

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 608 035**

51 Int. Cl.:

A01N 43/90 (2006.01)

A01N 63/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.03.2008 PCT/NZ2008/000052**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.09.2008 WO08111861**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.03.2008 E 08741745 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.10.2016 EP 2136641**

54 Título: **Extracto de planta pesticida que contiene derivados de lolina**

30 Prioridad:

15.03.2007 NZ 55389207

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

05.04.2017

73 Titular/es:

**GRASSLANZ TECHNOLOGY LIMITED (100.0%)
Tennent Drive
Palmerston North, NZ**

72 Inventor/es:

PENNEL, CHRISTOPHER, GERALD, LEE

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Marta

ES 2 608 035 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

Extracto de planta pesticida que contiene derivados de lolina

5 Declaración de las solicitudes correspondientes

La presente solicitud se basa en la memoria descriptiva provisional presentada en relación con la solicitud de patente de Nueva Zelanda n.º 553892.

10 Campo técnico

La invención se refiere a una composición pesticida a base de alcaloides. Más concretamente, la invención se refiere a un producto y a métodos de producción de plantas con una protección mejorada contra las plagas utilizando alcaloides de pirrolizidina producidos de forma natural.

15 Antecedentes de la técnica

Los pesticidas son útiles en la protección de las plantas frente al ataque de varias plagas, incluyendo insectos. Una desventaja de muchos pesticidas actualmente comercializados es el problema (percibido o no) asociado a los productos químicos y a las preocupaciones ambientales. Otro problema es que los productos químicos requieren una manipulación especial y pueden ser venenosos o dañinos para la persona que aplica el producto químico. Lo ideal sería que los pesticidas fuesen de uso habitual, tuvieran efectos ambientales mínimos o nulos, y utilizaran mecanismos de protección ya presentes en la naturaleza referidos en el presente documento como producidos "de forma natural".

Los alcaloides, incluyendo los alcaloides de pirrolizidina, son producidos por endofitos como un metabolito fúngico cuando se producen relaciones simbióticas con especies de plantas, incluyendo gramíneas. Dichos endofitos son valorados en gramíneas debido a la protección contra las plagas que proporcionan los alcaloides producidos a partir de endofitos. En efecto, el endofito proporciona a la planta una estructura natural en la protección contra las plagas.

Normalmente, la transferencia de resistencia a otra planta, por ejemplo, un cultivar alternativo de gramínea, se ha llevado a cabo infectando la planta con el endofito. Ejemplos de este proceso se describen en otras patentes, incluyendo las perseguidas por el solicitante. Un ejemplo adicional es el documento US 7.037.879 que enseña un método con el fin de conferir resistencia a las plagas a las plantas *Poaceae* mediante la adición de una bacteria endofítica aislada con respecto a la planta *Poaceae*. No se realizará enseñanza alguna que no sea transferir un endofito similar a métodos existentes de transferencia de propiedades endofíticas entre cultivares de gramínea. La inoculación puede no ser siempre fácil o incluso posible entre diferentes plantas. Además, las propiedades pesticidas deseadas pueden asimismo no transferirse a otras plantas en las que la inoculación tenga éxito. Igualmente ha de apreciarse que una etapa de inoculación requiere técnicas cuidadosas, lentas y comparativamente costosas.

El documento US 6.372.239 enseña una composición que contiene un "cóctel" de alcaloides de plantas utilizados como insecticida. Los alcaloides descritos incluyen anabasina junto con una amplia variedad de otros alcaloides procedentes de una variedad de plantas. No existe enseñanza en cuanto a los alcaloides que son metabolitos endofitos o los alcaloides que son compuestos de tipo lolina. Las formulaciones descritas también utilizan disolventes polares fuertes con un disolvente preferente que es trementina mineral. Dichos disolventes son indeseables debido a su coste e impacto ambiental.

El documento US 5.185.028 enseña compuestos derivados de lolina sustituidos con N producidos sintéticamente y su uso como pesticida en aplicaciones de pulverización. La memoria descriptiva enseña en contra del uso de compuestos alcaloides de origen natural que reivindicuen compuestos sintéticos con un grupo C₄ a C₂₀R₁ diferente a los compuestos alcaloides de pirrolizidina presentes de manera natural. La memoria descriptiva también enseña que el derivado sintético de lolina se mezcla con disolventes fuertes para formar un líquido que, como se ha indicado previamente, no es deseable. Además, la memoria descriptiva enseña que la solución ha de aplicarse en el lugar para efectos pesticidas, tales como por pulverización en una hoja. Los métodos indirectos de aplicaciones no se enseñan o contemplan en la memoria descriptiva.

Yates *et al* (1990)¹ describen un experimento realizado para determinar la toxicidad de extractos de festuca alta en el que la festuca alta fue infectada por un endofito de *Acremonium coenophialum*. Yates ni enseña ni sugiere la aplicación del extracto a otra planta con el fin de transferir propiedades pesticidas. Yates tampoco atribuye propiedades pesticidas a los alcaloides de pirrolizidina.

¹Yates *et al.*, "Assay of Tall Fescue Seed Extracts, Fractions and Alkaloids Using the Large Milkweed Bug", *J. Agric. Food Chem.* 37:354-357 (1989).

65 El documento US 2004/0141955 enseña un novedoso hongo endofítico denominado "Muscodor" que se utiliza con el fin de conferir una resistencia a las plagas a las plantas mediante la inoculación de especies de Muscodor en la

planta. Otra opción describe el uso de Muscodor estabilizado colocado adyacente o próximo a la planta a proteger y los compuestos volátiles producidos por el Muscodor proporcionan el efecto pesticida. No se hace divulgación alguna con respecto a compuestos de pirrolizidina, extractos de estos compuestos, o introducción de estos compuestos en una planta. Las propiedades pesticidas solo se atribuyen al endofito de Muscodor.

5 Casabuono *et al* 1997 enseña que los alcaloides de lolina de *Festuca argentina* eran asintomáticos y no tóxicos en intervalos de dosis de 31,25 a 125,0 mg/kg en base a estudios en los que se aislaron y se administraron dichos alcaloides a ratones como una suspensión acuosa concentrada. No se hace enseñanza alguna en el papel con respecto al uso de los alcaloides de lolina aislados como pesticida. No obstante, resulta de interés que los alcaloides de lolina, pese a tener un efecto pesticida, no parecen ser particularmente tóxicos, los cuales pueden resultar de utilidad en aplicaciones hortícolas de la presente invención.

10 A partir de la discusión anterior, ha de apreciarse que sería deseable tener una composición pesticida que utilizara mecanismos de protección pesticida presentes en la naturaleza aunque sin la necesidad, por ejemplo, de inocular la planta con un endofito.

15 Es un objeto de la presente invención tratar los problemas anteriores o al menos proporcionar al público una opción útil.

20 No se hace admisión alguna de que cualquier referencia constituya una técnica anterior. La discusión de las referencias expone lo que sus autores afirman, y los solicitantes se reservan el derecho de cuestionar la exactitud y pertinencia de los documentos citados. Se comprenderá claramente que, aunque se hace referencia en el presente documento a un número de publicaciones de la técnica anterior, esta referencia no constituye admisión alguna de que cualquiera de estos documentos forme parte del conocimiento general común en la técnica, en Nueva Zelanda o en cualquier otro país.

