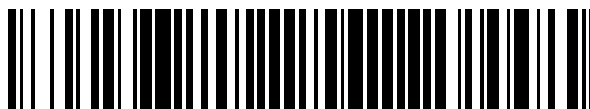


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 653 207**

51 Int. Cl.:

A01N 25/04 (2006.01)
A01P 7/00 (2006.01)
C12N 1/04 (2006.01)
A01N 25/30 (2006.01)
A01N 63/04 (2006.01)
A01N 63/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.05.2012** **PCT/DE2012/000523**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.12.2012** **WO12163322**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.05.2012** **E 12743877 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.09.2017** **EP 2713718**

54 Título: **Preparación líquida para protección biológica de plantas, procedimiento para su producción y uso de la misma**

30 Prioridad:

27.05.2011 DE 102011102632

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

06.02.2018

73 Titular/es:

**BAYER CROPSCIENCE BIOLOGICS GMBH
(100.0%)
Lukaswiese 4
23970 Wismar, DE**

72 Inventor/es:

LÜTH, PETER

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 653 207 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

Preparación líquida para protección biológica de plantas, procedimiento para su producción y uso de la misma

La invención se refiere a una preparación líquida almacenable para la protección biológica de plantas compuesta por una suspensión soluble en agua, que comprende esporas fúngicas, conidios fúngicos, clamidosporas o esclerocios de un hongo o una mezcla de los mismos y un trisiloxano modificado con poliéter, a procedimientos de producción de la misma y al uso de la misma. El área de aplicación es agricultura y silvicultura, incluyendo horticultura y pomicultura y también el cultivo de plantas ornamentales y el establecimiento y mantenimiento de céspedes. A este respecto, el objetivo de la invención es, en particular, la protección biológica de plantas, el fortalecimiento biológico de plantas y la mejora biológica del terreno. El uso de preparaciones basadas en hongos microscópicos u otros microorganismos permite la protección biológica de plantas y, así, el control preventivo o curativo de organismos causantes de enfermedades y organismos perjudiciales sobre la base de mecanismos de acción ecológicos dirigidos contra dichos organismos causantes de enfermedades y perjudiciales. Otros microorganismos, tales como *Trichoderma* spp., *Pythium oligandrum*, *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp. y *Streptomyces* spp., son capaces de causar reacciones en las plantas que conducen a resistencia incrementada contra organismos causantes de enfermedades u otros factores de estrés, tales como sequedad, suministro pobre de nutrientes, niveles de pH desfavorables o alto contenido en sal en el terreno.

Otros microorganismos adicionales tales como *Trichoderma* spp., *Penicillium bilaii*, *Azotobacter* spp., *Azotomonas* spp., *Azospirillum* spp. y *Rhizobium* spp., conducen a una mejora en la disponibilidad de nutrientes en el terreno o directamente en la raíz de la planta.

Tales preparaciones son respetuosas con el medio ambiente y hacen uso de mecanismos reguladores naturales que se han desarrollado en la naturaleza durante el curso de la evolución. La bibliografía divulga diversas formulaciones o preparaciones en las que microorganismos fúngicos constituyen agentes de protección biológica, agentes de fortalecimiento de plantas biológicos y fertilizantes biológicos. Por poner un caso, los microorganismos están formulados en forma de, por ejemplo, gránulos dispersables en agua (WG), polvos dispersables en agua (WP), dispersiones en aceite (OD) o concentrados en suspensión (SC) (Anónimo, 2005).

La formulación tiene que asegurar que los productos tienen un buen período útil de almacenamiento. Esto significa que los microorganismos deben ser capaces de retener su vitalidad durante tanto como sea posible incluso a temperaturas altas.

Los productos deben tener buena solubilidad/capacidad de dispersión en agua, de tal modo que se pueda llevar a cabo el uso por medio de aplicación de pulverización o con la ayuda del sistema de irrigación y los microorganismos (por ejemplo, esporas fúngicas o células bacterianas) pueden distribuirse bien en el terreno, bien sobre la planta o bien sobre un organismo perjudicial. En este sentido, es particularmente importante que los microorganismos no estén aglutinados conjuntamente en agregados en la suspensión acuosa que se va a usar, sino que en lugar de ello deberían aparecer individualmente (por ejemplo, esporas fúngicas o células bacterianas nadando por separado unas de otras en una suspensión). Si se dan agregados en la suspensión acuosa que se va a usar, esto puede conducir a atasco de las boquillas del pulverizador de protección de plantas o que la distribución de la sustancia biológica activa en el terreno, sobre la planta o sobre el organismo perjudicial sea no homogénea, afectando adversamente la acción del producto.

