

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 667 204**

51 Int. Cl.:

A01N 63/00 (2006.01)

A01P 7/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.03.2008 PCT/IE2008/000027**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.10.2008 WO08117262**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.03.2008 E 08719885 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.01.2018 EP 2139339**

54 Título: **Formulación para el control biológico de plagas de insectos**

30 Prioridad:

23.03.2007 EP 07394004

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

10.05.2018

73 Titular/es:

NEMOS HORTICULTURAL LIMITED (100.0%)

67 Kincora Drive Clontarf

Dublin 3, IE

72 Inventor/es:

AL-AMIDI, ABDULHAMID, H., K.

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

Observaciones :

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

ES 2 667 204 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

Formulación para el control biológico de plagas de insectos

5 **Introducción**

La invención se refiere a una formulación para su uso en el control biológico de plagas de insectos que comprende una cohorte de nematodos parasitarios de insectos juveniles infecciosos.

10 **Antecedentes de la invención**

Los nematodos entomopatógenos se refieren a nematodos que son parasitarios frente a una o más especies de insectos. El orden más importante de nematodos entomopatógenos es el *Rhabditida*, que contiene varias familias, muchos de cuyos miembros son parasitarios frente a insectos. Los *Steinernematidae* y los *Heterorhabditidae* son miembros bien conocidos de este orden (*Rhabditida*). Ambas familias, *Steinernematidae* y *Heterorhabditidae*, contienen varias especies, cada una especializada para atacar a un grupo específico de plagas de insectos (tabla 1). Aunque las dos familias no están estrechamente emparentadas, desde el punto de vista filogenético, ambas comparten historias vitales similares. El ciclo comienza con un juvenil infeccioso (juvenil que no se alimenta), cuya única función es buscar e infectar nuevos huéspedes. Tras entrar en el insecto por medio de aberturas naturales del cuerpo, boca, ano, espiráculos o zonas de cutícula delgada, los juveniles infecciosos liberan una bacteria mutualista asociada. Estas bacterias del género *Xenorhabdus* o *Photorhabdus*, asociadas con *Steinernematidae* y *Heterorhabditidae*, respectivamente, provocan la mortalidad del huésped en un plazo de 48 horas.

Las estrategias de búsqueda de huéspedes de los nematodos entomopatógenos varían entre especies, y determinan su distribución de profundidad de tierra y su preferencia de huésped. Para encontrar huéspedes, los juveniles infecciosos usan estrategias que varían basadas en búsqueda de huéspedes mediante emboscada o deambulación o una combinación de ambas. Con el fin de emboscar a una presa, algunas especies de *Steinernema* alzan sus cuerpos de la superficie de la tierra para obtener una mejor postura para adherirse a los insectos que pasan. Otras especies adoptan una estrategia de deambulación, recorren la tierra buscando posibles huéspedes. Estas estrategias de búsqueda de huéspedes influyen en qué huéspedes infectan los nematodos. Por ejemplo, los depredadores por emboscada tales como *Steinernema carpocapsae* infectan más insectos en la superficie, mientras que los depredadores por deambulación como *Heterorhabditis bacteriophora* infectan insectos que viven en la profundidad de la tierra.

Uno de los principales problemas que surgen con el uso de productos de control biológico existentes, comercialmente disponibles, es que los productos contienen solamente una especie de los nematodos beneficiosos anteriores y, como tales, pueden controlar solamente una única o un grupo de especies de insectos objetivo, haciéndolos económicamente poco viables en comparación con el uso de pesticidas químicos que controlan una amplia gama de especies de insectos, sean estas beneficiosas o plagas, en una aplicación. Los agricultores comerciales no adoptarán agentes de control biológico que no proporcionen una eficacia comparable a la de los insecticidas químicos habituales.

Neumann *et al.* (2006) estudiaron las interacciones y separación espacial entre un heterorhabdítico y dos especies de nematodos de *Steinernematidae* con diferentes estrategias de búsqueda de huéspedes dentro de una columna de arena. Introdujeron los nematodos 7 días antes de que se introdujese el huésped en el sistema. Encontraron que cada especie individual obtuvo mejores rendimientos por sí sola que en una combinación de tres especies. También encontraron que esto era así a todas las profundidades, a excepción de la especie de búsqueda de huéspedes por deambulación, *H. bacteriophora*, que obtuvo mejor rendimiento en combinación que por sí sola, pero solamente a un nivel más profundo. Esto es un problema especialmente dado que muchas de las plagas de insectos seleccionadas como objetivo por agricultores domésticos y comerciales residen en un intervalo de profundidad de tierra de 0-25 cm.

Wang X E (Journal of Nematology, Society of Nematologists, College Park, MD, EE.UU., vol. 31, n.º 2, junio de 1999) investigó el comportamiento de infección de juveniles infecciosos de *Steinernema carpocapsae* en presencia y ausencia de *S. glaseri*.

Kaya H K (Environmental Entomology, Entomological Society of America, College Park, vol. 22, n.º 4, 1993) y Koppenh, Fer A M (Fundamental and Applied Nematology, Montrouge, Fr, vol. 19, n.º 2, 1996) comentan combinar dos especies de nematodos entomopatógenos con diferentes estrategias de búsqueda.

Gaugler Randy (Oecologia, vol. 109, n.º 4, 1997) revisó la ecología de los nematodos entomopatógenos y el desarrollo de nematodos como alternativas a insecticidas químicos. Lewis Edwin (Biological Control, vol. 38, n.º 1, julio de 2006) comenta el comportamiento y la ecología de los nematodos entomopatógenos con respecto a su función como agentes de control biológico. Campbell (Journal of Nematology, vol. 35, n.º 2, junio de 2003) comenta la evolución de las estrategias de búsqueda de huéspedes en nematodos entomopatógenos, en particular nematodos del género *Steinernema*.

El documento WO91/06642 da a conocer una composición insecticida para su uso contra insectos que viven en la tierra que comprende una cantidad de nematodos de *Steinernematidae* o heterorhabditidos y el documento WO94/19940 da a conocer un método de envasado de nematodos entomopatógenos juveniles de tercera fase.

5 Dillon (Biological Control, San Diego, CA, EE.UU., vol. 38, n.º 2, 1 de agosto de 2006) comenta la supresión de *Hylobius abietis* mediante nematodos entomopatógenos. Ferguson (Environmental Entomology, Entomological Society of America, vol. 24, 1 de enero de 1995) evaluó el movimiento y la actividad de cuatro aislados de nematodos entomopatógenos.