25 Se reconoce que el término "comprender" puede atribuirse, en diferentes jurisdicciones, con un significado exclusivo o inclusivo. A efectos de la presente memoria descriptiva, y a menos que se especifique lo contrario, el término "comprender" tendrá un significado inclusivo, es decir, se entenderá una inclusión de no solo los componentes enumerados a los que hace referencia directamente, sino también otros componentes o elementos no especificados. Esta lógica también se utilizará cuando el término "comprendido" o "que comprende" se utilice en relación con una o más etapas de un método o proceso.

35 Otros aspectos y ventajas de la presente invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción.

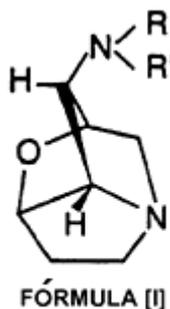
Divulgación de la invención

40 Las composiciones y métodos se describen ahora en relación con el hallazgo inesperado de los inventores de que los efectos pesticidas naturales observados en las combinaciones de gramínea y endofito pueden transferirse a otras plantas sin necesidad de inocular endofitos en plantas sobre las que se van a conferir los beneficios. La invención se define como se establece en las reivindicaciones.

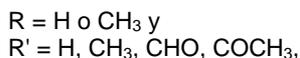
45 A efectos de la presente memoria descriptiva, el término "composición" se refiere a uno o más compuestos en estrecha asociación.

El término "pesticida" se refiere a una composición para disuadir o destruir plagas de plantas, hongos, o animales, incluyendo insectos.

50 De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona una combinación que comprende una planta que tiene una resistencia sistemática a plagas de insectos y una composición pesticida que incluye al menos un compuesto alcaloide de pirrolizidina de Fórmula [I]:

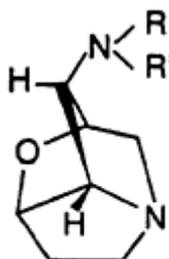


en la que:



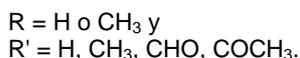
5 en la que la planta no está infectada por un endofito, y en la que la resistencia sistémica a las plagas es una resistencia producida en la planta por la composición absorbida y puesta en circulación por la planta a fin de conferir a la planta la resistencia a las plagas.

10 De acuerdo con un aspecto de la presente divulgación, se describe una composición pesticida obtenida por un método que consiste concretamente en la extracción de una gramínea de la especie *Festuca spp.* y la combinación endofítica utilizando únicamente agua, en el que el extracto contiene al menos un compuesto alcaloide de pirrolizidina, en el que el compuesto de pirrolizidina es de Fórmula [I]:

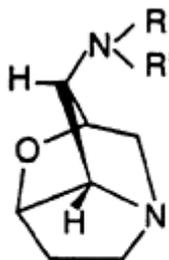


FÓRMULA [I]

15 en la que:

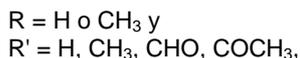


20 De acuerdo con un aspecto adicional de la presente divulgación, se describe una planta con protección potenciada contra las plagas en la que se ha aplicado la composición pesticida de la invención, en la que la composición pesticida incluye al menos un compuesto alcaloide de pirrolizidina de Fórmula [I]:



FÓRMULA [I]

25 en la que:



30 y caracterizada adicionalmente por que la planta no está infectada por un endofito.

De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona un método de producción de una composición pesticida que consiste concretamente en:

- 35
- (a) el cultivo de al menos una gramínea de la especie festuca de los prados o una parte de la misma inoculada con al menos un endofito y,
 - (b) la extracción de al menos un alcaloide de pirrolizidina.

40 Un compuesto a partir de la planta o una parte de la misma inoculado con al menos un endofito utilizando únicamente agua para producir la composición pesticida.

De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona un método que consiste en conferir una protección contra las plagas a al menos una planta por las etapas de:

5 (a) producción de una composición pesticida a partir de una fuente no sintética que contiene al menos un compuesto alcaloide de pirrolizidina extraído; y,

10 (b) aplicación de la composición pesticida al medio en el que la planta crece, permitiendo a la planta absorber la composición a través de las raíces de la planta, en la que la fuente no sintética es al menos una gramínea de la especie festuca de los prados o una parte de la misma inoculada con al menos un endofito.

De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona un método que consiste en conferir una protección contra las plagas a al menos una planta por las etapas de:

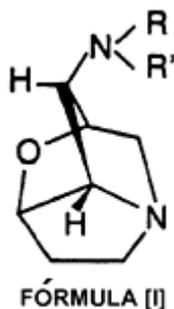
15 (a) cultivo de al menos una gramínea de la especie festuca de los prados o una parte de la misma inoculada con al menos un endofito;

(b) extracción de al menos un compuesto alcaloide de pirrolizidina a partir de la planta o una parte de la misma inoculada con el endofito con únicamente agua para formar una composición pesticida y;

20 (c) aplicación de la composición a las raíces de una planta en la que se va a conferir una protección sistémica contra las plagas de insectos.

De acuerdo con un aspecto adicional de la presente divulgación, se describe el uso de una composición pesticida que consiste en conferir una resistencia a las plagas a al menos una planta en la que la composición contiene al menos un compuesto alcaloide de pirrolizidina derivado de una combinación de gramínea de la especie festuca de los prados y endofito con la estructura de Fórmula [I]:

25



en la que:

30

R = H o CH₃ y
R' = H, CH₃, CHO, COCH₃.

De acuerdo con un aspecto adicional de la presente divulgación, se describe el uso de una gramínea de la especie *Festuca spp.* inoculada con un endofito para producir una composición pesticida que contiene al menos un compuesto alcaloide de pirrolizidina pesticidamente eficaz.

35

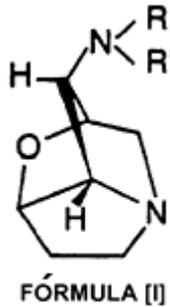
De acuerdo con un aspecto adicional de la presente divulgación, se describe el uso de un endofito que produce al menos un compuesto alcaloide de pirrolizidina cuando se combina con un cultivar de gramíneas de la especie festuca de los prados, con el fin de conferir resistencia a las plagas a una planta que no está infectada por un endofito.

40

En una realización, la composición pesticida incluye al menos un compuesto alcaloide de pirrolizidina producido a partir de una combinación de endofito y una gramínea de la especie *Festuca spp.*

45

Preferentemente, el compuesto o los compuestos alcaloide de pirrolizidina es un compuesto 1-aminopirrolizidina. Más preferentemente, el compuesto o los compuestos alcaloide de pirrolizidina es según la estructura de Fórmula [I]:



en la que:

- 5 R = H o CH₃ y
R' = H, CH₃, CHO, COCH₃.

Más concretamente, la Fórmula [I] incluye:

- 10 lolina en la que R = CH₃ y R' = H;
norlolina en la que R = H y R' = H;
N-metillolina en la que R = CH₃ y R' = CH₃;
15 N-formillolina en la que R = CH₃ y R' = CHO;
N-formilnorlolina en la que R = H y R' = CHO;
20 N-acetillolina en la que R = CH₃ y R' = COCH₃;
N-acetilnorlolina en la que R = H y R' = COCH₃.