Particularmente, los microorganismos que necesitan ser regados en el terreno para el desarrollo completo de su acción (por ejemplo, para controlar nematodos, insectos del terreno u organismos perforadores del terreno-causantes de enfermedades) pierden su acción, dado que ellos ya se han eliminado por filtración en las capas del terreno superiores si están presentes en la suspensión de uso agregados relativamente grandes.

Diversos microorganismos u órganos de microorganismos, más particularmente conidios fúngicos de los géneros *Beauveria*, *Isaria*, *Nomuraea*, *Metarhizium*, *Paecilomyces* y *Penicillium*, son repelentes de agua. En algunos casos, esta propiedad de los microorganismos adicionalmente obstaculiza su uso. Estos pueden suspenderse mal en agua, distribuirse mal sobre la superficie de plantas o insectos perjudiciales y ser regados en el terreno con dificultad. La desventaja de algunos polvos dispersables en agua es que el drenaje de polvos durante su uso puede evitarse solamente con dificultad y así puede tener lugar contaminación del usuario o del ambiente. Debido a su formulación, muchas preparaciones biológicas contienen solamente una pequeña cantidad de su agente activo. Por ejemplo, hay preparaciones que contienen solamente 1×10^7 o 1×10^8 conidios fúngicos vivos por gramo. En el caso de una cantidad de aplicación mínima que se requiere para una buena acción y que es en muchos casos 1×10^{11} o 1×10^{12} y más conidios fúngicos por hectárea, la concentración de sustancia activa pequeña en las preparaciones da lugar a costes altos (costes relativos a elaboración, almacenamiento, transporte y uso).

Los microorganismos vivos difieren de las sustancias activas sintetizadas químicamente con respecto a, entre otras cosas, período útil de almacenamiento, dado que no son estables en los disolventes convencionales usados. Si están expuestos a condiciones desfavorables, pierden su capacidad de germinación y mueren. Esto tiene lugar en almacenamiento prolongado, durante incubación a temperaturas relativamente altas, tras entrar en contacto con sustancias químicas y similares.

Moore y col. (Biocontrol Science and Technology 1995, pág. 193-199) describen el almacenamiento de conidios de *Metarhizium* en aceite mineral y en distintos aceites vegetales. La estabilidad en almacenamiento varía con la naturaleza del aceite y se puede influir en la misma, gracias a la presencia de antioxidantes, tanto de forma positiva como negativa. Es por lo tanto un objeto de la invención desarrollar una preparación líquida almacenable que contenga esporas fúngicas, conidios fúngicos, clamidosporas o esclerocios de un hongo o mezclas de los mismos. Será almacenable durante un periodo prolongado (al menos 12 meses) con esfuerzo técnico pequeño y con mantenimiento de su vitalidad y agresividad a una temperatura relativamente alta. Además, será fácilmente suspendible en agua y fácilmente distribuible sobre la planta, el organismo objetivo o el terreno. La preparación líquida estará también altamente concentrada.

La invención se realiza de acuerdo con las reivindicaciones 1, 3, 13 y 15. Otros diseños, aspectos y detalles ventajosos de la invención se divulgan por las reivindicaciones dependientes, la descripción y los ejemplos.

El punto de partida de la invención es el hallazgo sorprendente de que la mezcla de microorganismos vivos o sus órganos en trisiloxano modificado con poliéter conduce a una preparación líquida tal. Se ha encontrado adicionalmente que, sorprendentemente, microorganismos vivos mezclados en, es decir, suspendidos en, trisiloxano modificado con poliéter mantienen su vitalidad. Se ha encontrado adicionalmente que es particularmente sorprendente que los microorganismos vivos mantengan su vitalidad durante el almacenamiento durante 12 meses. Fue excepcionalmente sorprendente el hecho de que las esporas fúngicas se pueden suspender en trisiloxano modificado con poliéter al 100 % de concentración como un resultado sin secar aparte. Incluso más sorprendente fue el hecho de que la duración en almacenamiento de las esporas se mejora realmente por la suspensión en un trisiloxano modificado con poliéter.