10 Un objeto de la invención es superar al menos uno de los problemas anteriores.

Declaraciones de la invención

15 La invención se refiere a un producto envasado que comprende una formulación de nematodos de múltiples especies para eliminar plagas de insectos objetivo y a los métodos de uso de este producto. La formulación tiene al menos tres especies de nematodos de al menos dos familias (*Steinernematidae* y *Heterorhabditidae*), y se formula de tal manera que las especies de una familia superan en número a las especies de la otra familia. Por tanto, la formulación incluye una especie mayoritaria y una especie minoritaria. Un ejemplo sería una formulación que comprende *Steinernema riobravis*, *Heterorhabditis bacteriophora* y *Heterorhabditis megidis*, en la que *Steinernema riobravis* es la especie minoritaria. El solicitante ha descubierto de manera sorprendente que en tal formulación, el poder de eliminación de la especie minoritaria se potencia en gran medida debido a la competencia proporcionada por la presencia de la especie mayoritaria. Por tanto, pueden dirigirse formulaciones a plagas objetivo específicas incluyendo como especie minoritaria una (o más) especies de nematodos que son parásitos especializados frente a la plaga objetivo específica.

25 Según la invención, se proporciona una formulación para su uso en el control biológico de plagas de insectos que comprende una cohorte de nematodos parasitarios de insectos juveniles infecciosos y un medio para los nematodos, consistiendo la cohorte esencialmente en una mezcla de tres especies, en las que dos de las especies son de un primer género (especie mayoritaria) seleccionado de uno de *Steinernema* y *Heterorhabditis* y una de las especies es de un segundo género (especie minoritaria) seleccionado del otro de *Steinernema* y *Heterorhabditis*. El número de especies de la especie mayoritaria es mayor que el número de especies de la especie minoritaria.

30 Una formulación según la invención proporciona varias ventajas con respecto a formulaciones de nematodos conocidas.

35 En primer lugar, dado que la formulación comprende una especie mayoritaria y una especie minoritaria que compiten por plagas de insectos, las especies presentes de la especie minoritaria competirán de manera más agresiva por huéspedes que las del primer género. De manera sorprendente, esto da como resultado que la especie minoritaria es más eficaz en la infección y eliminación de plagas de insectos. Además, permite al formulador adaptar cualquier formulación dada para la eliminación eficaz de una plaga de insectos objetivo predeterminada (o grupo de plagas objetivo) incluyendo una especie específicamente dirigida a esa plaga de insecto objetivo como especie minoritaria. Como ejemplo, una formulación dirigida al tratamiento de la infestación por gorgojo de las raíces de césped puede incluir *Steinernema riobravis*, *Heterorhabditis bacteriophora* y *Heterorhabditis megidis*, en la que *Steinernema riobravis* se elige como especie minoritaria dado que es un parásito especializado del gorgojo de las raíces. En esta formulación, dado que *Steinernema riobravis* es el representante de la especie minoritaria, competirá de manera más agresiva por huéspedes que aquellos del primer género (mayoría), y como tal tendrá un poder de eliminación aumentado en comparación con especies de nematodos individuales cuando se aplican por sí solas (como aplicación individual fuera de la fórmula).

50 En segundo lugar, las formulaciones de la invención, gracias a incluir tres especies diferentes de nematodos, tendrán eficazmente un poder de eliminación de amplio espectro gracias al hecho de que se incluirán especies de nematodos especializadas en la eliminación infecciosa de diferentes variedades de nematodos en la formulación. Por tanto, tomando el ejemplo anterior, las tres especies presentes tendrán un poder de eliminación eficaz contra la siguiente lista de plagas de insectos: gorgojos de las raíces, grillos topo leonado, grillos topo meridionales, gusanos cogolleros, gusanos cortadores, palomillas, barrenadores de madera, polillas de bráctea de alcachofa, y escarabajos, con un poder de eliminación particularmente eficaz contra aquellas plagas para las cuales la especie minoritaria es un eliminador especializado. Por tanto, la formulación de la invención proporciona una eficacia de eliminación que es comparable a la de pesticidas químicos convencionales. En tercer lugar, dado que las especies de nematodos elegidas para la formulación son parásitos altamente específicos, no atacarán y eliminarán insectos beneficiosos. Por el contrario, los pesticidas químicos no pueden distinguir entre insectos beneficiosos y plagas de insectos no deseadas.

65 Sin limitarse por la teoría, también se cree que el uso de una formulación de nematodos de múltiples especies según la invención, en la que existe un grado de competencia entre las especies minoritaria y mayoritaria, tiene el efecto de controlar la población de nematodos e impedir un aumento descontrolado de la población de nematodos.

Las especies de nematodos presentes en la formulación incluirán (a) al menos una especie que busca huéspedes mediante deambulaci3n y al menos una especie que busca huéspedes mediante emboscada, o (b) un nematodo que puede implementar estrategias de b3squeda de huéspedes tanto mediante deambulaci3n como mediante emboscada. Esto permite que las especies combinadas de la formulaci3n tengan una amplia estrategia de b3squeda de huéspedes. Por tanto, normalmente la formulaci3n incluirá dos especies que buscan huéspedes mediante emboscada de los mismos géneros y una especie que busca huéspedes mediante deambulaci3n de un género diferente, o dos especies que buscan huéspedes mediante deambulaci3n de los mismos géneros y una especie que busca huéspedes mediante emboscada de un género diferente. En la memoria descriptiva, se entiende que el término “especies que buscan huéspedes mediante deambulaci3n” significa una especie de nematodo que adopta una estrategia de b3squeda de huéspedes de recorrer la tierra buscando posibles huéspedes. Los ejemplos de especies que buscan huéspedes mediante deambulaci3n incluyen *Heterorhabditis bacteriophora*, *Steinernema glaseri*, *Steinernema kraussei* y *Heterorhabditis megidis*. En esta memoria descriptiva, se entiende que el término “especies que buscan huéspedes mediante emboscada” significa una especie de nematodo que adopta una estrategia de b3squeda de huéspedes de alzar sus cuerpos de la superficie de la tierra para estar mejor dispuestos para adherirse a plagas de insectos que pasan a lo largo de la superficie de la tierra. Los ejemplos de especies que buscan huéspedes mediante emboscada incluyen *Steinernema carpocapsae* y *Steinernema scapterisci*. Los ejemplos de especies de nematodos que pueden implementar estrategias de b3squeda de huéspedes tanto mediante deambulaci3n como mediante emboscada son *Steinernema riobravis* y *Steinernema feltiae*. Por tanto, una formulaci3n seg3n esta realizaci3n tendrá la ventaja de poder atacar plagas de insectos que viven por encima de la tierra así como aquellas que viven por debajo de la tierra, potenciando de este modo la naturaleza de amplio espectro de la formulaci3n de la invenci3n.

