsionantes no iónicos a base de éteres poliglicólicos de alcoholes grasos saturados (Emulgade® 1000NI, Henkel).

5) Realización de las inoculaciones

10 A- Inoculación de los huevos de *Paysandisia archon*

Después de la recepción, los huevos de *P. archon* del lote 3 se instalan en cajas rectangulares de compartimentos sobre arena y son inoculados según tres enfoques diferentes de la siguiente manera:

15 14 huevos se inoculan con la composición “blanco de formulación”, 45 huevos con la composición “Bb 147” y 45 huevos con la composición “Bb GHA”. La inoculación se realiza por deposición sobre cada huevo de 4 µl de la composición ensayada.

La incubación se realiza a 25°C y con humedad elevada, bajo un fotoperiodo 16:8.

Después de la eclosión, las larvas se crían sobre raquis de palmera para permitir el cálculo de la supervivencia larvaria.

B- Inoculación de las larvas de *Paysandisia archon*, de *Ostrinia nubilalis*, de *Cydia pomonella* y de *Plutella xylostella*

20 Las larvas de *P. archon*, *O. nubilalis* y de *C. pomonella* se inoculan el mismo día.

a) Ensayo previo

25 Se llevó a cabo una manipulación preparatoria con el fin de evaluar si los coadyuvantes de la formulación pueden ser por sí mismos patógenos para las larvas de *P. archon*. Ésta tiene también como objeto permitir la determinación de la dilución adecuada de las formulaciones a ensayar con el fin de evitar cualquier tropiezo experimental seguido de una supermortalidad de las larvas debida al choque tóxico causado por estos coadyuvantes. Para ello, cinco larvas de *P. archon* fueron inoculadas como se indica anteriormente, con el blanco de formulación diluido al 1/100 y al 1/1000.

30 Resulta que después de 6 días de incubación a 25°C a oscuras, la supervivencia de las larvas era de 100% para la dilución al 1/100 y de 60% para la dilución al 1/1000. Este resultado muestra que los coadyuvantes del blanco de formulación, diluido al 1/100 no son letales para las larvas de *P. archon*. Por consiguiente, se ha decidido trabajar con una dilución al 1/100 de las preparaciones obtenidas según la Tabla I.

b) Inoculación de las larvas de *P. archon*

35 Las larvas procedentes de los huevos de los lotes 1 y 2, de tres días de edad en el momento de la inoculación, se separan del trozo de palmera sobre el cual se habían depositado durante la eclosión de los huevos (véase ejemplo I.2), después se sumergen con una pinza en la solución ensayada durante algunos segundos.

Se inoculan así 30 larvas con la solución Bb 147 y otras 30 con la solución Bb GHA. Para el testigo negativo, se inoculan 30 larvas con la solución “blanco de formulación”. Para el testigo positivo, se inoculan 5 larvas con el polvo de esporas puras Bn 147.

40 Cada larva se deposita después en una cápsula de Petri de 4,5 cm de diámetro, cuyo fondo se recubre con un papel de filtro (Sartorius, Fischer Bioblock A16179) previamente humedecido, y en el cual se coloca un pequeño trozo de raquis de palma.

Las cápsulas se disponen en una barquilla que contiene dos servilletas de tejido humidificadas, recubiertas con una rejilla. Estas barquillas se cierran herméticamente y se incuban a oscuras a 25°C.

c) Inoculación de las larvas de *Ostrinia nubilalis*

45 La piral del maíz es el huésped original de la cepa Bb 147 de *Beauveria bassiana*, este insecto se utiliza como testigo positivo de la aparición de las micosis. La cepa Bb GHA no se ha inoculado en este insecto.

Las larvas, de edad variable, se separan del medio nutritivo sobre el que se habían instalado durante la eclosión de los huevos (véase Ejemplo I.2), después se sumergen con una pinza en la solución ensayada durante algunos segundos.

5 Se inoculan así 15 larvas con la solución Bb 147, y otras 10 con la solución “blanco de formulación” utilizada como testigo negativo.

Los dispositivos de crianza de las larvas de *Ostrinia nubilalis* son idénticos a los utilizados para las larvas de *Paysandisia archon*. El trozo de raquis se reemplaza por un trozo de medio semisintético (véase ejemplo I.2).

d) Inoculación de las larvas de *Cydia pomonella*

10 Las larvas (estado larvario II) se inoculan a razón de 30 larvas por modalidad (composición Bb 147 1/100 o blanco de formulación 1/100). El día de la inoculación, las larvas se extraen de su medio nutritivo y se sumergen en la solución a ensayar. A continuación, se disponen en pequeñas cápsulas de Petri en presencia de un trozo de medio nutritivo. Las cápsulas se incuban a 25°C bajo un fotoperiodo 16:8. La mortalidad de las larvas se controla cada 2 o 3 días durante 14 días. Los porcentajes de mortalidad bruta y corregida se calculan tal como se indica en el ejemplo I.6.