25 Preferentemente, la planta o una parte de la misma se deriva del género *Festuca*. Más preferentemente, la planta o una parte de la misma es una gramínea de la especie festuca de los prados o festuca alta. A efectos de la presente memoria descriptiva, se hará ahora referencia a la planta o a una parte de la misma que se deriva de una gramínea de la especie *Festuca spp.*

30 El término "planta o una parte de la misma", como se utiliza en el presente documento, se refiere a la planta entera o a semillas, raíces, hojas, flores, tallos, pseudo-tallos, y similares. En la presente invención, se ha hallado que las semillas son la fuente más preferente para extraer compuestos alcaloides de pirrolizidina, aunque pueden utilizarse otras partes de la planta (o la planta completa). Ha de apreciarse que la parte de planta utilizada puede depender de cuando se producen los mayores niveles de compuestos alcaloides de pirrolizidina y también depende de las técnicas de extracción utilizadas.

35 Como puede apreciarse también, la parte de la planta utilizada puede variar también estacionalmente, así como por ejemplo, los niveles de alcaloides totales por planta aumentan en primavera, alcanzan un pico en la maduración de la semilla, descienden rápidamente con la dispersión de la semilla y la senescencia del tallo, y aumentan de nuevo durante el crecimiento vegetativo a finales del verano.

40 Preferentemente, el endofito utilizado se caracteriza por producir al menos un compuesto alcaloide de pirrolizidina. Más preferentemente, los endofitos incluyen los de los géneros *Epichloe* o *Neotyphodium*.

45 Como se ha indicado previamente, la base de la gramínea está infectada por hongos endofíticos. Dichas combinaciones se conocen adecuadamente en la materia en la que el endofito proporciona una relación simbiótica con la gramínea y proporciona resistencia a las plagas a la gramínea infectada.

50 Preferentemente, la planta a la que se aplica la composición pesticida desarrolla resistencia a las plagas similar a la observada en una combinación de gramínea y endofito, aunque la planta no incluye el endofito. Como puede apreciarse, la inoculación con un endofito es un proceso especializado y un proceso que no funciona en todas las especies de plantas. La inoculación, si tiene éxito, también puede dar lugar a propiedades diferentes, no necesariamente relacionadas con pesticidas. Las ventajas pesticidas del endofito son muy útiles, por tanto, la composición y el método de la presente divulgación permiten la transferencia de propiedades beneficiosas del endofito sin necesidad de pasar por un proceso de inoculación.

En una realización, la resistencia producida en la planta es sistémica por la composición absorbida y puesta en circulación por la planta a fin de conferir a la planta la resistencia a las plagas.

Un ejemplo de este mecanismo de resistencia a las plagas incluye la disuasión directa de las plagas que se alimentan de la planta a través de la producción volátil y/o por un mecanismo de retroalimentación post-digestivo en el que la plaga come una porción de la planta, ingiere toxinas y desarrolla una respuesta aprendida para no comer esa planta de nuevo. Es probable que se produzcan muchas interacciones para causar la resistencia observada.

Preferentemente, la planta tiene resistencia tanto a la alimentación de los brotes de la planta como a la succión de las raíces y los parásitos masticadores. Esta característica de la presente invención resulta particularmente ventajosa ya que proporciona un pesticida de espectro completo que evita la necesidad de utilizar dos o más pesticidas con el fin de conseguir los efectos deseados.

Más concretamente, la resistencia a las plagas puede desarrollarse por al menos: escarabajos abejorros (*Cotelytra zealandica*), larvas porinas (*Wiseana spp*), escarabajos algodoncillos (*Oncopeltus fasciatus*), pulgón spp (*Rhopalosiphum padi* y *Schizaphis graminum*), escarabajo japonés, cigarra espumosa y palomilla dorso de diamante. Como debe ser obvio para los expertos en la materia, se sabe que otros insectos controlados por asociaciones endófitas y vegetales son también candidatos para la protección contra las plagas de acuerdo con la invención. El listado anterior se proporciona solo a modo de ejemplo y no debe considerarse como limitante.

En una realización, se produce una composición pesticida como un extracto acuoso mediante las etapas de molido y mezcla utilizando semillas y agua. Como ha de apreciarse, el molido de la semilla puede producirse antes de la adición de agua y la mezcla o puede producirse simultáneamente con el molido que se produce junto con la mezcla con agua. Un objetivo de la etapa de extracción es liberar los compuestos alcaloides de pirrolizidina de la semilla. Se prevén muchos otros métodos, tales como el uso de otros disolventes que incluyen alcohol en la extracción u otras técnicas de extracción, tales como extracción de fluidos en estado supercrítico, prensado, métodos de filtración, y similares. No obstante, el agua es un disolvente simple, barato y respetuoso con el medio ambiente. Igualmente, el agua es útil en este caso ya que los compuestos alcaloide de pirrolizidina de interés son lo suficientemente solubles en agua como para producir cantidades útiles de estos compuestos en el líquido resultante para formar un extracto o composición pesticida.

Preferentemente, la composición contiene una cantidad pesticidamente eficaz de al menos un alcaloide de pirrolizidina para inducir la respuesta deseada y se predetermina mediante ensayos rutinarios. Cuando la respuesta última sea la resistencia a los insectos, se define "una cantidad eficaz" o una cantidad pesticidamente eficaz" como aquellas cantidades que darán lugar a una resistencia significativa a un grupo de ensayo en comparación con un grupo no tratado. La cantidad efectiva real puede variar con las especies de plantas y/o con la etapa de desarrollo de especies de plagas diana, condiciones ambientales, naturaleza del sustrato, tipo de vehículo, período de tratamiento y otros factores relacionados.

En base a ensayos completados por el inventor, una composición pesticida de extracto líquido que utiliza agua como disolvente y semillas como parte de la planta produce una solución que contiene cantidades eficaces de alcaloides de pirrolizidina. Por ejemplo, los niveles incluyen un contenido en lolina de 311-1.962 ppm, un contenido en N-acetilololina de 36-354 ppm, un contenido en N-acetilnorlolina de 7-88 ppm y un contenido en N-formilololina de 268-1.520 ppm. Las cantidades se proporcionan a modo de ilustración y la composición puede incluir otros alcaloides más allá de los ilustrados en el presente documento. También ha de apreciarse que los métodos de extracción alternativos pueden tener una mayor eficacia de extracción y, por lo tanto, producir una composición de extracto que contenga cantidades mayores (o menores) de los compuestos identificados previamente. También ha de entenderse que otros alcaloides de pirrolizidina presentes en la composición pueden ayudar o influir igualmente en el efecto pesticida.

Asimismo, en base a la experiencia del inventor, es posible diluir considerablemente la concentración del contenido alcaloide en la composición y aún tener un efecto beneficioso. En una realización preferente, puede realizarse un umbral inferior de un 12,5 % en volumen de dilución a partir de una extracción a base de agua de semilla molida y que todavía incluye niveles suficientes de alcaloides de pirrolizidina para conferir un efecto pesticida a las plantas en las que se aplica la solución. Este resultado sugiere que el efecto pesticida de la composición es fuerte y que solo pueden requerirse cantidades mínimas en un producto final, haciendo, por lo tanto, la composición atractiva y comercialmente rentable.