De manera sorprendente, el solicitante ha mostrado que cuando las formulaciones de la invenci3n emplean especies que tienen la misma estrategia de b3squeda de huéspedes (es decir, todas mediante deambulaci3n o todas mediante emboscada), que la presencia de las especies mayoritaria y minoritaria tiene el efecto de alterar la estrategia de b3squeda de huéspedes de las especies de tal manera que se adaptan una estrategia de b3squeda de huéspedes amplia. Esto permitirá al formulador cierto grado de flexibilidad al formular una mezcla de especies de nematodos para lograr una estrategia de b3squeda de huéspedes amplia.

Normalmente, la cohorte de nematodos juveniles infecciosos consiste esencialmente en dos especies del primer género y una especie del segundo género. De esta manera, la especie del segundo género (especie minoritaria) estará en minoría en la formulaci3n, y por tanto tendrá que competir más fuertemente que la especie del primer género (especie mayoritaria). Esto da como resultado que la especie minoritaria tenga una acci3n destructiva mayor en comparaci3n con la misma especie de nematodo individual si se aplica por sí sola (es decir, en una cantidad comparativamente igual, como aplicaci3n individual fuera de la fórmula, por ejemplo una especie aplicada de manera individual e independiente).

En una realizaci3n preferida de la invenci3n, la cohorte de nematodos juveniles infecciosos consiste esencialmente en dos especies del primer género y una especie del segundo género.

Los géneros primero y segundo se seleccionan de las dos familias que comprenden: *Steinernematidae* y *Heterorhaptitidae*.

En una realizaci3n de la invenci3n, el primer género (especie mayoritaria) es *Steinernema* (*Steinernematidae*) y el segundo género (especie minoritaria) es *Heterorhabditis* (*Heterorhaptitidae*). Normalmente, las dos o más especies de *Steinernematidae* se seleccionan del grupo que comprende: *Steinernema feltiae*; *Steinernema scapterisci*; *Steinernema riobravis*; *Steinernema carpocapsae* y *Steinernema kraussei*. De manera ideal, las dos especies de *Steinernematidae* se seleccionan del grupo que comprende *Steinernema feltiae*, *Steinernema kraussei* y *Steinernema carpocapsae*.

De manera adecuada, la al menos una especie de *Heterorhaptitidae* se selecciona del grupo que comprende: *Heterorhabditis megidis*, *Heterorhabditis downesi* y *Heterorhabditis bacteriophora*. De manera ideal, la al menos una especie de *Heterorhaptitidae* consiste en *Heterorhabditis bacteriophora*.

En otra realizaci3n de la invenci3n, el primer género (especie mayoritaria) es *Heterorhabditis* (*Heterorhaptitidae*) y el segundo género (especie minoritaria) es *Steinernema* (*Steinernematidae*). En este caso, normalmente las dos especies de *Heterorhaptitidae* se seleccionan del grupo que comprende: *Heterorhabditis megidis*; *Heterorhabditis downesi* y *Heterorhabditis bacteriophora*. De manera adecuada, la al menos una especie de *Steinernematidae* se selecciona del grupo que comprende: *Steinernema feltiae*; *Steinernema scapterisci*; *Steinernema riobravis*; *Steinernema carpocapsae* y *Steinernema kraussei*. De manera ideal, la al menos una especie de *Steinernematidae* se selecciona del grupo que comprende: *Steinernema feltiae*; *Steinernema kraussei* y *Steinernema carpocapsae*.

En una realizaci3n, una formulaci3n seg3n la invenci3n se selecciona del grupo que consiste en:

(a) *Heterorhabditis downesi*, *Heterorhabditis bacteriophora* y *Steinernema feltiae*;

(b) *Heterorhabditis downesi*, *Heterorhabditis bacteriophora* y *Steinernema carpocapsae*;

(c) *Heterorhabditis megidis*, *Heterorhabditis bacteriophora* y *Steinernema kraussei*;

5 (d) *Heterorhabditis megidis*, *Heterorhabditis downsei* y *Steinernema kraussei*;

(e) *Heterorhabditis downesi*, *Heterorhabditis megidis* y *Steinernema carpocapsae*;

10 (f) *Steinernema feltiae*, *Steinernema carpocapsae* y *Heterorhabditis downesi*;

(g) *Steinernema felliae*, *Steinernema carpocapsae* y *Heterorhabditis besteriophora*;

(h) *Steinernema scapterisci*, *Steinernema carpocapsae* y *Heterorhabditis bacteriophora*;

15 (i) *Steinernema scapterisci*, *Steinernema carpocapsae* y *Heterorhabditis downesi*;

(j) *Steinernema feltiae*, *Steinernema carpocapsae* y *Heterorhabditis megidis*; y

20 (k) *Steinernema scapterisci*, *Steinernema carpocapsae* y *Heterorhabditis megidis*.

De manera adecuada, la formulación comprende adicionalmente un medio adecuado para los nematodos. Normalmente, el medio se selecciona del grupo que comprende vermiculita, arcilla fina, agua y otros tipos de medios adecuados. Generalmente, el medio comprenderá entre el 10 y el 15% de la formulación.

25 De manera adecuada, la cohorte de nematodos comprenderá al menos el 20%, el 25%, el 30% o el 33% de la especie minoritaria. Por tanto, por ejemplo, en una cohorte de tres especies que incluyen una especie minoritaria individual, al menos el 20% del número total de nematodos en la cohorte consistirá en la especie minoritaria. De manera ideal, las especies diferentes en la cohorte estarán presentes en un número aproximadamente igual (es decir, +/- 5%).