15 e) Inoculación de las larvas de *Plutella xylostella*

El día de la inoculación, las larvas (estado larvario III) se extraen y se embeben con ayuda de un pincel con la solución a ensayar. A continuación se disponen en pequeñas cápsulas de Petri en presencia de un trozo de hoja de col. Las cápsulas se incuban a 25°C bajo un fotoperiodo 16:8. La mortalidad de las larvas se controla 1 día, 3 días, 7 días y 13 días después de la inoculación.

20 **6) Lectura y explotación de los resultados brutos**

La lectura de los resultados para *P. archon* y *O. nubilalis* se realiza a aproximadamente J+3, J+5, J+7, J+10, J+12, J+14, J+17, J+20, J+24 y J+27, es decir respectivamente aproximadamente 3, 5, 7, 10, 12, 14, 17, 20, 24 y 27 días después de la inoculación, de la forma siguiente: para cada insecto, la cápsula se abre debajo de un huésped con flujo laminario, y la larva se busca en el trozo de raquis o de medio nutritivo. Si fuera necesario, se añade alimento. 25 Las cápsulas en donde están las larvas muertas o micosadas se identifican.

El porcentaje de mortalidad bruta se determina según la fórmula siguiente:

$$\% \text{ de mortalidad bruta} = (\text{número de individuos muertos}) / (\text{número de individuos tenidos en cuenta para el ensayo})$$

La mortalidad natural corresponde a la mortalidad bruta en los ensayos testigo (blanco de formulación 1/100).

Con objeto de tener en cuenta la mortalidad natural, la mortalidad bruta se corrige según la fórmula de Abbott:

30 $\% \text{ mortalidad corregida} = [(\% \text{ mortalidad bruta}) - (\% \text{ mortalidad natural})] / [1 - (\% \text{ mortalidad natural})]$

Por ejemplo, si el porcentaje de mortalidad bruta es 35% y el porcentaje de mortalidad natural es 10%, entonces el porcentaje de mortalidad corregida es : $(0,35-0,10) / (1-0,10) = 28\%$

Ejemplo II: Evaluación de la patogenicidad de las cepas Bb 147 y Bb GHA de *Beauveria bassiana* respecto a los huevos de *Paysandisia archon*

35 Para evaluar la patogenicidad de las esporas de *Beauveria bassiana* respecto a los huevos de *Paysandisia archon* se realiza la experiencia siguiente: se inoculan huevos de *P. archon* con, o bien con el blanco de formulación o bien la composición Bb 147 o bien la composición Bb GHA, como se indica en el ejemplo I.5.A. Después de la inoculación, los huevos se incuban en condiciones que permiten la eclosión y la supervivencia de las larvas (ejemplo I.5.A).

40 La patogenicidad de las esporas de Bb 147 y Bb GHA se determina entonces por el cálculo de la supervivencia larvaria, es decir el porcentaje de larvas supervivientes en relación al número total de huevos ensayados. Los resultados obtenidos con la cepa Bb GHA se presentan en la Tabla II.

Tabla II : Determinación de la supervivencia larvaria después de la inoculación de los huevos de *P. archon* con la composición Bb GHA

45

Ensayo	huevos ensayados					Larvas		Supervivencia larvaria
	total	micosados	no micosados			muertas	supervivientes	
			total	no eclosionados	eclosionados			
Blanco de formulación	14	0	14	4	10	1	9	64%
Bb GHA	45	31	14	10	4	2 (muertas y micosadas)	2	4%

Cuando los huevos se inoculan con el testigo (blanco de formulación 1/100), el porcentaje de huevos eclosionados es del orden de 71% (10 huevos eclosionados sobre 14 ensayados). La supervivencia larvaria es del orden de 64% (9 larvas supervivientes sobre 14 huevos ensayados).

- 5 La mortalidad aumenta cuando se utiliza la composición Bb GHA. Efectivamente, 69% de los huevos están micosados y solamente 9% de los huevos eclosionan. La supervivencia larvaria es del orden de 4%.

Resultados similares se obtienen con la composición Bb 147 (no representada), a saber una disminución del número de huevos eclosionados y del porcentaje de supervivencia larvaria en relación al testigo.

- 10 Estos resultados muestran que las esporas de la cepa de *Beauveria bassiana* Bb 147 de una parte, y los de la cepa de *Beauveria bassiana* Bb GHA, de otra parte, son patógenas respecto a los huevos de *Paysandisia archon*.

Ejemplo III: Patogenicidad de las cepas Bb 147 y Bb GHA de *Beauveria bassiana* sobre las larvas de *Paysandisia archon*

Para confirmar los resultados obtenidos con los huevos de *P. archon*, las cepas Bb GHA y Bb 147 se ensayan igualmente sobre las larvas de *P. archon*.

- 15 En un primer tiempo, los inventores han buscado validar la elección de la cepa Bb 147 para este estudio. Para ello, han investigado si la cepa Bb 147 utilizada es muy patógena respecto a su huésped original, la piral del maíz (*Ostrinia nubilalis*). Esta experiencia permite, además, constituir un testigo positivo de patogenicidad de la cepa Bb 147.

- 20 En un segundo tiempo, ensayaron la patogenicidad de las cepas Bb GHA t Bb 147 directamente sobre las larvas de *P. archon* y, como comparación, la patogenicidad de la cepa Bb 147 sobre las larvas de *Cydia pomonella* y de *Plutella xylostella*.