La suspensión de esporas fúngicas, conidios fúngicos, clamidosporas o esclerocios de un hongo o una mezcla de los mismos en trisiloxano modificado con poliéter produce un concentrado de dispersión (DC). A este respecto, la preparación líquida de acuerdo con la invención se caracteriza por una suspensión que consiste en esporas fúngicas, conidios fúngicos, clamidosporas, esclerocios y trisiloxano modificado con poliéter. La invención es ventajosa porque la vida en almacenamiento del agente biológico de protección de plantas está mejorada de forma decisiva con respecto a los productos de la técnica anterior. La invención es ventajosa también porque los microorganismos repelentes de agua o partes de los mismos pueden suspenderse de forma sustancialmente más efectiva en trisiloxano modificado con poliéter puro que en agua y así, en contraste con las soluciones acuosas, no tiene lugar acumulación de los microorganismos. Si se lleva a cabo disolución/suspensión del producto en agua para uso, estas propiedades permanecen conservadas y así los microorganismos u órganos de los microorganismos pueden distribuirse uniformemente en las plantas o en el terreno. Una ventaja adicional de la invención es que los microorganismos, o las partes de los mismos, suspendidos en trisiloxano modificado con poliéter se pueden mezclar bien con agua y así se pueden obtener diversas concentraciones de uso.

Se conoce a partir de la bibliografía que, por ejemplo, las esporas fúngicas en las suspensiones acuosas se usan con el uso de trisiloxano modificado con poliéter, según está contenido en los productos Silwet o Break-Thru por ejemplo (Akbar y cols., 2005; Gatarayih y cols., 2010; Legaspi y cols., 2000; Wekesa y cols., 2005). Aquí, sin embargo, el trisiloxano modificado con poliéter se mezcla solamente en el agua de la suspensión acuosa de conidios inmediatamente antes del uso de los conidios con el fin de mejorar la aplicabilidad de los conidios. El trisiloxano modificado con poliéter sirve así meramente como un agente humectante y/o agente adhesivo. El uso de tensioactivos no iónicos se menciona también en el documento DE102004011007, pero solamente en el contexto de una formulación basada en aceite y no como tensioactivos puros. Los trisiloxanos modificados con poliéter en forma de tensioactivos no iónicos se usan en agentes de protección de plantas, aunque para suspender sustancias activas sintetizadas químicamente (documentos DE10036003A1, US6117816A). Sin embargo, se desconoce hasta ahora que microorganismos o sus órganos se pueden formular en un trisiloxano modificado con poliéter puro y almacenar en un estado vital durante un periodo prolongado. Además, se desconoce hasta ahora un agente biológico de protección de plantas que consista en una formulación de microorganismos vivos como agente activo en un trisiloxano modificado con poliéter puro.

La invención proporciona en particular una preparación líquida almacenable para protección de plantas biológica que comprende una suspensión que consiste en esporas fúngicas, conidios fúngicos, clamidosporas o esclerocios de un hongo o una mezcla de los mismos y un trisiloxano modificado con poliéter.

A este respecto, es preferible para las esporas fúngicas, conidios fúngicos, clamidosporas o esclerocios de un hongo o una mezcla de los mismos en la preparación líquida de acuerdo con la invención tener una acción antagonista y/o hiperparasítica dirigida contra organismos particulares que causan enfermedades en plantas. Es adicionalmente preferible para las esporas fúngicas, conidios fúngicos, clamidosporas o esclerocios de un hongo o una mezcla de los mismos en la preparación líquida de acuerdo con la invención tener una acción que induzca resistencia y/o tolerancia a estrés que se manifieste por sí misma en plantas o en una acción que incremente la disponibilidad de nutrientes.