Como se ha indicado previamente, la composición pesticida se aplica a una planta o plantas con el fin de conferir resistencia a las plagas. Preferentemente, el método o métodos de administración incluyen el vertido de una solución acuosa de la composición sobre el medio de cultivo (por ejemplo suelo, abono para macetas, etc.) que rodea las raíces de la planta o plantas y la solución se absorbe en la planta por las raíces de la planta. El mecanismo para esto se entiende como un proceso de lixiviación de la composición en el suelo y la absorción de la planta a través de procesos osmóticos naturales.

Métodos alternativos de administración incluyen también la pulverización de una solución sobre la planta; el vertido de un polvo de la composición sobre la planta directamente o en las proximidades de las raíces de la planta; la impregnación o inmersión de una planta o una parte de la misma en la composición; el espolvoreo de la planta sobre el suelo; la fumigación de la composición, por ejemplo, como un aerosol; la inserción o la colocación de una pastilla sólida de la composición en o adyacente a la planta, por ejemplo, la inserción de la pastilla en un orificio perforado en el tallo de la planta o la unión de la pastilla adyacente al tallo de la planta; la aplicación en forma de perlas o gránulos al medio en el que crece la planta; la inserción de la composición en una línea de riego de plantas; la inserción de la composición en un sistema hidropónico; y combinaciones de los mismos.

Para seguir discutiendo esta cuestión, se hará referencia a la composición que es una solución acuosa regada sobre las raíces de la planta y absorbida en la planta a través de las raíces de la planta.

Las plantas a las que se puede conferir resistencia pesticida no parecen estar limitadas a especie o grupo de especies alguno particular. El inventor ha descubierto que los efectos pesticidas pueden transferirse a otras gramíneas, tales como *Festuca spp.* y *Lolium spp.*, hortalizas del género *brassica*, incluyendo col, cultivos de cereales, tales como cebada, cultivos hortícolas, tales como plantas de tomate y cultivos de floración, tales como rosas. Un resultado sorprendente y útil de la transferencia en una resistencia a las plagas es que los compuestos alcaloides no parecen transferirse a porciones comestibles de la planta, tales como el fruto de la planta. Esto puede ser ventajoso en cultivos hortícolas en los que sería indeseable, al menos desde el punto de vista de la comercialización, si el cultivo incluyera compuestos alcaloides que fuesen ingeridos por seres humanos.

A partir de la descripción anterior se debe apreciar que el inventor ha descubierto que los efectos pesticidas de los endofitos en la gramínea pueden transferirse a otra planta sin tener también que transferir el endofito. En efecto, la relación simbiótica entre una combinación de gramínea y endofito puede transferirse a otras plantas sin necesidad de inocular también la otra planta con el endofito.

Los usos de la composición pesticida y el método pueden incluir aplicaciones hortícolas (por ejemplo, huertas, invernaderos, etc.), viticultura (por ejemplo, para prevenir las plagas en las uvas productoras de vino y plantas destinadas a la producción de uva), agricultura (por ejemplo, para prevenir la depredación de las plagas en los cultivos forrajeros, cultivos de cereales, etc.). La adición del compuesto alcaloide a sistemas de riego por goteo o hidropónicos es también otra opción de uso.

Otra ventaja de la presente composición pesticida y método es que presentan un remedio alternativo "natural" y renovable contra las plagas en plantas contrario a los métodos existentes de control de plagas, tales como el uso de pulverizadores a base de productos químicos, tales como Shield™ para el control de plagas en rosas.

Breve descripción de los dibujos

Otros aspectos de la presente invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción y con referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

La Figura 1 muestra un gráfico que compara los números de pulgones en plantas después de 21 días con y sin tratamiento utilizando una composición pesticida en una situación de cafetería (las macetas se distribuyeron al azar en 5 replicados);

La Figura 2 muestra un gráfico que compara los números de pulgones en plantas después de 27 días con y sin tratamiento utilizando una composición pesticida en una situación de cafetería (al igual que en la Fig. 1);

La Figura 3 muestra un gráfico que compara los números de pulgones en las plantas de festuca sin endófito y raigrás después de 31 días con y sin tratamiento utilizando una composición pesticida en una situación de cafetería (al igual que en la Fig. 1, los pulgones se cuentan cuando las plantas se cosecharon de forma destructiva);

La Figura 4 muestra un gráfico que compara el número de insectos en plantas de cebada con el tiempo con y sin tratamiento utilizando una composición pesticida en una situación de cafetería (los insectos se colocaron en un recinto y pudieron elegir libremente las plantas);

La Figura 5 muestra un gráfico de soluciones de concentración variable de la composición pesticida y el efecto que tuvieron sobre las poblaciones de pulgones maduros con el tiempo;

La Figura 6 muestra un gráfico que puntúa la salud de la planta relativa con el tiempo para las plantas infectadas por poblaciones de pulgones maduros y se trata con soluciones de concentración variable;

65

La Figura 7 muestra un gráfico para soluciones de concentración variable de la composición pesticida y el efecto que tuvieron sobre las poblaciones de pulgones inmaduros con el tiempo; y,

5 La Figura 8 muestra un gráfico que puntúa la salud de la planta relativa con el tiempo para las plantas infectadas por poblaciones de pulgones inmaduros y se trata con soluciones de concentración variable.

Mejor modo de llevar a cabo la invención

10 La invención se describe ahora con referencia a una serie de experimentos completados por el inventor.

Se realizaron experimentos (presentados como ejemplos a continuación) para determinar varios aspectos que son:

- 15 1. ¿Se puede producir una composición pesticida a partir de una combinación de planta/endofito?
- 20 2. ¿Puede la composición pesticida que contiene compuestos de lolina absorberse a través de sus raíces en gramíneas que no incluyen un endofito?
3. ¿Las propiedades pesticidas se transfieren a la planta?
4. ¿La composición y el método confieren resistencia a las plagas con respecto a otros insectos?
5. ¿Las plantas tratadas tendrán un efecto como pesticida en una opción de situación de cafetería?
- 25 6. ¿La composición pesticida se transfiere a las partes comestibles de la planta y por lo tanto influye en si los alimentos producidos de la planta contienen compuestos de lolina?

EJEMPLO 1

30 La semilla producida a partir de una combinación de gramínea de la especie festuca de los prados y endofito se recogió, se molió, y luego se mezcló con agua. La mezcla se molió/maceró posteriormente utilizando un método de agitación vigorosa que mezclaba y fragmentaba las fracciones de semilla. Después de una mezcla completa, la solución resultante se dejó sedimentar con las cáscaras de semillas y otros sólidos que se separan en el fondo del recipiente de mezcla. El líquido en la parte superior del recipiente se recogió, se filtró, y se analizó para determinar

35 que se produjo una composición pesticida y qué cantidades de compuestos seleccionados se extrajeron. El proceso se repitió cinco veces. También se obtuvo una sexta muestra y se analizó a partir de las cáscaras y el residuo del molido número 4. Se halló que este material aún contenía altas concentraciones de compuestos de lolina.

40 Los resultados hallados en términos de diversos compuestos de lolina medidos se muestran a continuación en la Tabla 1.