Por último, los inventores estudiaron la relación dosis-efecto entre la cepa Bb 147 y la mortalidad de las larvas de *Paysandisia archon*.

1) Patogenicidad de la cepa Bb 147 de *Beauveria bassiana* respecto a las larvas de *Ostrinia nubilalis*

- 25 En este estudio, las larvas de *Ostrinia nubilalis* se inoculan tal como se indica en el ejemplo I.5.B con, o bien blanco de formulación 1/100, o bien composición Bb 147 1/100.

Los porcentajes de mortalidad bruta y corregida, determinados como se indica en el ejemplo I.6, se presentan en la Tabla III siguiente.

- 30 **Tabla III:** Determinación de los porcentajes de mortalidad bruta y corregida de las larvas de *Ostrinia nubilalis* inoculadas con la composición Bb 147 1/100

Mortalidad	n° de días después de la inoculación	% de mortalidad bruta	% de mortalidad corregida
(Ostrinia nubilalis – Blanco de formulación 1/100)	3	0,0%	
	5	10,0%	
	7	10,0%	
	10	10,0%	
	12	20,0%	
	14	20,0%	
	17	20,0%	
	20	20,0%	
	24	20,0%	
(Ostrinia nubilalis – cepa Bb 147 1/100)	3	6,7%	6,7%
	5	20,8%	11,1%
	7	46,7%	40,7%
	10	46,7%	40,7%
	12	46,7%	33,3%
	14	46,7%	33,3%
	17	46,7%	33,3%
	20	46,7%	33,3%
	24	46,7%	33,3%
27	46,7%	33,3%	

El porcentaje de mortalidad corregida calculado después de la inoculación por la cepa Bb 147 alcanza como máximo 40,7% a J+7 y J+10.

Estos resultados confirman que la composición Bb 147 es patógena respecto a las larvas de *Ostrinia nubilalis*.

5 **2) Patogenicidad de las cepas Bb 147 y Bb GHA de *Beauveria bassiana* respecto a las larvas de *Paysandisia archon*, y de la cepa Bb 147 de *Beauveria bassiana* respecto a las larvas de *Cydia pomonella* y de *Plutella xylostella***

Para ensayar si las cepas Bb 147 y Bb GHA tienen igualmente un efecto patógeno respecto a las larvas de *Paysandisia archon*, se realizó la experiencia siguiente:

10 Las larvas de *Paysandisia archon* se inoculan como se indica en el ejemplo I.5.B, con blanco de formulación 1/100 (modalidad 1), la composición Bb 147 1/100 (modalidad 2), la composición Bb GHA 1/100 (modalidad 3) o el polvo de esporas puras Bb 147 (testigo positivo).

Los porcentajes de mortalidad bruta y corregida se calcularon a continuación como se indica en el ejemplo I.6. La Tabla IV ilustra los resultados obtenidos para la cepa Bb GHA

15 **Tabla IV:** Determinación del porcentaje de mortalidad bruta y corregida de las larvas de *Paysandisia archon* inoculadas con la composición Bb GHA 1/100

Modalidad	n° de días después de la inoculación	% de mortalidad bruta	% de mortalidad corregida
1 (<i>Paysandisia archon</i> - blanco de formulación 1/100)	3	6,7%	
	5	6,7%	
	7	6,7%	
	10	10,0%	
	12	14,3%	
	14	17,9%	
	17	17,9%	
	20	22,2%	
	24	23,1%	
3 (<i>Paysandisia archon</i> - cepa BbGHA 1/100)	3	10,0%	3,6%
	5	36,7%	32,1%
	7	60,0%	57,1%
	10	80,0%	77,8%
	12	80,0%	76,7%
	14	83,3%	79,7%
	17	93,3%	91,9%
	20	93,37%	91,4%
	24	93,3%	91,3%
27	93,3%	90,4%	

El porcentaje de mortalidad corregida, calculado después de la inoculación por la cepa Bb GHA es de 3,6% desde el tercer día; sobrepasa el 50% a J+7 y sobrepasa 90% a J+17.

5 Resultados similares se obtienen con la composición Bb 147 1/100 (modalidad 2) (no representada). El testigo positivo realizado a partir del polvo de esporas puras Bb 147 confirma el efecto patógeno de la cepa Bb 147 respecto a *P. archon*.

Estos resultados muestran que las composiciones Bb 147 y Bb GHA son patógenas respecto a las larvas de *Paysandisia archon*.

10 Los inventores comprobaron, además, que, de manera asombrosa, aunque el huésped original de la cepa Bb 147 sea *Ostrinia nubilalis*, ésta es sin embargo más patógena respecto a *Paysandisia archon* que respecto a *Ostrinia nubilalis* (resultados no representados).

Estos resultados, así como los del ejemplo anterior, demuestran más generalmente la patogenicidad del hongo *Beauveria bassiana* respecto a *Paysandisia archon*.

15 **3) Patogenicidad de la cepa Bb 147 de *Beauveria bassiana* respecto a las larvas de *Cydia pomonella* y de *Plutella xylostella***

La patogenicidad de la cepa Bb 147 se ha ensayado igualmente respecto a las larvas de *Cydia pomonella*, la carpocapsa de las manzanas, y de *Plutella xylostella*, la tiña de las crucíferas.