30 La invención también se refiere a un método para el control biológico de una plaga de insectos objetivo predeterminada, método que emplea un producto envasado de formulación según la invención en el que la especie minoritaria en la formulación es parasitaria frente a la plaga objetivo determinada, comprendiendo el método la etapa de aplicar la formulación de control biológico a la tierra u otros medios en los que está creciendo el producto agrícola. Por tanto, en el caso de una formulación que consiste en *Steinernema feltiae*, *Steinernema carpocapsae* y *Heterorhabditis downesi*, en la que esta última es la especie minoritaria, esta formulación será especialmente adecuada para tratar gorgojos de las raíces, barrenadores de madera y/o escarabajos, dado que la especie minoritaria es especialmente parasitaria frente a estas plagas de insectos. Tal como se indicó anteriormente, y en los datos a continuación, esta formulación tendrá una eficacia de eliminación mucho mayor contra las plagas objetivo predeterminadas que si la especie minoritaria se usara por sí sola. Sin embargo, debe observarse que aunque la formulación será especialmente adecuada para tratar la plaga de insectos objetivo, puesto que la formulación incluye otras dos especies de nematodos, también será eficaz para eliminar plagas de insectos para las cuales las últimas dos especies de nematodos son eliminadores especializados. Por tanto, en el ejemplo anterior, la formulación también proporcionará acción eficaz contra varias plagas de insectos diferentes, incluyendo larvas de *Sciaridae*, mosquitos de los hongos, gusanos cogolleros, gusanos cortadores, etc.

50 Por tanto, en una realización, el insecto objetivo es uno o más de larvas de *Sciaridae* y mosquitos de los hongos, y en la que la cohorte de nematodos juveniles infecciosos consiste en *Steinernema feltiae* y dos especies de *Heterorhabditidae*.

En otra realización, el insecto objetivo es uno o más del grillo topo leonado y el grillo topo meridional, y en la que la cohorte de nematodos juveniles infecciosos consiste en *Steinernema scapterisci* y dos especies de *Heterorhabditidae*.

55 En otra realización, el insecto objetivo es uno o más de gorgojos de las raíces, el grillo topo leonado y el grillo topo meridional, y en la que la cohorte de nematodos juveniles infecciosos consiste en *Steinernema riobravisi* y dos especies de *Heterorhabditidae*.

60 En otra realización, el insecto objetivo es un gorgojo de las raíces, y en la que la cohorte de nematodos juveniles infecciosos consiste en *Heterorhabditis megidis*, y dos especies de *Steinernematidae*.

65 En otra realización, el insecto objetivo es uno o más de gusanos cogolleros, gusanos cortadores, palomillas, gorgojos de las raíces, barrenadores de madera y polillas de bráctea de la alcachofa, y en la que la cohorte de nematodos juveniles infecciosos consiste en *Steinernema carpocapsae* y dos especies de *Heterorhabditidae*.

En otra realización, el insecto objetivo es uno o más de gorgojos de las raíces, barrenadores de madera y

escarabajos, y en la que la cohorte de nematodos juveniles infecciosos consiste en *Heterorhabditis bacteriophora* y dos especies de *Steinernamitidae*.

5 También se describe un método para el control biológico eficaz de una plaga de insectos objetivo de un producto agrícola u hortícola, plaga objetivo que vive de manera predominante en un entorno entre 0 cm y 25 cm por debajo del nivel de la superficie, método que emplea una formulación de control biológico según la invención, comprendiendo el método la etapa de aplicar la formulación de control biológico a la tierra u otros medios en los que está creciendo el producto agrícola u hortícola. Una plaga objetivo que vive de manera predominante en un entorno entre 0 cm y 25 cm por debajo de nivel de la superficie es una en la que al menos el 50%, de manera ideal al menos 10 el 75%, de la población de la plaga objetivo reside en este intervalo de profundidades. Por tanto, por ejemplo, las plagas de insectos de hongos, fresas, y la mayoría de plantas domésticas y hortícolas residirían dentro de este intervalo de profundidades.

15 También se describe el uso de una formulación según la invención para tratar uno o más de larvas de *Sciaridae* y mosquitos de los hongos, en la que la cohorte de nematodos juveniles infecciosos consiste en *Steinernema felitae* y dos especies de *Heterorhabditidae*.

20 En todos los ejemplos anteriores, la formulación tendrá un efecto de eliminación formidable contra la plaga de insecto objetivo, y un efecto de eliminación eficaz contra muchas otras plagas de insectos, contra las que las dos especies del género mayoritario serán eficaces.

25 También se describe el uso de una formulación según la invención para tratar uno o más del grillo topo leonado y el grillo topo meridional, y en la que la cohorte de nematodos juveniles infecciosos consiste en *Steinernema scapterisci* y dos especies de *Heterorhabditidae*.

Se describe además el uso de una formulación según la invención para tratar uno o más de gorgojos de las raíces, el grillo topo leonado y el grillo topo meridional, y en la que la cohorte de nematodos juveniles infecciosos consiste en *Steinernema riobraviss* y dos especies de *Heterorhabditidae*.

30 También se describe el uso de una formulación según la invención para tratar el gorgojo de las raíces, y en la que la cohorte de nematodos juveniles infecciosos consiste en *Heterorhabditis megidis* y dos especies de *Steinernematidae*.

35 También se describe el uso de una formulación según la invención para tratar una o más de gusanos cogolleros, gusanos cortadores, palomillas, gorgojos de las raíces, barrenadores de madera, polillas de bráctea de alcachofa, y en la que la cohorte de nematodos juveniles infecciosos consiste en *Steinernema carpocapsae* y dos especies de *Heterorhabditidae*.

40 También se describe el uso de una formulación según la invención para tratar uno o más de gorgojos de las raíces, barrenadores de madera y escarabajos, y en la que la cohorte de nematodos juveniles infecciosos consiste en *Heterorhabditis bacteriophora* y dos especies de *Steinernamitidae*.

45 En una realización particularmente preferida de la invención, se proporciona una formulación para su uso en el control biológico de plagas de insectos que comprende una cohorte de nematodos parasitarios de insectos juveniles infecciosos de tres especies, en la que al menos dos de las especies son de un primer género y al menos una de las especies es de un segundo género, en la que el número de especies del primer género es mayor que el número de especies del segundo género, y en la que la formulación comprende al menos una especie de nematodo que busca huéspedes mediante emboscada y al menos una especie de nematodo que busca huéspedes, o al menos una especie de nematodo que puede implementar estrategias de búsqueda de huéspedes tanto mediante deambulación como mediante emboscada. 50

La invención también se refiere a un producto envasado que comprende una formulación según la invención, comprendiendo el producto envasado información que indica la identidad de la plaga (o plagas) de insectos objetivo predeterminada, en el que la especie minoritaria en la formulación es un parásito especializado frente a la plaga (o plagas) de insectos objetivo predeterminada. Normalmente, el producto envasado comprende además instrucciones para que un usuario aplique la formulación a un ecosistema deseado. De manera adecuada, la formulación en el producto envasado comprende adicionalmente un medio adecuado para los nematodos. Normalmente, el medio se selecciona del grupo que comprende vermiculita, arcilla fina, esponja, agua y otros tipos de medios adecuados. Generalmente, el medio comprenderá entre el 10 y el 15% de la formulación. 60

La invención también se refiere a un método para formular una cohorte de nematodos parasitarios de insectos juveniles infecciosos para su uso en el control biológico de una plaga (o plagas) de insectos objetivo predeterminada, método que comprende proporcionar una formulación de la invención, en la que la especie minoritaria en la formulación es un parásito especializado frente a la plaga (o plagas) de insectos objetivo predeterminada. 65

La tabla I proporciona una lista de especies de nematodos junto con una lista de las plagas objetivo para las cuales la especie de nematodo es un parásito especializado.