Tabla 1 - Contenido de la composición pesticida

Molido número	Contenido alcaloide de pirrolizidina [mg/kg o ppm]			
	Total de NAL, NANL y NFL	NAL ¹	NANL ²	NFL ³
1	311	36	7	268
2	464	75	30	359
3	444	70	27	347
4	597	90	40	467
5	423	63	16	344
Residuo de molido número 4	1.962	354	88	1.520

El ejemplo anterior mostró que se puede producir una composición pesticida a partir de una

¹NAL se refiere a N-acetillolina

²NANL se refiere a N-acetilnorlolina

³NFL se refiere N-formilolina, semillas de plantas/endofitos que contienen compuestos alcaloides de pirrolizidina. Los resultados para el residuo extraído sugieren que pueden ser posibles otros métodos de extracción para extraer más alcaloides de pirrolizidina.

EJEMPLO 2

- 5 La composición pesticida del molido número 1 del Ejemplo 1 se regó sobre las raíces de las plantas de festuca y raigrás exentas de endofitos cultivadas en un invernadero en condiciones controladas en macetas rellenas de arena de sílice. Se incluyeron plantas de control en las muestras de plantas y se regaron con un extracto molido sin endofito que no contenía la composición pesticida. Las plantas de ensayo se regaron cada una con 100 ml de cada composición cada dos días con nutrientes regados en días alternos. Después de 21 días, se analizó una submuestra de material foliar para determinar la absorción de la composición pesticida en las plantas ensayadas.
- 10 Los resultados mostrados a continuación en la Tabla 2 para las plantas de festuca exentas de endofitos y la Tabla 3 para las plantas de raigrás exentas de endofitos indican claramente la transferencia de los compuestos alcaloides de pirrolizidina medidos de la composición y en las plantas a través de su sistema de raíces.

Tabla 2 - Alcaloides en plantas de festuca exentas de endofitos

Planta número	Contenido alcaloide de pirrolizidina [mg/kg o ppm]			
	Total de NAL, NANL y NFL	NAL ¹	NANL ²	NFL ³
1	767	119	0	648
2	548	69	0	479
3	577	95	0	482
4	461	56	0	405
5	420	38	0	382
Media	555	75	0	479

15

Tabla 3 - Alcaloides en plantas de raigrás exentas de endofitos

Planta número	Contenido alcaloide de pirrolizidina [mg/kg o ppm]			
	Total de NAL, NANL y NFL	NAL ¹	NANL ²	NFL ³
1	1.366	214	0	1.152
2	828	87	44	697
3	790	84	27	680
4	392	40	0	352
5	376	37	0	340
Media	750	92	14	644
¹ NAL se refiere a N-acetilololina ² NANL se refiere a N-acetilnololina ³ NFL se refiere a N-formilolina				

EJEMPLO 3

- 20 Para ensayar si la protección contra las plagas se transfirió o no a las plantas exentas de endofitos, las plantas utilizadas en el Ejemplo 2 se sometieron a un ataque de pulgones. Debido a que hubo plantas tratadas y no tratadas (control) presentes en la misma área y en las mismas condiciones de cultivo, los pulgones se presentaron con una situación de cafetería en la que pudieron escoger plantas para alimentarse a voluntad y sin otros factores que influyeran.
- 25 El número de pulgones en cada planta se midió después de 21 días, 27 días y 31 días posteriores al inicio del ensayo, siendo eliminados los pulgones después de cada fecha de muestreo.
- 30 Las Figuras 1 a 3 muestran los resultados de este ensayo. Como puede percibirse en los gráficos, el número de pulgones era considerablemente bajo en las plantas tratadas en oposición a las plantas no tratadas que mostraban un efecto pesticida significativo a partir de la aplicación de la composición pesticida. Por lo tanto, resulta evidente que la composición pesticida tiene un efecto pesticida.

EJEMPLO 4

Se completó otro ensayo para determinar si el efecto pesticida se extiende a los insectos que se alimentan de raíces, tales como escarabajos abejorros.

Se produjeron pequeñas muestras de zanahoria y se impregnaron en la composición pesticida a partir del molido número 2 en el Ejemplo 1. Asimismo, se analizaron muestras de tratamiento de control adicionales de zanahoria fresca, zanahoria impregnada en agua y zanahoria impregnada en extracto sin endofitos. Los escarabajos abejorros se alimentaron con las diversas muestras en una disposición de no elección, y después de 3 días, se observó y midió la cantidad de zanahoria consumida.

Las observaciones anotadas fueron que la zanahoria impregnada en la composición pesticida no se comía o solo se comía ligeramente. En cambio, las muestras de control se comieron completamente. Las mediciones comparativas de los escarabajos abejorros ensayadas mostraron que los escarabajos abejorros alimentados con zanahoria tratada mostraron una pérdida de peso en comparación con las muestras de control y la mortalidad en algunos escarabajos abejorros para muestras tratadas no se observa en muestras de control.

El ensayo anterior confirma que la composición pesticida tiene efectos pesticidas sobre plagas que se alimentan de raíces, incluyendo escarabajos abejorros. Los escarabajos abejorros expuestos al material pesticida; rechazado en la siguiente alimentación para consumir zanahorias frescas no tratadas; sugirieron una respuesta de retroalimentación post-digestiva.

EJEMPLO 5

Se completó otro ensayo para determinar si el efecto pesticida podría transferirse a plantas distintas de las de la familia *Graminae*.

La col del género *brassica* se ensayó con la composición pesticida del molido número 3 del Ejemplo 1 regada en las macetas en las que las plantas de col del ensayo se cultivaron en arena de sílice.

Los resultados hallados se muestran en la Tabla 3 a continuación.

Tabla 3 - Col tratada con la composición pesticida

Contenido de alcaloide de pirrolizidina [mg/kg o ppm]			
Total de NAL, NANL y NFL	NAL ¹	NANL ²	NFL ³
154	6	0	148
¹ NAL se refiere a N-acetilcolina			
² NANL se refiere a N-acetilnorcolina			

Los resultados hallados muestran que la transferencia se produce en otras plantas que no sean solo gramíneas.

EJEMPLO 6

Se completó otro experimento para confirmar que el efecto pesticida podría transferirse a otras plantas. El ensayo utilizó plantas de cebada tratadas con la composición pesticida del molido número 5 del Ejemplo 1 junto con muestras de control que no se trataron. Las plantas también se sometieron a un ataque de insectos con el fin de mostrar explícitamente el efecto pesticida y determinar si los insectos respondieron en una situación de cafetería de la manera esperada.

Como se muestra en la Figura 4, el efecto pesticida resultó claramente evidente con un número de insectos considerablemente diferentes entre las muestras de cebada tratadas y no tratadas. El ensayo también muestra nuevamente que el efecto puede transferirse a plantas que no sean gramíneas.

EJEMPLO 7

Las plantas de cebada se ensayaron adicionalmente para determinar la concentración a la que se podría diluir la composición pesticida y aún lograr resultados pesticidas.

Las plantas de cebada se colocaron en un material inerte y las muestras de plantas se trataron con concentraciones variables de composición pesticida producida a partir del molido número 5 del Ejemplo 1. Las concentraciones eran el 100 % de la composición del molido número 5 y se diluyeron utilizando agua en concentraciones del 50 %, 25 %, 12,5 % y 6 %. También se utilizó con una composición sin tratamiento. Se colocaron un total de 10 pulgones en cada planta después del tratamiento (o sin tratamiento para el control) descrito previamente.

El efecto se ensayó utilizando tanto pulgones maduros como inmaduros (pulgones verde de la avena (*R. padi*) con diez insectos colocados en cada planta el día 1 del ensayo. Se esperó que los insectos maduros se multiplicasen rápidamente colocando más estrés en la planta mientras que se espera que los insectos inmaduros tengan un efecto retardado antes de multiplicarse.