20 Para ello, larvas de *Cydia pomonella* en estado larvario II, y larvas de *Plutella xylostella* en estado larvario III, fueron inoculadas como se indica en los ejemplos I.5.B.d.) y I.5.B.e.) con las formulaciones “Bb 147” y “blanco de formulación “ (testigo) (diluciones al 1/100 de las formulaciones obtenidas según la Tabla I), las cuales se preparan como se indica en el ejemplo I.4.

Los porcentaje de mortalidad bruta y corregida se calculan como se indica en el ejemplo I.6.

Los resultados se indican en las Tablas V y VI siguientes

Tabla V: Determinación del porcentaje de mortalidad bruta y corregida de las larvas de *Cydia pomonella* inoculadas con la composición Bb 147 1/100.

Modalidad	nº de días después de la inoculación	% de mortalidad bruta	% de mortalidad corregida
1 (Blanco de formulación 1/100)	3	16,7%	
	5	23,3%	
	7	26,7%	
	10	26,7%	
	12	36,7%	
	14	60,0%	
2 (cepa Bb 147 1/100)	3	26,7%	12,0%
	5	33,3%	13,0%
	7	46,7%	27,3%
	10	46,7%	27,3%
	12	46,7%	15,8%
	14	53,3%	0,0%

5 Las mortalidades obtenidas con el blanco de formulación diluido a 1/100 son aproximadamente 25% durante toda la duración del ensayo, después aumentan a partir del día 12 para alcanzar un porcentaje muy importante (60%) 14 días después de la inoculación. Los valores de la mortalidad corregida a J+12 y a J+14 no se deben tener en cuenta puesto que la fórmula de Abbott no es válida más que para mortalidades inferiores a 30%, en el caso del testigo. La mortalidad corregida de las larvas después del tratamiento con la cepa Bb 147 alcanza 27% como máximo 7 y 10 días después de la inoculación.

10 La cepa Bb 147 tiene un efecto patógeno mucho más importante respecto a *P. archon* que respecto a *Cydia pomonella* [27% de mortalidad corregida para la *Carpocapsa* contra 70 a 80% para *Paysandisia archon* 10 días después de la inoculación (no representado)]. La cepa del hongo *Beauveria bassiana* Bb 147 es por lo tanto mucho más patógena respecto a las larvas de *Paysandisia archon* que respecto a las de la *Carpocapsa*; y esto aunque *Cydia pomonella* esté más próxima filogenéticamente de *Ostridia nubilalis*, el huésped original de la cepa Bb 147, que de la mariposa de la palmera.

Tabla VI: Determinación de la mortalidad bruta y corregida de las larvas de *Plutella xylostella* inoculadas con la composición Bb 147 1/100.

Modalidad	Nº de días después de la inoculación	Nº de individuos ensayados	% de larvas vivientes	% de mortalidad bruta
Blanco de formulación 1/100	3	4	75,0%	25,0%
	7	4	50,0%	50,0%
	13	4	50,0%	50,0%
Bb 147 1/100	3	14	85,7%	14,3%
	7	12	50,0%	50,0%
	13	12	33,3%	66,7%

20 La mortalidad bruta en el testigo inoculado con el blanco de formulación es muy importante y alcanza 50% al 7º día después de la inoculación. Es por lo tanto imposible determinar un porcentaje de mortalidad corregida con ayuda de la fórmula de Abbott puesto que ésta no es utilizable más que para mortalidades en los testigos de 30% como máximo.

25 Por consiguiente, un ensayo del Chi-dos (χ^2) multinomial fue realizado con objeto de comparar los porcentajes de larvas vivientes en el testigo y en la modalidad tratada, en cada lectura, con objeto de probar la uniformidad de la distribución entre las dos modalidades. A partir del porcentaje de larvas vivientes en cada modalidad, se calcula un porcentaje teórico, correspondiente a la suma de los porcentajes de larvas vivientes en todas las modalidades,

dividido por el número total de modalidades. El Chi-dos se determina entonces por intermedio de la fórmula siguiente:

$$X^2 = \sum [(\% \text{ larvas vivientes en la modalidad considerada} - \% \text{ teórico})^2 / \% \text{ teórico}]$$

El valor obtenido se compara con el valor leído en la tabla del X^2 en el renglón del 5%.

5 Se obtienen los resultados siguientes:

A J+3 : $X^2=0,712$; $X^2_{0,05}=3,841$; $ddl=1$; número de grupos = 1

A J+7 : $X^2=0,000$; $X^2_{0,05}=3,841$; $ddl=1$; número de grupos = 1

A J+13 : $X^2=3,348$; $X^2_{0,05}=3,841$; $ddl=1$; número de grupos = 1

¹ddl = grado de libertad.

10 Para cada lectura, el Chi-dos calculado es inferior al Chi-dos teórico en el renglón del 5%. Por consiguiente, esto significa que los porcentajes de las larvas vivientes no difieren significativamente entre el testigo y la modalidad tratada. Por lo tanto, no se observó ningún efecto de la formulación de esporas de la cepa Bb 147 sobre las larvas de *Plutella xylostella* en relación al blanco de formulación.