Se usan los órganos de hongos, esto de acuerdo con la invención pueden ser esporas, conidios, clamidosporas, esclerocios o una mezcla de dichos órganos. A este respecto, se prefiere particularmente el uso de los siguientes hongos que tienen acción antagonista contra organismos particulares que causan enfermedades en plantas:

- 5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
- Ampelomyces quisqualis*
Beauveria bassiana
Beauveria brongniartii
Clonostachys rosea
Coniothyrium minitans
Gliocladium catenulatum
Isaria spp.
Laetisaria arvalis
Lecanicillium lecanii
Lecanicillium muscarium
Metarhizium anisopliae
Nomuraea rileyi
Paecilomyces lilacinus
Phoma macrostoma
Pythium oligandrum
Talaromyces flavus
Teratosperma oligocladum
Trichoderma spp.
Verticillium biguttatum
- Se usan preferentemente como hongos que mejoran la disponibilidad de nutrientes en el terreno y/o incrementan la resistencia de plantas a factores de estrés (incluyendo organismos causantes de enfermedades y organismos perjudiciales):
- Penicillium bilaii*, *Trichoderma* spp. y todas las especies que pueden clasificarse en el grupo de hongos micorrizales.
- Es adicionalmente preferida de acuerdo con la invención una preparación líquida en la que la sustancia microbiológica activa es una mezcla de los órganos fúngicos ya mencionados o una mezcla, en cada caso, de dos de estos microorganismos. La preparación líquida de acuerdo con la invención se produce como sigue:
- El microorganismo biológicamente activo se cultiva en un medio de cultivo adecuado para este propósito de acuerdo con procedimientos conocidos por sí mismos, por ejemplo fermentación sumergida o fermentación en estado sólido. Tras cultivar, el microorganismo o sus órganos usados preferentemente se separan del sustrato de cultivo. En una variante particular, el sustrato de cultivo cubierto por el microorganismo (especialmente cuando se usan sustratos de cultivo sólidos) se seca por adelantado. Alternativamente, el microorganismo o sus órganos preferentemente usados se pueden secar, por ejemplo con la ayuda de secado por congelación, después de su separación del sustrato de cultivo. Después de la separación y secado opcional, el microorganismo o sus órganos preferentemente usados se suspenden en un trisiloxano modificado por poliéter. El trisiloxano se ha modificado preferentemente con
- éter n-butílico de propilenglicol (PnB), N.º de CAS 29387-86-8 (5131-66-8)
éter n-butílico de dipropilenglicol (DPnB), N.º de CAS 29911-28-2 (35884-42-5)
acetato de éter metílico de dipropilenglicol (DPMA), N.º de CAS 88917-22-0
éter metílico de tripropilenglicol (TPM), N.º de CAS 25498-49-1 y 20324-33-8
éter metílico de propilenglicol (PM), N.º de CAS 107-98-2
acetato de éter metílico de propilenglicol (PMA), N.º de CAS 108-65-6
éter metílico de dipropilenglicol (DPM), N.º de CAS 34590-94-8
éter monometílico de tripropilenglicol.
- Se da preferencia particular al trisiloxano modificado con poliéter Break-Thru y se da preferencia muy particular al trisiloxano modificado con poliéter S240, N.º de CAS 134180-76-0, con el nombre químico oxirano, metil-, polímero con oxirano, éter de mono(3-(1,3,3,3-tetrametil-1-((trimetilsilil)oxi)disiloxanil)propilo).
- Antes de la separación del microorganismo o sus órganos usados preferentemente, el cultivo está opcionalmente seguido por procesamiento del sustrato de cultivo recubierto por medio de un procedimiento de dispersión apropiado o, después de secar, por medio de un procedimiento de molienda apropiado. La separación del microorganismo o sus órganos usados preferentemente se logra después subsiguientemente por procedimientos conocidos por sí mismos, tales como procedimientos de tamizado, filtración, clasificación por aire, decantación o centrifugación.
- De acuerdo con la invención, la preparación líquida se usa como un agente biológico de protección de plantas, como un agente de fortalecimiento de plantas biológico o como un agente mejorador del terreno biológico y si es necesario se diluye con agua a la concentración de uso dependiendo del uso deseado. La preparación se puede mezclar o regar en el terreno, se puede aplicar directamente a las plantas, o se puede usar para tratamiento de semillas.
- Por ejemplo, la preparación se puede usar con los conidios de *Paecilomyces lilacinus* como agente activo para el control biológico de nematodos parásitos de plantas. En el caso de uso de esporas de *Talaromyces flavus*, la