Descripción detallada de la invención

5 Los géneros de *Steinernema* (*Steinernematidae*) y *Heterorhabditis* (*Heterorhabditidae*) contienen varias especies, cada una especializada para atacar a un tipo o grupo específico de plagas de insectos (tabla I). Las formulaciones de la invención, gracias a comprender al menos tres especies diferentes de nematodo, proporcionan de este modo un efecto de amplio espectro contra varios tipos y clases de plagas de insectos.

10

Tabla I

Uso actual de nematodos beneficiosos como agentes de control biológico			
Especie de nematodo	Estrategia de búsqueda de huéspedes	Plaga de insectos	Producto
<i>Steinernema feltiae</i>	tanto mediante emboscada como mediante deambulación	Larvas de <i>Sciaridae</i> , mosquitos de los hongos.	Hongos, plantas ornamentales
<i>Steinernema scapterisci</i>	buscador de huéspedes mediante emboscada	Grillo topo leonado, grillo topo meridional.	Hierba de césped
<i>Steinernema riobravis</i>	tanto mediante emboscada como mediante deambulación	Gorgojos de las raíces, grillo topo leonado, grillo topo meridional.	Cítricos, hierba de césped
<i>Steinernema carpocapsae</i>	buscador de huéspedes mediante emboscada	Gusano cogollero, gusano cortador, palomilla, gorgojos de las raíces, barrenadores de madera, polilla de bráctea de la alcachofa.	Plantas ornamentales, arándano
<i>Steinernema glaseri</i>	buscador de huéspedes mediante deambulación	Larvas de coleóptero, particularmente escarabajos	Cítricos, hierba de césped
<i>Steinernema kraussei</i>	buscador de huéspedes mediante deambulación	Gorgojo de la vid	Jardines, plantas ornamentales
<i>Heterorhabditis megidis</i>	buscador de huéspedes mediante deambulación	Gorgojos de las raíces	Plantas ornamentales
<i>Heterorhabditis bacteriophora</i>	buscador de huéspedes mediante deambulación	Gorgojos de las raíces, barrenadores de madera, escarabajos.	Plantas ornamentales, bayas, hierba de césped

Otras especies de nematodos para su uso en formulaciones de la invención incluyen:

15 Especies de *Steinernema*

Steinernema oregonense, *Steinernema anomaly*, *Steinernema intermedia*, *Steinernema rarum*, *Steinernema kushidai*, *Steinernema abbasi*, *Steinernema bicomtrtum*, *Steinernema siamkayai*, *Steinernema arenarium*, *Steinernema cubanum*, *Steinernema glaseri*, *Steinernema kari* y *Steinernema puertoricense*.

20

Especies de *Heterorhabditis*

Heterorhabditis Hawaiians, *Heterorhabditis indicus*, *Heterorhabditis zealandica*, *Heterorhabditis downesi*, *Heterorhabditis marelatus*, *Heterorhabditis baujardi*, *Heterorhabditis floridness* y *Heterorhabditis Mexicana*.

25

Métodos para producir nematodos parasitarios de insectos juveniles infecciosos

Para realizar pruebas de campo a pequeña escala, se usa producción *in vivo* (tal como se describe por Woodring y Kaya (1988)- "Steinernematidae and Heterorhabditidae Nematodes: Handbook of Biology and Techniques". Southern Cooperative Bulletin 331, Arkansas Agricultural Experimental Station, Fayetteville, Arkansas, EE.UU., 30 págs.) para producir un gran número de juveniles infecciosos que no se alimentan.

30

Infección:

35 El método anterior implica infectar larvas de insectos (gusano de la harina o larvas de *Galleria*) con juveniles infecciosos de los nematodos beneficiosos (*Steinernematidae* o *Heterorhabditidae*). En primer lugar se dejan calentar los juveniles infecciosos hasta temperatura ambiente (20-25°C) en una suspensión acuosa. Después se transfiere un número seleccionado de estos juveniles de nematodo a contenedores plásticos especialmente preparados en cuyo interior se coloca una hoja de papel secante. A continuación, se añaden las larvas de insectos

para dar una razón de aproximadamente veinte nematodos por cada larva de insecto. Se vuelve a colocar la tapa y se incuba el recipiente a 25°C durante aproximadamente seis a ocho días.

Recogida de la nueva generación de nematodos juveniles:

5 Se transfieren las larvas de insectos infectadas a una trampa de agua y a lo largo de un periodo de 10-12 días, tras la infección, los nuevos juveniles migran de las larvas huéspedes al agua. Poco después de aparecer, pueden recogerse fácilmente. Se esteriliza la superficie de los nematodos recogidos y se lavan varias veces antes de mezclarlos. El esterilizante usado comprende disolución de Milton al 0,1% y el lavado se realiza usando agua
10 destilada.

Tras la cosecha, se empaquetan los nematodos en vermiculita, y se envasan en contenedores de plástico que se sellan con una película permeable para almacenamiento y transporte. Sin embargo, pueden emplearse otros medios y formas de envasado, y los expertos en la técnica conocerán ejemplos adecuados de tales medios y envasados.

15 Esta formulación de la invención puede usarse para controlar especies de plagas de insectos encontradas en jardines e invernaderos domésticos, y en invernaderos comerciales, granjas y bosques. La formulación puede aplicarse especialmente para su uso con plantas de vivero, hierba de césped, fresas, arándanos, plantas en maceta de interior o exterior o bolsas de cultivo que experimentan de ataques de plagas de insectos de tierra, y plagas de
20 insectos de jardín.