15 Esta cepa de *Beauveria bassiana* es por lo tanto poco patógena, incluso no patógena respecto a larvas de *Plutella xylostella*, por lo tanto está más próxima filogenéticamente de la piral del maíz que de la *Paysandisia archon*.

4) Relación dosis-efecto entre la cepa Bb 147 y la mortalidad de las larvas de *P. archon*

Los ejemplo precedentes permitieron especialmente mostrar que la cepa Bb147 es patógena respecto a *P. archon*.

20 Para verificar si existe una relación dosis-efecto entre la cepa Bb 147 y la mortalidad de las larvas de *P. archon*, los inventores probaron el efecto sobre las larvas de *Paysandisia archon* de una gama de diluciones en agua (diluciones a 1/10, 1/30, 1/100, 1/300 y 1/1000) de una solución madre que comprende $6,89 \cdot 10^{12}$ esporas viables de Bb147 por litro de una mezcla aceite/ emulsionante.

Larvas de *Paysandisia archon* de 1 a 29 días de edad se reparten en seis grupos que reproducen la variabilidad de edad de la muestra total, después cada grupo se ensaya con una dilución como la indicada en la Tabla VII.

Tabla VII: distribución de las diluciones ensayadas en los grupos de larvas estudiadas

Grupo	Dilución	Número de larvas ensayadas
Grupo 1 (testigo)	agua	20
Grupo 2	1/10	20
Grupo 3	1/30	21
Grupo 4	1/100	24
Grupo 5	1/300	25
Grupo 6	1/1000	22

25 El cómputo de las larvas muertas así como el cálculo del porcentaje de mortalidad bruta y corregida se efectúa tal como se indica en el ejemplo 1.6.

Los resultados se representan en la Tabla VIII

Tabla VIII: Relación dosis-efecto de la patogenicidad de Bb 147 respecto a larvas de *P. archon*

ES 2 579 227 T3

Grupo	Número de días después de la inoculación	% Mortalidad bruta	% Mortalidad corregida
Grupo 1 (testigo)	0	0,0%	
	3	0,0%	
	5	0,0%	
	7	0,0%	
	10	0,0%	
	12	0,0%	
	14	0,0%	
	17	0,0%	
	21	0,0%	
	24	0,0%	
	26	0,0%	
	Grupo 2 (1 / 10)	0	0,0%
3		60,0%	60,0%
5		90,0%	90,0%
7		100,0%	100,0%
10		100,0%	100,0%
12		100,0%	100,0%
14		100,0%	100,0%
17		100,0%	100,0%
21		100,0%	100,0%
24		100,0%	100,0%
26		100,0%	100,0%
Grupo 3 (1 / 30)		0	0,0%
	3	38,1%	38,1%
	5	66,7%	66,7%
	7	95,2%	95,2%
	10	95,2%	95,2%
	12	95,2%	95,2%
	14	95,2%	95,2%
	17	95,2%	95,2%
	21	100,0%	100,0%
	24	100,0%	100,0%
	26	100,0%	100,0%
	Grupo 4 (1 / 100)	0	0,0%
3		16,7%	16,7%
5		45,8%	45,8%
7		83,3%	83,3%
10		95,8%	95,8%
12		95,8%	95,8%
14		100,0%	100,0%
17		100,0%	100,0%
21		100,0%	100,0%
24		100,0%	100,0%
26		100,0%	100,0%

Grupo	Número de días después de la inoculación	% Mortalidad bruta	% Mortalidad corregida
Grupo 5 (1 /300)	0	0,0%	0,0%
	3	12,0%	12,0%
	5	24,0%	24,0%
	7	64,0%	64,0%
	10	84,0%	84,0%
	12	88,0%	88,0%
	14	92,0%	92,0%
	17	92,0%	92,0%
	21	92,0%	92,0%
	24	96,0%	96,0%
	26	96,0%	96,0%
Grupo 6 (1 / 1000)	0	0,0%	0,0%
	3	9,1%	9,1%
	5	13,6	13,6%
	7	31,8%	31,8%
	10	45,5%	45,5%
	12	50,0%	50,0%
	14	50,0%	50,0%
	17	54,5%	54,5%
	21	61,9%	61,9%
	24	66,7%	66,7%
	26	66,7%	66,7%

Las larvas inoculadas con la composición que comprende la mayor concentración en esporas Bb147 (dilución al 1/10; grupo 2) tienen una mortalidad corregida de 60% desde el día 3, y 100% desde el día 7 después de la inoculación.

- 5 Cuando las diluciones son más importantes, la mortalidad corregida disminuye: ésta sobrepasa el 95% a partir del día 7 para la dilución a 1/30, a partir del día 10 para la dilución a 1/100 y a partir del día 24 para la dilución a 1/300. La mortalidad es también más baja para la dilución mayor, puesto que alcanza 50% el día 12 y alcanza solamente 66,7% el último día del estudio.