5 Como puede percibirse en la Figura 5, los insectos maduros se multiplicaron de la forma esperada en concentraciones inferiores al 25 %, pero para concentraciones de 12,5 % o mayores, la multiplicación se redujo o se detuvo completamente. La Figura 7 muestra que el efecto para insectos inmaduros fue aún más marcado con una concentración de 12,5 %, que es suficiente para detener la multiplicación de insectos.

10 Las Figuras 6 y 8 muestran observaciones de la salud de la planta con el tiempo una vez que las plantas se sometieron a un ataque de insectos. En la Figura 6, la salud de las plantas disminuye rápidamente con tratamientos de baja concentración. En la Figura 8, el efecto es más notable con las plantas que permanecen sanas durante más tiempo a medida que la concentración del tratamiento aumenta. Ha de mencionarse en ambos casos que se podría esperar una caída en la salud de las plantas debido a que la planta depleciona de modo natural el suministro de nutrientes y se somete a un incesante ataque de insectos.

15 El ensayo anterior muestra que el efecto pesticida es fuerte con una dilución al 12,5 % en volumen, sigue proporcionando efectos pesticidas. Con técnicas de extracción mejoradas, ha de apreciarse que es probable que la composición sea rentable debido a las diluciones bajas requeridas para lograr el resultado deseado.

EJEMPLO 8

25 Se completó otro ensayo para determinar si el efecto pesticida podía transferirse a plantas de tomate (*Solatum lycopersicum*) y también para determinar si los alcaloides de pirrolizidina se transfirieron al fruto y/u hojas de la planta.

30 Se cultivaron 30 plantas de tomate en condiciones controladas y se trataron con la solución del molido número 4 del Ejemplo 1 o se dejaron sin tratar (control).

¹NFL se refiere a N-formilololina.

35 Una vez que las plantas crecieron en una etapa en la que aparecieron múltiples frutos verdes y se maduraron, se tomaron muestras para determinar los niveles de compuesto de lolina. Se detectaron compuestos de lolina en tallos de plantas de tomate (15 a 25 ppm), pero no se detectaron compuestos de lolina en las hojas o frutos de la planta.

El ensayo muestra que es improbable que la composición pesticida utilizada en la presente invención pase a través de la cadena alimentaria humana por transferencia de compuestos pesticidas en hojas de fruto producidas por la planta utilizada para productos comestibles.

40 EJEMPLO 9

Se completó otro ensayo utilizando el residuo de semilla del molido número 4 del Ejemplo 1. Como se menciona en el Ejemplo 1, los compuestos pesticidas medidos en el residuo eran aún considerables.

45 El residuo se colocó alrededor de las raíces de las plantas de rosa en el medio que no había sido previamente tratado contra las plagas y se realizaron observaciones de forma regular para buscar cualquier signo visual de ataque de insectos.

50 En el periodo de tiempo observado (más de 20 días), no se realizaron observaciones de ataque de insectos y las rosas permanecieron exentas de plagas, tales como pulgones. Dada la cantidad de pulverizaciones químicas utilizada en las rosas para controlar las plagas, los resultados cualitativos encontrados en este ejemplo son al menos prometedores como un método de tratamiento de plagas alternativo.

55 EJEMPLO 10

Se describen otros métodos de administración.

60 En un ejemplo, las composiciones pesticidas producidas en el Ejemplo 1 se secan y se forman en un polvo. El polvo se esparce entonces en torno a las raíces de la planta y se riega en el suelo. Alternativamente, el polvo puede comprimirse en una pastilla sólida e insertarse en o adyacente al tallo de la planta y se libera en la planta por acción osmótica normal de la planta.

65 El polvo o un líquido también puede formularse con el fin de liberar la composición pesticida de manera lenta o rápida como se utiliza en muchas aplicaciones de fertilizantes. Como ejemplo, un tipo de fertilizante de liberación lenta es un producto llamado Osmocote™ que puede ser un producto granular que libera fertilizante de manera lenta. La composición pesticida de la presente invención puede añadirse al Osmocote™ para producir un producto

de doble finalidad que alimenta una planta y la protege de las plagas.

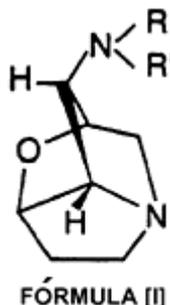
5 Otra opción es pulverizar una solución líquida que contiene la composición pesticida sobre la planta o espolvorear la planta con una composición pesticida en polvo. Otra opción adicional es un aerosol que contiene una composición pesticida o la adición de los compuestos pesticidas a sistemas de riego por goteo o hidropónicos.

10 Ha de apreciarse a partir de los ejemplos anteriores que se proporciona una composición pesticida que contiene compuestos presentes de manera natural. Se ha mostrado que la composición es útil para transferir los efectos pesticidas normalmente atribuidos a la infección endofita de una combinación de endofitos y plantas en una planta que no tiene un endofito. El resultado es que la resistencia a las plagas se confiere a la planta sin necesidad de inoculación.

REIVINDICACIONES

1. Una combinación que comprende una planta que tiene una resistencia sistémica a plagas de insectos y una composición pesticida que incluye al menos un compuesto alcaloide de pirrolizidina de Fórmula [I]:

5



en la que:

10 R = H o CH₃ y
R' = H, CH₃, CHO, COCH₃,

en la que la planta no está infectada por un endofito, y en la que la resistencia sistémica a las plagas de insectos es una resistencia producida en la planta por la composición absorbida y puesta en circulación por la planta a fin de conferir a la planta la resistencia a las plagas.

15

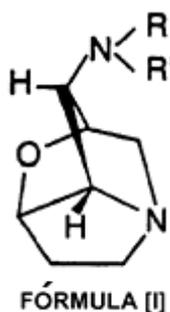
2. Un método de producción de una composición insecticida con propiedades sistémicas durante la aplicación a una planta que consiste en:

20

- (a) el cultivo de al menos una gramínea de la especie festuca de los prados o una parte de la misma inoculada con al menos un endofito y,
- (b) la extracción de al menos un compuesto alcaloide de pirrolizidina a partir de la planta o una parte de la misma inoculada con al menos un endofito utilizando únicamente agua para producir la composición pesticida.

25

3. El método según la reivindicación 2, en el que al menos un compuesto alcaloide de pirrolizidina es un compuesto 1-aminopirrolizidina, preferentemente un compuesto 1-aminopirrolizidina según la estructura de Fórmula [I]:



en la que:

30 R = H o CH₃ y
R' = H, CH₃, CHO, COCH₃.

4. Un método que consiste en conferir una resistencia sistémica a plagas de insectos a al menos una planta por las etapas de:

35

- (a) producción de una composición pesticida a partir de una fuente no sintética que contiene al menos un compuesto alcaloide de pirrolizidina; y,
- (b) aplicación de la composición pesticida al medio en el que la planta crece que permite a la planta, sobre la cual va a conferirse una mayor resistencia a las plagas, absorber la composición a través de las raíces de la planta,

40

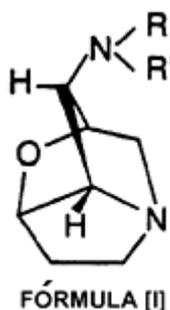
en el que al menos un compuesto alcaloide de pirrolizidina se obtiene por un método que consiste en extraer la fuente no sintética utilizando únicamente agua, y

en el que la fuente no sintética es al menos una gramínea de la especie festuca de los prados o una parte de la misma inoculada con al menos un endofito.