A continuación se proporcionan ejemplos específicos de formulación según la invención:

25 A- Formulaciones: 2 buscadores de huéspedes mediante deambulación + 1 buscador de huéspedes mediante emboscada

A1: *Heterorhabditis megidis*, *Heterorhabditis bacteriophora* y *Steinernema feltiae*

30 Esta formulación controlará plagas de insectos seleccionadas del grupo que comprende insectos dípteros, incluyendo moscas de los hongos, mosquitos de los hongos y tipúlidos, lepidópteros que incluyen gusanos cogolleros, gusanos cortadores, palomillas, orugas barrenadoras, larvas de insectos coleópteros, gorgojos de las raíces, gorgojos de los cítricos, gorgojos de la vid negra, cetonias, escarabajos, *Hymenoptera* y termitas/hormigas reina.

35 A2: *Heterorhabditis megidis*, *Heterorhabditis bacteriophora* y *Steinernema carpocapsae*

Esta formulación podrá controlar insectos dípteros, incluyendo mosquitos de los hongos y tipúlidos, lepidópteros que pueden incluir gusanos cogolleros, gusanos cortadores, palomillas, orugas barrenadoras, larvas de insectos coleópteros, gorgojos de las raíces, gorgojos de los cítricos, gorgojos de la vid negra, cetonias, escarabajos,
40 *Hymenoptera* y termitas/hormigas reina

B-Formulaciones: 2 buscadores de huéspedes mediante emboscada + 1 buscador de huéspedes mediante deambulación

45 B1: *Steinernema feltiae*, *Steinernema carpocapsae* + *Heterorhabditis megidis*

Esta formulación puede controlar insectos dípteros, incluyendo moscas de los hongos, mosquitos de los hongos y tipúlidos, lepidópteros que pueden incluir gusanos cogolleros, gusanos cortadores, palomillas, orugas barrenadoras, larvas de insectos coleópteros, gorgojos de las raíces, gorgojos de los cítricos, gorgojos de la vid negra, cetonias, escarabajos e *Hymenoptera* y termitas/hormigas reina.
50

B2: *Steinernema scapterisci*, *Steinernema carpocapsae* + *Heterorhabditis bacteriophora*

55 Esta formulación puede controlar insectos dípteros, incluyendo mosquitos de los hongos y tipúlidos, lepidópteros que pueden incluir gusanos cogolleros, gusanos cortadores, palomillas, orugas barrenadoras, larvas de insectos coleópteros, gorgojos de las raíces, gorgojos de los cítricos, gorgojos de la vid negra, cetonias, escarabajos, *Hymenoptera*, termitas/hormigas reina y *Orthoptera*, incluyendo el grillo topo leonado y el grillo topo meridional.

60 APLICACIÓN PARA FORMULACIONES A: (basándose en envase pequeño de 30 millones de nematodos juveniles infecciosos)

Dado que los nematodos necesitan humedad en la tierra para moverse (si la tierra está demasiado seca o compacta, puede que no puedan buscar huéspedes), se recomienda regar la zona infestada de insectos antes o inmediatamente después de aplicar la formulación de la invención, dado que mantiene la tierra húmeda y ayuda a los nematodos juveniles a moverse más profundamente al interior de la tierra. Debe prestarse atención en no empapar la zona porque los nematodos en demasiada agua no pueden infectar. No se necesitan máscaras o equipo
65

de seguridad especializado, dado que las formulaciones de la invención son seguras para plantas y animales (pájaros, mascotas, niños).

Mezclada con compost

- 5 A Antes de sembrar o plantar, o
- B Mientras el cultivo está creciendo.
- 10 Las formulaciones de la invención pueden aplicarse al suelo antes de sembrar o plantar (en cuyo caso se conocen como abonado de fondo) o mientras el cultivo está creciendo, como abonado de cobertura. Dosificación: 1 caja de la formulación, mezclada bien con 160-200 litros de compost húmedo suelto, que puede usarse en abonado de fondo o en abonado de cobertura. Puede aplicarse una aplicación similar para realizar en macetas de exterior o interior.

15 Inserción en macetas o bolsas de crecimiento

Insertar 1 cuchara (un gramo) del producto de invención formulado en cada maceta; tratando hasta 200 macetas (maceta de 1 litro) o 3 cucharas en cada bolsa de crecimiento tratando hasta 60-70 bolsas de crecimiento.

20 Inserción en la tierra

Sacar la tierra para realizar orificios pequeños de 5-10 cm de profundidad (usando una pequeña paleta) y con 1 metro de separación por el jardín. Insertar 2 cucharas de la formulación en cada orificio y asentar la tierra cuidadosamente con la mano.

- 25 Deberán evitarse fertilizantes químicos aproximadamente 2 semanas antes y después de la aplicación de nematodos, porque pueden verse afectados negativamente por el alto contenido en nitrógeno.

Almacenamiento y manipulación

- 30 En general, las formulaciones de la invención deben almacenarse en un frigorífico frío a 2-5°C, y no debe permitirse que se congelen.

1 Mantener en un lugar seco alejado de la luz solar directa y sin exposición a temperaturas extremas.

- 35 2 Mezclar todos los componentes (contenido) con cuidado antes del uso y mantener alejado de la luz solar directa.

3 Usar antes de la fecha de caducidad.

- 40 APLICACIÓN PARA FORMULACIONES B: (basándose en un envase mediano de 45 millones de nematodos juveniles infecciosos).

- 45 Abrir un envase de la formulación de la invención y vaciar todo el contenido (nematodos y tierra fina) en un cubo o regadera que contiene 4-5 litros de agua corriente. Mezclar bien y dejar remojar durante 5-10 minutos, mezclar bien de nuevo y verter todo el contenido a través de un tamiz fino en el interior de un depósito de pulverización y ajustar hasta la cantidad de agua requerida, agitar bien y pulverizar sobre la zona objetivo inmediatamente.

Pueden envasarse formulaciones de la invención en diversas cantidades, incluyendo:

- 50 A- Tamaño pequeño que contiene 30 millones de nematodos juveniles infecciosos en vermiculita (como material portador inerte), puede tratar 160-200 macetas pequeñas o 60-70 metros cuadrados.

B- Tamaño convencional que contiene 45 millones de nematodos juveniles infecciosos, puede tratar 100 metros cuadrados.

- 55 C- Tamaño grande que contiene 90 millones de nematodos juveniles infecciosos en tierra fina (como portador inerte), puede tratar 200 metros cuadrados.