10 Estos resultados muestran que existe una relación dosis-efecto entre las esporas de la cepa Bb 147 y las larvas de *Paysandisia archon*

.Ejemplo IV: Influencia de la edad de las larvas de *Paysandisia archon* sobre su sensibilidad a la cepa Bb 147 de *Beauveria bassiana*

Para determinar si la edad de la larva de *Paysandisia archon* tiene influencia sobre su sensibilidad respecto a las esporas de la cepa Bb 147, se realizó la experiencia siguiente:

- 15 Larvas de *Paysandisia archon* de edades diferentes se reparten en cuatro grupos, de manera que en cada grupo la distribución de las larvas según su edad es la misma que en el grupo de larvas de partida. Las larvas de los grupos 1, 2, 3 y 4 se inoculan respectivamente con el blanco de formulación puro (no diluido), el blanco de formulación 1/100, la composición Bb 147 1/100 y un polvo de esporas Bb 147 puras.

20 No se pudo establecer ninguna correlación entre la edad de las larvas en el momento de la inoculación y su duración de vida. Estos resultados sugieren que la virulencia del hongo no se ve influenciado por la edad de las larvas.

Ejemplo V: Eficacia de la cepa Bb 147 sobre las larvas de *P. archon* en condiciones naturales

Para probar la eficacia de *Beauveria bassiana* en condición natural, las palmeras se trataron preventivamente con la cepa Bb 147, después de la infección se probó sobre las palmeras adultas al aire libre.

20 palmeras de 5 a 6 años, de la especie *Phoenix canariensis*, que miden 30 a 35 cm de altura, se reparten en cuatro grupos de cinco individuos, numerados grupos 1 a 4. Los ensayos se realizan al aire libre, en otoño, en cajas de tipo insect-proof® (Diatex).

5 Las palmeras se tratan preventivamente con dosis variables de Bb 147 en formulación líquida. La solución madre de Bb 147 utilizada comprende $6,89 \cdot 10^{12}$ esporas viables por litro de una mezcla aceite + emulsionante.

Estudios preparatorios permitieron determinar que el volumen de agua necesaria para cubrir toda la superficie foliar a punto de riego es de 400 ml. Las palmeras se tratan pues con 400 ml de la composición a ensayar como se indica en la Tabla IX:

10 **Tabla IX:** Composiciones que comprenden la cepa de Bb 147 utilizada para el tratamiento preventivo de las palmeras

Grupo	Composición ensayada	Evaluación del número de esporas por árbol
Grupo 1 (testigo)	400 ml de agua	0
Grupo 2	0,2 ml de Bb 147 en 400 ml de agua	$1,4 \cdot 10^9$
Grupo 3	0,6 ml de Bb 147 en 400 ml de agua	$4,1 \cdot 10^9$
Grupo 4	2,0 ml de Bb 147 3en 400 ml de agua	$1,4 \cdot 10^{10}$

Algunas horas después del tratamiento, 25 larvas de *P. archon*, de edades de 36 a 43 días, se depositan sobre el follaje de cada árbol, habiendo tenido tiempo de secarse la corona del árbol.

Resultados:

15 a) Tasa de ataque y mortalidad corregida

Lo primeros estragos visuales aparecen al cabo de treinta horas. Se manifiestan por la aparición de serrín en el punto de penetración de la larva. Las observaciones se efectúan a J+39, es decir 39 días después del tratamiento.

La tasa de ataques representa el porcentaje de ataques en relación al número de larvas (25).

La eficacia se determina según la fórmula siguiente:

20 Eficacia de un grupo dado = (tasa de ataques del grupo testigo – tasa de ataque de dicho grupo dado) / tasa de ataque del grupo testigo.

Los resultados se representan en la Tabla X siguiente.

Tabla X: Determinación de la eficacia de la cepa Bb 147 sobre la reducción de la tasa de ataques de las palmeras por las larvas de *P. archon*

Grupo	Ataques visibles	Tasa de ataques	Eficacia
Grupo 1 (testigo)	11	44%	
Grupo 2	6	24%	45%
Grupo 3	3	12%	73%
Grupo 4	1	4%	91%

25 A J+70 aproximadamente, las palmeras se trocean y se descortezan a mano para encontrar las larvas supervivientes o sus cadáveres en el interior del vegetal y evaluar el nivel de estragos para cada grupo de palmeras.

Los resultados se ilustran en la Tabla siguiente.

30 **Tabla XI:** Determinación de los porcentajes de mortalidad bruta y corregida de larvas de *P. archon* después del tratamiento preventivo de las palmeras con la cepa Bb 147.

ES 2 579 227 T3

	Orugas supervivientes	Ataques abortados	Ataques totales	Orugas perdidas	% Mortalidad bruta	% Mortalidad corregida
Grupo 1	13	3	16	9	19%	
Grupo 2	8	11	19	6	58%	48%
Grupo 3	5	15	20	5	75%	69%
Grupo 4	4	18	22	3	82%	78%

5 Los ataques son los puntos de penetración sobre la corona foliar. Ciertos ataques han dado lugar a una galería profunda en la cual la larva está siempre activa. Otros ataques fueron detenidos rápidamente por la muerte de la larva bajo el efecto insecticida de la cepa Bb147 o bien por razones indeterminadas. En las galerías vacías se encuentra corrientemente la cápsula cefálica. Por el contrario, se encuentran muy pocos cadáveres teniendo en cuenta la duración del ensayo.