preparación se puede usar para controlar *Verticillium dahliae*, un organismo causante de enfermedad que da lugar a pudrición económicamente significativa en algodón. En el caso de uso de esporas de *Nomuraea rileyi*, la preparación se puede usar para controlar las orugas de diversas especies de mariposas perjudiciales, tales como *Helicoverpa armigera* y *Spodoptera exigua*. El uso de la preparación con el uso de los conidios de *Penicillium bilaii* incrementa la disponibilidad de fósforo mineral en el terreno. La preparación líquida de acuerdo con la invención tiene una duración en almacenamiento larga a temperatura ambiente y es completamente soluble en agua, con el agente microbiano activo que está suspendido en la solución de agua/trisiloxano modificado con poliéter. Por ejemplo, después de almacenamiento de doce meses de la preparación a temperatura ambiente, aún fue posible determinar vitalidad al 92,3 % de los conidios de *P. lilacinus*. La acción de la preparación fue aún suficiente para reducir distintivamente la población del nematodo *Meloidogyne incognita* en el terreno. Por esta razón, la preparación es altamente adecuada para uso comercial. La preparación se almacena y transporta en ausencia de aire en botellas, bolsas, botes o bidones que se han sellado herméticamente. La aplicación es simple debido a la buena solubilidad en agua de la preparación y a la buena suspendibilidad asociada del microorganismo o de sus órganos preferentemente usados en el líquido de pulverización y se puede llevar a cabo por medio de procedimientos de pulverización o por inyección dentro del sistema de irrigación, asegurando la distribución uniforme del agente activo en el terreno, sobre la planta o sobre los organismos perjudiciales a controlarse. En resumen, se determina que la preparación de acuerdo con la invención es notable para almacenamiento fácilmente manejable a temperatura ambiente, transporte libre de problemas, elaboración simple y uso.

La invención se dilucidará ahora más particularmente usando realizaciones ejemplares.

Ejemplo 1

El hongo *Paecilomyces lilacinus* se cultivó en un sustrato sólido adecuado en condiciones axénicas. Después de cultivar, el sustrato de cultivo con los conidios fúngicos situados sobre el mismo se secó.

Los conidios se separaron después del sustrato de cultivo seco con la ayuda de un procedimiento de clasificación por aire y de filtración. En este momento, contenían humedad residual del 8,3 %. 80 g del polvo de conidios seco, que tenía una concentración de $2,8 \times 10^{11}$ conidios por gramo, se suspendieron en 100 ml de trisiloxano modificado con poliéter, preparación comercial Break-Thru S240. La preparación líquida resultante contenía $1,41 \times 10^{11}$ conidios por mililitro y $1,37 \times 10^{11}$ conidios vivos por mililitro. Esto corresponde a una concentración de conidios vivos en la preparación líquida del 97,24 %.

La preparación líquida se incubó a temperatura ambiente (20-22 °C) y la capacidad de germinación de los conidios de *Paecilomyces lilacinus* se determinó mensualmente. Para investigar la capacidad de germinación, se tomaron muestras regularmente, se mezclaron con agua en una proporción de 1:10000, se incubaron durante 5 horas en esta mezcla y se dispersaron en 0,1 ml en un medio de cultivo de agar adecuado. Las placas de agar se incubaron después a 25 °C durante 24 horas y después se examinaron en un microscopio. En este examen, el número de conidios germinados, que son claramente identificables por la formación de un tubo germinal, se determinó y se relacionó con el número de conidios no germinados. Los resultados de los recuentos se muestran en la tabla a continuación.

Tabla 1: Duración en almacenamiento de la formulación líquida de acuerdo con la invención de los conidios de *Paecilomyces lilacinus*

Tiempo de almacenamiento	Conidios germinados (%)
4 semanas	97,2
2 meses	97,4
3 meses	95,4
4 meses	95,8
5 meses	95,1
6 meses	94,1
7 meses	94,7
8 meses	93,0
9 meses	94,1
10 meses	93,5
11 meses	92,8
12 meses	92,3

Ejemplo 2

Se usó una prueba en maceta para investigar la acción de una preparación líquida producida sobre la base de *Paecilomyces lilacinus* sobre la población del nematodo nodulador de las raíces (*Metoidogyne incognita*) en el terreno y también sobre los síntomas causados por el nematodo en raíces de tomates.