- 60 Se han usado dos familias, *Steinernematidae* y *Heterorhabditidae*, del orden de los nematodos entomopatógenos *Rhabditida* como el control biológico más eficaz contra una amplia gama de plagas de insectos que viven en la tierra.

La clave más importante, entre otras, para controlar plagas de manera satisfactoria con estos nematodos beneficiosos es:

- 65 - hacer coincidir la especie de nematodo correcta con la especie de plaga; dado que uno de los problemas más importantes que surgen con el uso de la existencia del producto de control biológico, de especie *Steinernematidae* o

Heterorhabditidae, disponible en el mercado, contiene solamente una especie de los nematodos beneficiosos anteriores que puede controlar solamente una única o un grupo de especies de insectos objetivo, haciéndolo poco viable desde el punto de vista económico, si hay una plaga de múltiples especies en el campo, en comparación con el uso de un pesticida químico que puede controlar una amplia gama de especies de insectos en una aplicación.

- 5 Muchos investigadores han estudiado la posibilidad de usar más de una especie de nematodos beneficiosos para controlar plagas de insectos. En general, la mayoría de ellos se concentra en el uso de estrategias de búsqueda de huéspedes diferentes, es decir, mediante deambulación (búsqueda de huéspedes amplia) y mediante emboscada (acechamiento).
- 10 Hay varios productos disponibles en el mercado tales como Nematak (mediante emboscada)-NemaSeek (mediante deambulación) Combo (un envase para Nematak y uno para NemaSeek) y otros. Todos los productos afirman que son más eficaces para el control de una gama más amplia de plagas de insectos con respecto a la aplicación de una especie individual.

15 Parte experimental

Se establecieron varios ensayos para comparar entre las estrategias de búsqueda de huéspedes y las especies mayoritaria y minoritaria (dos especies del género *Heterorhabditis* y una especie del género *Steinernema* o dos especies del género *Steinernema* y una especie del género *Heterorhabditis*) para controlar varias larvas y pupas de insectos en compost multiuso general. Todos los ensayos se realizaron en FITZGERALD NURSERIES Ltd. OLDTOWN, STONEYFORD, Co., Kilkenny, República de Irlanda.

I - Usando 2 especies del género *Steinernema* y 1 especie del género *Heterorhabditis*.

25 MATERIAL Y MÉTODOS

La fuente de nematodos beneficiosos usada para todos los ensayos siguientes, *Steinernema feltiae* y *Steinernema kraussei*, se obtuvo del distribuidor Nemasys en Irlanda, *Heterorhabditis downesi* se suministró por Dr. C. Griffin, Maynooth College, Co., Kildare, Irlanda y *Steinernema carpocapsae*, *Heterorhabditis bacteriophora* y *Heterorhabditis megidis* se obtuvieron del agente Koppert en Irlanda.

Treinta plantas de maceta de polietileno (25 X 25 centímetros), cada una llena de 10 litros de compost multiuso. Se insertaron en cada maceta tres bolsitas de malla de plástico, conteniendo cada bolsita 9 larvas de insectos (2 gorgojos de la vid, 2 larvas de *Galleria*, 5 larvas de gusano de la harina), una en la parte superior (1-2 centímetros por debajo de la superficie), una en la parte central (12 centímetros por debajo de la superficie) y una en la parte inferior de la maceta (24 centímetros por debajo de la superficie). Se extendió uniformemente una alícuota de 10 ml de suspensión de nematodos, 60000 IJ, sobre la superficie de cada maceta en el tratamiento apropiado, la tasa de aplicación es la misma para la especie individual (60000), dos especies (30000 para cada especie = 60000) y en la aplicación novedosa de 3 especies (20000 para cada especie = 60000). Se dividieron las macetas anteriores en tres grupos de 10 macetas y se usaron en los siguientes tratamientos de ensayo:

ENSAYO 1

45 A- Usar 1 especie del género *Heterorhabditis* y 2 especies del género *Steinernema* se asemeja a tres estrategias de búsqueda de huéspedes.

1- Control sin tratar

50 2- *Heterorhabditis downesi* solo

3- *Steinernema feltiae*, *Steinernema carpocapsae* y *Heterorhabditis downesi*.

Estas tres especies se asemejarán a tres estrategias de búsqueda de huéspedes, mediante deambulación (*Heterorhabditis downesi*), intermedia (*Steinernema feltiae*) y mediante emboscada (*Steinernema carpocapsae*).

55 1- No se añadieron nematodos al control sin tratar.

2- *Heterorhabditis downesi* 10 X 60.000 = 600.000

60 3- *Steinernema feltiae* 10 X 20.000 = 200.000

3- *Steinernema carpocapsae* 10 X 20.000 = 200.000

3- *Heterorhabditis downesi* 10 X 20.000 = 200.000

65 Se añadieron diez mililitros de agua corriente a cada maceta del control sin tratar.

Se añadió una alícuota de 10 ml de suspensión de nematodos, *Heterorhabditis downesi* (60000 IJ) de manera uniforme encima de cada maceta en el segundo tratamiento y de manera similar 60000 IJ de especies de mezcla novedosa (20000 *Steinernema feltiae*, 20000 *Steinernema carpocapsae* y 20000 *Heterorhabditis downesi*).

5 B- Usar 1 especie del género *Steinernema* y 2 especies del género *Heterorhabditis* se asemeja a dos estrategias de búsqueda de huéspedes.

10 Se repitió el ensayo con otra combinación, uno mediante emboscada, *Steinernema carpocapsae*, y dos mediante deambulación, *Heterorhabditis downesi* y *Heterorhabditis bacteriophora*.

1- Control sin tratar

15 2- *Steinernema carpocapsae* solo

3- *Heterorhabditis downesi*, *Heterorhabditis bacteriophora* y *Steinernema carpocapsae*.

1- No se añadieron nematodos para el control sin tratar.

20 2- *Steinernema carpocapsae* 10 X 60.000= 600.000

3- *Steinernema carpocapsae* 10 X 20.000 = 200.000

25 3- *Heterorhabditis bacteriophora* 10 X 20.000 = 200.000

De manera similar, se añadieron diez mililitros de agua corriente a cada maceta del control sin tratar. Se añadió una alícuota de 10 ml de suspensión de nematodos, *Steinernema carpocapsae* (60000 IJ) de manera uniforme encima de cada maceta en el segundo tratamiento y de manera similar 60000 IJ de especies de mezcla novedosa (20000 *Heterorhabditis downesi*, 20000 *Heterorhabditis bacteriophora* y 20000 *Steinernema carpocapsae*).