Se observa muy claramente un efecto dosis sobre la mortalidad de las larvas y el número de ataques que seguían al día del descortezado. En la modalidad más fuerte (grupo 4), la mortalidad se aproxima al 80%.

10 Para los grupos 2 y 3 todas las larvas encontradas vivas en el vegetal han entrado allí por vía periférica de la corona foliar, lo que sugiere que la eficacia de las composiciones ensayadas sobre estos grupos podría mejorar aumentando su volumen.

b) Tamaño de las larvas supervivientes

El tamaño medio inicial de las larvas utilizadas en estos ensayos es de 10 a 12 mm.

15 Las larvas encontradas en las palmeras descortezadas a J+70 fueron medidas y los resultados se representan en la Tabla XII:

Tabla XII: Determinación del tamaño de las larvas supervivientes de *P. archon* después del tratamiento preventivo de las palmeras con composiciones que comprenden la cepa Bb 147

20

Número de la larva	Grupo	Número de la palmera	Longitud (en mm)
1	Grupo 1 (testigo)	1	35
2		1	21
3		1	14
4		2	12
5		2	17
6		2	20
7		3	20
8		3	50
9		3	20
10		4	22
11		4	no medida
12		5	19
13		5	20
14	Grupo 2	1	22
15		2	35
16		2	27
17		2	30
18		3	15
19		3	18
20		3	35
21		4	22

Número de la larva	Grupo	Número de la palmera	Longitud (en mm)
22	Grupo 3	1	6
23		1	6
24		2	17
25		3	11
26		5	32
27	Grupo 4	2	8
28		2	14
29		3	10
30		5	10

Las larvas supervivientes encontradas a J+70 en el grupo 1 (testigo) y en el grupo 2 (pequeña dosis de Bb 147) presentan un tamaño medio de 20 a 25 mm.

En los grupos 3 y 4, el tamaño de las larvas supervivientes es de 10 a 15 mm.

- 5 El conjunto de estos resultados muestra que la cepa Bb 147 de *Beauveria bassiana* presenta una eficacia a dos niveles, a saber una eficacia directa sobre la mortalidad de las larvas y una eficacia indirecta sobre el retraso de crecimiento.

Ejemplo VI: Recapitulación de los ensayos de patogenicidad sobre las larvas de *P. archon*, de *P. xylostella*, de *O. nubilalis* y de *C. pomonella*

- 10 Los ensayos de Chi-dos (χ^2) tales como los descritos en el ejemplo III.3 permitieron comparar los porcentajes de larvas supervivientes, en cada lectura, entre las larvas inoculadas con la formulación testigo (blanco de formulación 1/100) y las larvas inoculadas con la cepa Bb 147 (formulación Bb 147 1/100, y esto para las larvas de *Paysandisia archon*, *Ostrinia nubilalis*, *Cydia pomonella* y *Plutella xylostella*. Así se determinaron los grados de patogenicidad de la cepa Bb 147 respecto a las especies ensayadas, aproximadamente 10 días después de la inoculación.
- 15 Los resultados se recopilan en la Tabla XIII siguiente:

Tabla XIII:

Cepa ensayada	Organismo ensayado	Resultado del ensayo del χ^2 (comparación entre la modalidad ensayada y la modalidad testigo)	Patogenicidad (*)
Bb 147 (<i>B.bassiana</i>)	<i>P. xylostella</i>	Ninguna diferencia significativa (p=0,05)	-/+
Bb 147 (<i>B.bassiana</i>)	<i>C. pomonella</i>	Ninguna diferencia significativa (p=0,05)	-/+
Bb 147 (<i>B.bassiana</i>)	<i>O. nubilalis</i>	Diferencia altamente significativa (p=0,01)	+
Bb 147 (<i>B.bassiana</i>)	<i>P. archon</i>	Diferencia muy altamente significativa (p=0,001)	+++
Bb GHA (<i>B.bassiana</i>)	<i>P. archon</i>	Diferencia muy altamente significativa (p=0,001)	+++

(*) -/+ : poco o no patógeno

+ : patógeno

20 +++ : muy patógeno

Bibliografia

AGUILAR, L., MILLER J.Y., SARITO I MONTEYS V. 2001. A new lepidopteran family for the European fauna. *SHILAP Revta. Lepid.* **29** (113) : 86-87.

AQUINO DE MURO, M., METHA, S., MOORE, D. 2003. The use of amplified fragment length polymorphism for molecular analysis of *Beauveria bassiana* isolates from Kenya and other countries, and their correlation with host and geographical origin. *FEMS Microbiology Letters.* **229** : 249-257.

BARTLETT M.C. & JARONSKI S.T. 1988. Mass production of entomogenous fungi for biological control of insects. In : *Fungi in Biological Control Systems*. Manchester, UK. 61-85.