5. Un método para conferir una resistencia sistémica a plagas de insectos a al menos una planta por las etapas de:

- (a) cultivo de al menos una gramínea de la especie festuca de los prados o una parte de la misma inoculada con al menos un endofito;
 (b) extracción de al menos un compuesto alcaloide de pirrolizidina a partir de la planta o una parte de la misma inoculada con al menos un endofito con únicamente agua para formar una composición pesticida y;
 (c) aplicación de la composición a las raíces de una planta en la que se va a conferir una resistencia sistémica a las plagas de insectos.

6. El método según la reivindicación 5, en el que al menos un compuesto alcaloide de pirrolizidina es un compuesto 1-aminopirrolizidina, preferentemente en el que al menos un compuesto alcaloide de pirrolizidina es según la estructura de Fórmula [I]:



en la que:

- R = H o CH₃ y
 R' = H, CH₃, CHO, COCH₃.

7. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 2, 3, 5 y 6, en el que la planta en la etapa (a) se selecciona entre: la planta entera, semillas, raíces, hojas, flores, tallos, pseudo-tallos.

8. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 2, 3, y 5 a 7, en el que el endofito utilizado pertenece al género *Epichloe* o *Neotyphodium*.

9. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8, en el que la planta a la que se aplica la composición pesticida no incluye un endofito.

10. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9, en el que al menos una planta o parte de la misma

- a) consiste en semillas y la etapa de extracción b) consiste en una combinación de mezcla y molido de las semillas con únicamente agua.

11. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 10, en el que dicha aplicación de la composición es el vertido de una solución acuosa de la composición sobre las raíces de la planta o plantas, en el que las plantas absorben la solución a través de las raíces de la planta, o el vertido de un polvo de la composición en la proximidad de las raíces de la planta; o la inserción o la colocación de una pastilla sólida de composición en o adyacente a la planta; o la aplicación como perlas o gránulos al medio en el que crece la planta; o la administración de la composición a través de una línea de riego de planta; o la administración de la composición a través de un sistema hidropónico; o combinaciones de los mismos.

12. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 11, en el que las plantas a las que se confiere resistencia se seleccionan entre el grupo que consiste en: herbáceas que incluyen la especie *Festuca* spp. y *Lolium* spp; hortalizas del género *brassica* que incluyen col; cultivos de cereales que incluyen cebada; cultivos hortícolas que incluyen plantas de tomate; cultivos de floración que incluyen rosas.

13. Un método de producción de una composición pesticida que consiste en extraer al menos un compuesto alcaloide de pirrolizidina a partir de semillas infectadas por un endofito de una gramínea de la especie *Festuca* spp. por la etapa de molido y mezcla utilizando las semillas y únicamente agua, en el que la composición pesticida confiere una resistencia sistémica a plagas de insectos a una planta durante la aplicación a una planta.

- 5 14. El método según la reivindicación 13, en el que la composición pesticida producida sirve para la aplicación a una planta mediante el vertido de una solución acuosa de la composición sobre el prado en crecimiento que rodea las raíces de la planta o plantas, en el que las plantas absorben la solución a través de las raíces de la planta, o por el vertido de un polvo de la composición en la proximidad de las raíces de la planta; o por la inserción o la colocación de una pastilla sólida de la composición en o adyacente a la planta; o por la aplicación como perlas o gránulos al medio en el que crece la planta; o por la administración de la composición a través de una línea de riego de plantas; o por la administración de la composición a través de un sistema hidropónico; o combinaciones de los mismos.