Se usó una preparación líquida, como en el ejemplo 1, que contenía exactamente 1×10^{11} conidios fúngicos vivos por mililitro. Las macetas se cargaron cada una con 1000 ml de terreno y se inocularon cada una con 5000 huevos y larvas de *Metoidogyne ingognita*. Para este fin, se hicieron agujeros por presión en el terreno y la suspensión de

nematodos se añadió con pipeta en los agujeros. La preparación líquida se aplicó en el día siguiente a la inoculación. Para este fin, se mezclaron 10 mililitros de la preparación líquida en 10 litros de agua. A partir de la suspensión de conidios resultante, se administraron 10 ml a cada maceta. Después de esto, se regaron las macetas hasta que se saturó el terreno. La cantidad aplicada usada corresponde a una cantidad de preparación líquida de 0,01 ml por maceta o a una concentración de conidios de 1×10^9 conidios por maceta.

7 días después del tratamiento, se plantaron las plantas de tomate de aproximadamente 15 cm de altura en las macetas. El tratamiento se repitió un total de 3 veces, primeramente 3 semanas después de plantar y después cada 4 semanas. La evaluación de la prueba se llevó a cabo 14 semanas después de plantar (3 semanas después de la última aplicación). Como control, se puso a prueba en paralelo una variante no tratada. Ambas variantes, tratada y no tratada, se evaluaron usando 8 replicados. El resultado de la prueba se muestra en la tabla 2.

Tabla 2: Efecto de una preparación líquida que consiste en los conidios de *Paecilomyces lilacinus* suspendida en el trisiloxano modificado con poliéter (Break-Thru S 240) sobre la propagación de *Meloidogyne incognita* y sobre los síntomas causados por nematodos sobre las raíces.

	Número de masas de huevos de <i>M. incognita</i> por raíz	Síntomas de acuerdo con un esquema de puntuación desde 0 hasta 10*
Macetas tratadas con la preparación líquida	49	1,2
Macetas no tratadas	355	5,3
(*) Esquema de puntuación: 0 = ningún síntoma, 10 = plantas muertas		

Ejemplo 3

El hongo *Nomuraea rileyi* se cultivó en un sustrato sólido adecuado en condiciones axénicas. Después de cultivar, el sustrato de cultivo con los conidios fúngicos situados sobre el mismo se secó.

Los conidios se separaron después del sustrato de cultivo seco con la ayuda de un procedimiento de clasificación por aire y de filtración. En este momento, contenían humedad residual del 9,2 %. 7 g del polvo de conidios seco, que tenía una concentración de $8,03 \times 10^{10}$ conidios por gramo, se suspendieron en 100 ml con trisiloxano modificado con éter n-butilico de propilenglicol. La preparación líquida resultante contenía $5,62 \times 10^9$ conidios por mililitro y $5,19 \times 10^9$ conidios vivos por mililitro. Esto corresponde a una concentración de conidios vivos en la preparación líquida del 92,35 %.

La preparación líquida se incubó a temperatura ambiente (20-22 °C) y la capacidad de germinación de los conidios de *Nomuraea rileyi* se determinó mensualmente. Investigando la capacidad de germinación, se tomaron muestras regularmente, se mezclaron con agua en una proporción de 1:2000, se incubaron durante 5 horas en esta mezcla y se dispersaron en 0,1 ml en un medio de cultivo de agar adecuado. Las placas de agar se incubaron después a 25 °C durante 40 horas y después se examinaron en un microscopio. En este examen, el número de conidios germinados, que son claramente identificables por la formación de un tubo germinal, se determinó y se relacionó con el número de conidios no germinados. Los resultados de los recuentos se muestran en la tabla 3.