Darazy-Choubaya. 2002. La perception gustative des phytoectdystéroïdes par les larves de la pyrale du maïs, *Ostrinia nubilalis* Hübner (Lepidoptera, Pyralidae) ; Thèse INA-PG ; Paris ; 149pp

DRESCHER, J. & DUFAY, A. 2002 Importation of mature palms : a threat to native and exotic palms in Mediterranean countries ? *Journal of the International Palm Society.* **46**(4).

FENG, M.G., POPRAWSKI, T.J., KHACHATOURIANS, G.G. 1994. Production, formulation and application of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for Insect Control: current status. *Biocontrol Science and Technology.* **4** : 3-34.

FIGUEIREDO, M.S.F., MARQUES, E.J., DE LIMA, R.O.R., DE OLIVEIRA, J.V. 2002. Seleção de isolados de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. Contra a Broca gigante de Cana-de-Açúcar *Castnia licus* (Drury) (Lepidoptera ; Castniidae). *Neotropical Entomology.* **31**(2) : 397-403.

Fornelli F., ET AL., 2004. *Journal of Invertebrate Pathology,* **85**(2) : 74-79.

GAFUROVA V.L., ET AL., 1980. *Mikrobiologischeskii Zhurnal.* **42**(5) : 591-5.

pine beauty moth, *Panolis flammea* (Lepidoptera : Noctuidae). *Forest Ecology and Management*. **149** : 275-281.

HUMBER, R.A. & HANSEN, K.S. 2005. ARSEF index: Host by Fungus. 28 pp.

http://arsef.fpsnl.cornell.edu/mycology/ARSEF_Culture_Collection.html

MONTAGUD ALARIO, S. 2004. *Paysandisia archon* (Burmeister, 1880) (Lepidoptera, Castniidae), nuevas localizaciones en la Península Ibérica y su gestión. *Bol S.E.A.* **34** : 237-246.

MOORE, D and PRIOR, C. 1993. The potential of mycoinsecticides. *Biocontrol News and Information*. **14**(2): 31N-40N.

SARTO I MONTEYS, V. & AGUILAR, L. 2005. The Castniid Palm Borer, *Paysandisia archon* (Burmeister, 1880), in Europe : comparative biology, pest status and possible control methods (Lepidoptera : Castniidae). *NEVA Nachrichten Entomologischen Vereins Apollo*. **26**(1/2) : 61-94.

SENDER C. 1970. Elevage du Carpocapse des pommes sur un nouveau milieu artificiel d'élevage non spécifique. *Ann. Zool. Anim.* **2**(I), pages 93-95.

REIVINDICACIONES

1. Utilización de un hongo entomopatógeno de la especie *Beauveria bassiana* como medio de lucha biológica contra *Paysandisia archon*.
- 5 2. Utilización de un hongo entomopatógeno de la especie *Beauveria bassiana* para el tratamiento de al menos un vegetal contra una infección por *Paysandisia archon*.
3. Utilización según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, **caracterizada por que** dicho hongo se ha seleccionado del grupo constituido por la cepa de *Beauveria bassiana* depositada en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (C.N.C.M.) con el número I-867 el 7 de junio 1989, la cepa de *Beauveria bassiana* depositada en la C.N.C.M. con el número I-2960 el 3 de diciembre 2002, y la cepa de *Beauveria bassiana* depositada en la ATCC (American Type Culture Collection) con el número 74250 el 11 de octubre 1993.
- 10 4. Utilización según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizada por que** dicho hongo está en forma de esporas o de micelio.
5. Utilización según la reivindicación 4, **caracterizada por que** dicho hongo está en forma de conidias.
- 15 6. Utilización según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizada por que** dicho hongo se utiliza en combinación con al menos otro hongo entomopatógeno.
7. Utilización según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, **caracterizada por que** dicho vegetal es una palmera.
8. Utilización según la reivindicación 7, **caracterizada por que** dicha palmera se ha seleccionado del grupo constituido por las palmeras de los géneros *Trithinax*, *Butia*, *Latania*, *Chamaerops*, *Phoenix*, *Livistona*, *Sabal*, *Trachycarpus* y *Washingtonia*.
- 20 9. Procedimiento de tratamiento de un vegetal contra una infección por *Paysandisia archon* que comprende una etapa que consiste en poner en contacto dicho vegetal con un hongo entomopatógeno de la especie *Beauveria bassiana*.
- 25 10. Procedimiento según la reivindicación 9, **caracterizado por que** dicho hongo entomopatógeno es tal como el definido en la reivindicación 3.
11. Procedimiento según la reivindicación 9 o la reivindicación 10, **caracterizado por que** dicho hongo está en forma de esporas o de micelio.
12. Procedimiento según la reivindicación 11, **caracterizado por que** dicho hongo está en forma de conidias.
- 30 13. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, **caracterizado por que** dicho hongo se utiliza en combinación con al menos otro hongo entomopatógeno.
14. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 13, **caracterizado por que** dicho vegetal es una palmera.
- 35 15. Procedimiento según la reivindicación 14, **caracterizado por que** dicha palmera se ha seleccionado del grupo constituido por las palmeras de los géneros *Trithinax*, *Butia*, *Latania*, *Chamaerops*, *Phoenix*, *Livistona*, *Sabal*, *Trachycarpus* y *Washingtonia*