FIGURA 1

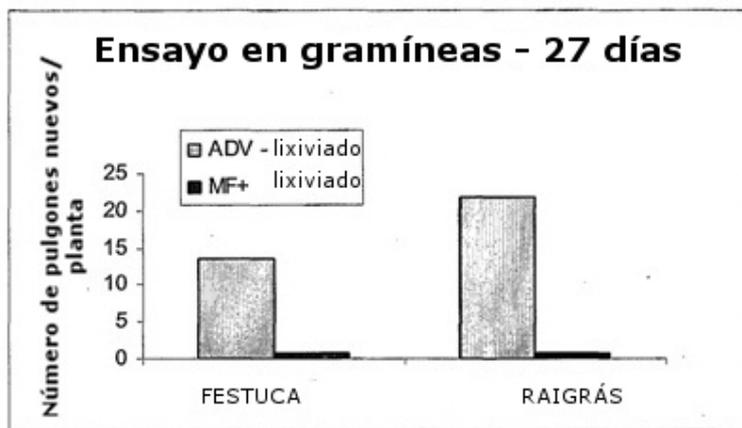


FIGURA 2

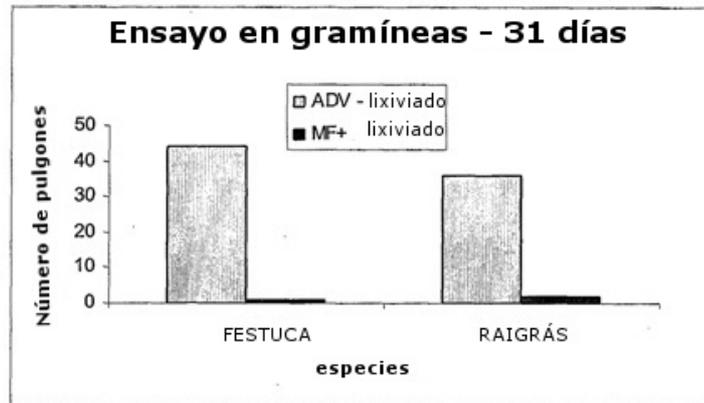


FIGURA 3

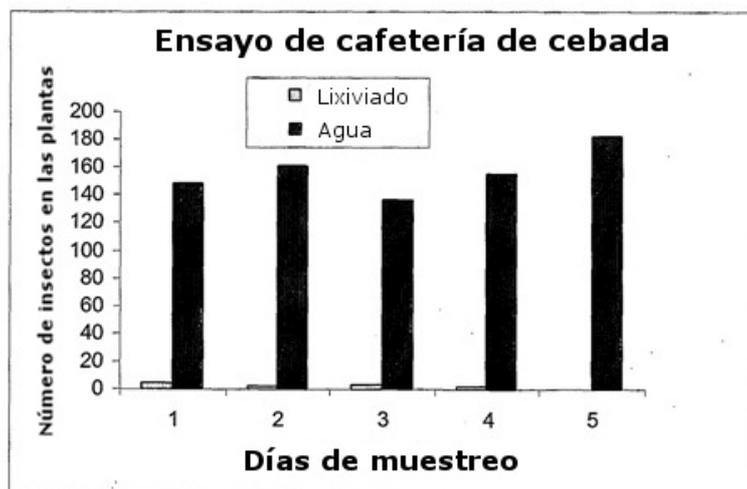


FIGURA 4

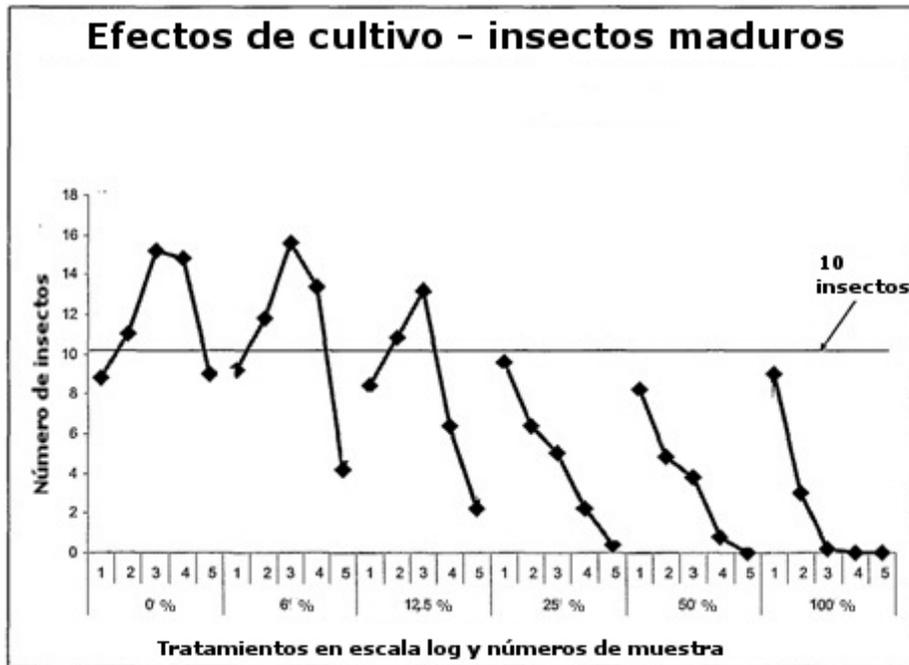


FIGURA 5

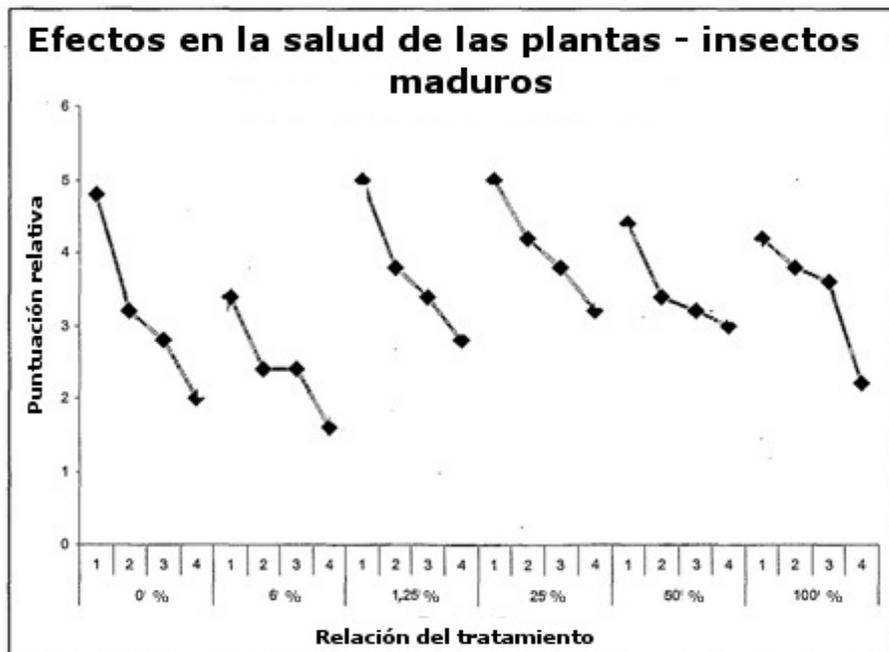


FIGURA 6

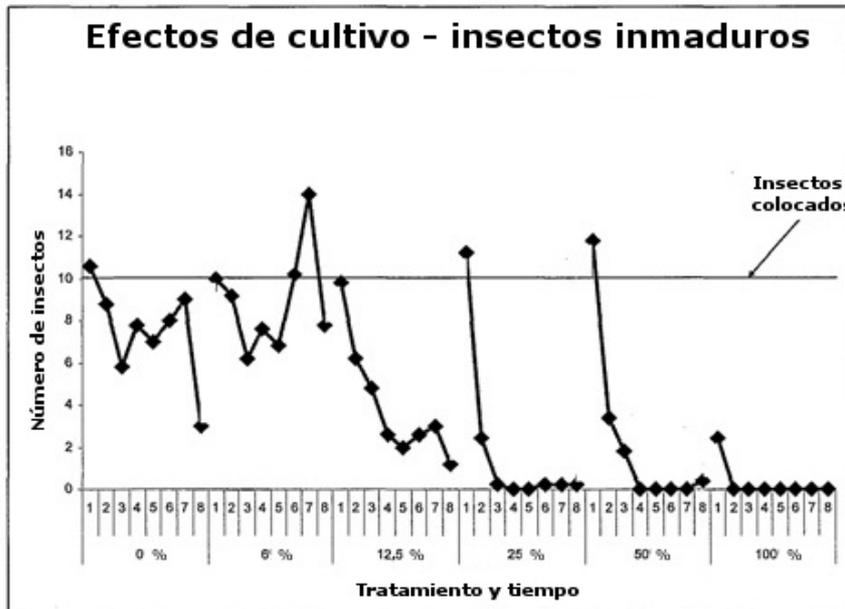


FIGURA 7

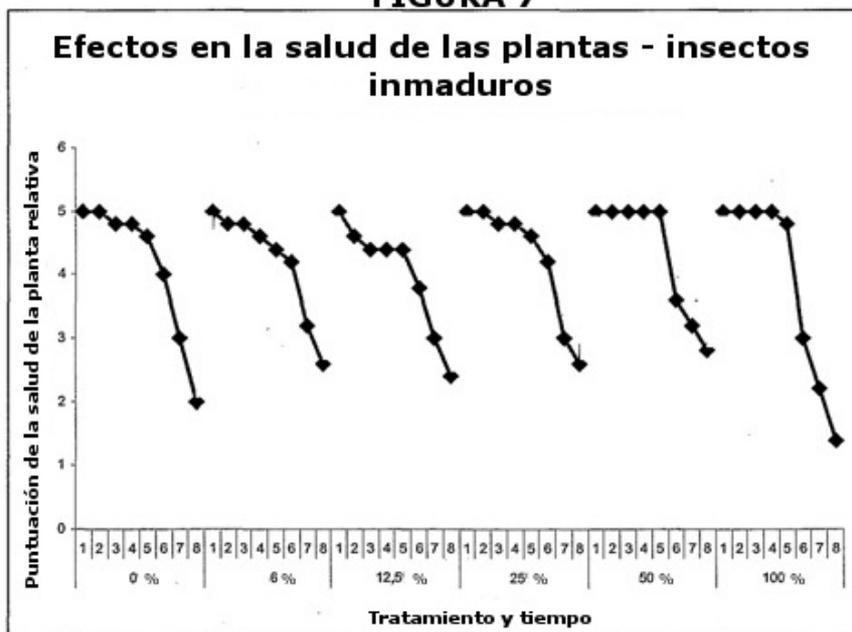


FIGURA 8