Tabla 3: Estabilidad en almacenamiento de la formulación líquida de acuerdo con la invención de los conidios de *Nomurea rileyi*

Tiempo de almacenamiento	Conidios germinados (%)
4 semanas	91,3
2 meses	91,5
3 meses	90,3
4 meses	88,8
5 meses	89,5
6 meses	88,1
7 meses	87,1
8 meses	85,3
9 meses	85,9
10 meses	86,7
11 meses	84,0
12 meses	85,2

Ejemplo 4

En una prueba de laboratorio, larvas de *Spodoptera exigua* que tienen una dieta compuesta específicamente se

guardaron en vasos de Plexiglás pequeños (base: 174 mm²) a una humedad del aire relativa del 75 % y a una temperatura de 26 °C +/- 2 °C. 5 días después de la eclosión (2ª fase larvaria), las larvas se trataron con el producto de esporas de acuerdo con la invención. Para este fin, se usó una preparación líquida conteniendo exactamente 5 x 10⁹ conidios fúngicos vivos por mililitro en trisiloxano modificado con éter metílico de tripropilenglicol. Produciendo la suspensión de pulverización, se mezclaron 10 ml o 2 ml de dicha preparación líquida en 4 l de agua. A partir de la suspensión de esporas resultante, se pulverizaron 4 ml sobre un área de 100 cm². Esto corresponde a una cantidad de aplicación de líquido de pulverización de 1000 ml o 200 ml de la preparación líquida por hectárea mezclada en, en ambos casos, 400 litros de agua por hectárea. Los vasos pequeños en los que las larvas se incubaron se situaron, en el momento de la aplicación, en el área sobre la que se aplicó la pulverización. La evaluación de la prueba se llevó a cabo 1, 3 y 7 días después del tratamiento determinando el número de larvas muertas y determinando el grado de mortalidad. En general, se pusieron a prueba 10 larvas por vaso y 3 vasos por variante de prueba.

Tabla 4: Mortalidad de las larvas de *Spodoptera exigua* después de tratamiento con una preparación líquida disuelta en agua que consiste en los conidios del hongo *Nomurea rileyi* suspendidos en trisiloxano modificado con éter metílico de tripropilenglicol.

Tratamiento	Cantidad de aplicación	Mortalidad después de 1 día	Mortalidad después de 3 días	Mortalidad después de 7 días
Variante no tratada	0	0,00 %	0,00 %	9,37 %
Preparación líquida conteniendo los conidios de <i>Nomurea rileyi</i>	200 ml/ha	25,00 %	90,62 %	100,00 %
Preparación líquida conteniendo los conidios de <i>Nomurea rileyi</i>	1000 ml/ha	68,00 %	100,00 %	100,00 %

Bibliografía

Anónimo (2005): Vom Wirkstoff zum Produkt – die Formulierung macht's [Desde sustancia activa hasta el producto—la formulación lo hace posible]. KURIER, Das Bayer CropScience Magazin für moderne Landwirtschaft [KURIER, La Revista de Bayer CropScience para la Agricultura Moderna] 5 (1): 6-9.

Akbar W, Lord JC, Nechols JR, Loughind TM (2005): Efficacy of Beauveria bassiana for Red Flour Beetle When Applied with Plant Essential Oils or in Mineral Oil and Organosilicone Carriers. Journal of Economic Entomology 98(3): 683-688.

Gatarayiha MC, Laing MD, Miller RM (2010): Effects of adjuvant and conidial concentration on the efficacy of Beauveria bassiana for the control of the two spotted spider mite, Tetranychus urticae. Experimental and Applied Acarology 50(3): 217-229.

Legaspi JC, Poprawski TJ, Legaspi BC Jr. (2000): Laboratory and field evaluation of Beauveria bassiana against sugarcane stalkborers (Lepidoptera: Pyralidae) in the lower Rio Grande Valley of Texas. J Econ Entomol. 93 (1): 54-9.

Wekesa VW, Maniania NK, Knapp M, Boga HI (2005): Pathogenicity of Beauveria bassiana and Metarhizium anisopliae to the tobacco spider mite Tetranychus evansi. Experimental and Applied Acarology 36 (1-2): 41-50.

REIVINDICACIONES

1. Una preparación líquida almacenable para la protección biológica de plantas, compuesta por una suspensión soluble en agua, que comprende esporas fúngicas, conidios fúngicos, clamidosporas o esclerocios de un hongo o una mezcla de los mismos y un trisiloxano modificado con poliéter.
- 5 2. Preparación líquida según la reivindicación 1, **caracterizada porque** el hongo basado en o los hongos basados en las esporas fúngicas, los conidios fúngicos, las clamidosporas o los esclerocios tienen una acción antagonista y/o hiperparásita dirigida contra organismos causantes de enfermedades en plantas o porque el hongo o la mezcla de hongos tienen una acción inductora de resistencia que se manifiesta en plantas, una acción inductora de tolerancia a estrés o una acción que incrementa la disponibilidad de nutrientes.
- 10 3. Un procedimiento de producción de una preparación líquida según las reivindicaciones 1 o 2, **caracterizado porque** se cultiva un hongo y después las esporas, los conidios, las clamidosporas o los esclerocios formados se suspenden en un trisiloxano modificado con poliéter.
4. Preparación líquida según las reivindicaciones 1 o 2, **caracterizada porque** el trisiloxano modificado con poliéter es Break-Thru® S240.
- 15 5. El procedimiento según la reivindicación 3, **caracterizado porque** el trisiloxano modificado con poliéter es Break-Thru® S240.
6. Procedimiento según las reivindicaciones 3 y 5, **caracterizado porque** las esporas, los conidios, las clamidosporas o los esclerocios se procesan por medio de procedimientos de molienda y/o dispersión.
- 20 7. Procedimiento según la reivindicación 6, **caracterizado porque** las esporas, los conidios, las clamidosporas o los esclerocios se aíslan después del procesado mediante procedimientos de tamizado, filtración, clasificación por aire o centrifugación.
8. Preparación líquida según una de las reivindicaciones 1, 2 y 4, **caracterizada porque** se emplean las especies fúngicas *Ampelomyces quisqualis*, *Beauveria bassiana*, *Beauveria brongniartii*, *Clonostachys rosea*, *Coniothyrium minitans*, *Gliocladium catenulatum*, *Isaria* spp., *Laetisaria arvalis*, *Lecanicillium lecanii*, *Lecanicillium muscarium*, *Metarhizium anisopliae*, *Nomuraea rileyi*, *Paecilomyces lilacinus*, *Phoma macrostoma*, *Pythium oligandrum*, *Talaromyces flavus*, *Teratosperma oligociadum*, *Trichoderma* spp., *Verticillium biguttatum*.
- 25 9. Preparación líquida según la reivindicación 8, en la que la especie fúngica es *Paecilomyces lilacinus*.
10. El procedimiento según una de las reivindicaciones 3, 5, 6 y 7, **caracterizado porque** se emplean las especies fúngicas *Ampelomyces quisqualis*, *Beauveria bassiana*, *Beauveria brongniartii*, *Clonostachys rosea*, *Coniothyrium minitans*, *Gliocladium catenulatum*, *Isaria* spp., *Laetisaria arvalis*, *Lecanicillium lecanii*, *Lecanicillium muscarium*, *Metarhizium anisopliae*, *Nomuraea rileyi*, *Paecilomyces lilacinus*, *Phoma macrostoma*, *Pythium oligandrum*, *Talaromyces flavus*, *Teratosperma oligociadum*, *Trichoderma* spp., *Verticillium biguttatum*.
- 30 11. Procedimiento según la reivindicación 10, en el que la especie fúngica es *Paecilomyces lilacinus*.
12. Preparación líquida según una de las reivindicaciones 1, 2, 4, 8 y 9, **caracterizada porque** las esporas fúngicas, los conidios fúngicos, las clamidosporas o los esclerocios de un hongo son una mezcla procedente de varios hongos.
- 35 13. Un uso de una preparación líquida según una de las reivindicaciones 1, 2, 4, 8, 9 y 12 mediante mezclado en el terreno, aplicación a/sobre la planta o tratamiento de semillas.
14. Uso según la reivindicación 13, **caracterizado porque** la preparación líquida se diluye con agua hasta la concentración de uso deseada dependiendo del uso pretendido.
- 40 15. Uso de trisiloxano modificado con poliéter como agente de almacenamiento o de suspensión para las esporas fúngicas, los conidios fúngicos, las clamidosporas o los esclerocios destinados a la protección biológica de plantas.