30 Se incubaron todas las macetas (para ambos ensayos) en un túnel de polietileno en FITZGERALD NURSERIES durante 7 días a temperaturas de entre 6 y 18°C (temperaturas del aire). En el día 7 se retiraron todas las bolsitas de malla de plástico por separado para cada maceta como parte superior, central e inferior y se examinaron visualmente todos los insectos muertos para determinar si el cambio de color coincidía con el nematodo beneficioso específico, lo que puede sugerir qué especie de nematodos infectó al huésped (larvas o pupas de insecto), o se diseccionaron los insectos muertos bajo el microscopio estereoscópico para determinar la presencia de los nematodos beneficiosos.

40 Resultados y discusión

Tal como puede observarse a partir de la tabla 1, cuando se aplicó *Heterorhabditis downesi* solo logró infectar especies de insectos a todos los niveles (parte superior, central e inferior), más en la parte superior y en menor grado en los niveles inferiores. Sin embargo, en el caso de gorgojos de la vid pareció infectar más en la parte superior y en la parte inferior ya que se sabe que *H. downesi* se dirige a larvas de coleópteros, especialmente gorgojos del pino (comunicación personal con el Dr. C. Griffin). El uso de larvas de gusano de la harina es para hacer que resulte más difícil para *H. downesi* ya que tienen una cutícula más dura. Se usaron larvas de *Galleria* en todas las combinaciones para indicar a qué nivel de profundidad pueden desplazarse los nematodos en la maceta, ya que estas larvas no tienen ninguna inmunidad, haciendo que sean un objetivo fácil para todos los nematodos usados en estos ensayos. Sin embargo, cuando se usaron *H. downesi* en la aplicación de múltiples especies novedosa, 2 especies de *Steinernematidae* y una especie de *Heterorhabditidae*, una mediante emboscada, una intermedia (mediante emboscada y deambulación) y una mediante deambulación [*Steinernema carpocapsae* (mediante emboscada), *Steinernema feltiae* (mediante deambulación y emboscada) y *Heterorhabditis downesi* (mediante deambulación)], esta combinación logró aumentar la infección en casi entre el 50 - 100% (véase la tabla 2) y siguió el mismo patrón que en la tabla 1, superior en la parte superior e inferior en la parte central y la parte inferior, pero todavía superior que la aplicación de una especie individual en al menos el 50 - 100%.

Tabla 1

Porcentaje de larvas de insectos atacadas por <i>Heterorhabditis downesi</i> solo.			
Ubicación	Larvas de gorgojos de la vid	Larvas de gusano de la harina	Larvas de <i>Galleria</i>
Parte superior	10/20 = 50%	19/40 = 47,5%	15/20 = 75%
Parte central	3/20 = 15%	22/40 = 55%	10/20 = 50%
Parte inferior	5/20 = 25%	11/40 = 27,5%	9/20 = 45%

Total	18/60 = 30%	52/120 = 43,35%	34/60 = 56,75%
	Total general	104/240 = 43,3%	

Tabla 2

Porcentaje de larvas de insectos atacadas por una aplicación de múltiples especies novedosa (*Steinernema carpocapsae*, *Steinernema feltiae* y *Heterorhabditis downesi*).

Ubicación	Larvas de gorgojos de la vid	Larvas de gusano de la harina	Larvas de <i>Galleria</i>
Parte superior	16/20 = 80%	39/40 = 97,55%	20/20 = 100%
Parte central	17/20 = 85%	35/40 = 87,55%	20/20 = 100%
Parte inferior	12/20 = 60%	29/40 = 75,55%	19/20 = 95%
Total	45/60 = 75%	103/120 = 85,8%	59/60 = 98,35%
	Total general	207/240 = 86,3%	

5 *Steinernema carpocapsae* se usa habitualmente para controlar larvas y pupas de coleópteros (gorgojos de las raíces, picudos) y también se recomienda para controlar larvas de lepidópteros (polillas de bráctea de alcachofa, gusanos cogolleros, gusanos cortadores, palomillas). En el segundo ensayo, se usaron 2 gorgojos de la vid, 5 pupas de gusano de la harina, 5 larvas de gusano de la harina y 2 larvas de *Galleria* en este ensayo.

10 La tabla 3 muestra que *Steinernema carpocapsae* siguió el mismo patrón que en *H. downesi* cuando se aplicó solo, tabla 1. El mayor ataque en la parte superior y menor en la parte inferior. Sin embargo, cuando se usó como múltiples especies, 2 especies de *Heterorhabditidae* y una especie de *Steinernematidae*, dos mediante deambulación y una mediante emboscada (*H. downesi* (mediante deambulación), *H. bacteriophora* (mediante deambulación) y *S. carpocapsae* (mediante emboscada)). La tabla 4 también muestra una mayor cantidad de larvas y pupas infectadas (más del 30 - 100%) aunque el ataque total es menos que en la aplicación de múltiples especies de *H. downesi*, tabla 4, todavía es una mejora de casi el 50% con respecto a la aplicación de una especie individual de *S. carpocapsae* (véanse las tablas 3 y 4).

Tabla 3

Porcentaje de larvas de insectos atacadas por *S. carpocapsae* solo.

Ubicación	Larvas de gorgojos de la vid	Pupas de gusano de la harina	Larvas de gusano de la harina	Larvas de <i>Galleria</i>
Parte superior	14/20 = 70%	33/50 = 66%	31/50 = 62%	13/20 = 65%
Parte central	9/19 = 47,4%	20/50 = 40%	13/50 = 26%	8/20 = 40%
Parte inferior	4/19 = 21,1 %	22/50 = 44%	17/50 = 34%	11/20 = 55%
Total	27/58 = 46,5%	75/150 = 50%	61/150 = 41%	32/60 = 53%
	Total general	195/365=53,4 %		

20 Tabla 4

Porcentaje de larvas de insectos atacadas por una aplicación de múltiples especies novedosa (*H. downesi*, *H. bacteriophora* y *S. carpocapsae*)

Ubicación	Larvas de gorgojos de la vid	Pupas de gusano de la harina	Larvas de gusano de la harina	Larvas de <i>Galleria</i>
Parte superior	13/20 = 65%	42/50 = 84%	39/50 = 78%	17/20 = 85%
Parte central	15/20 = 75%	35/50 = 70%	34/50 = 68%	17/20 = 85%
Parte inferior	14/20 = 70%	33/50 = 66%	28/50 = 56%	16/20 = 80%
Total	42/60 = 70%	110/150 = 73,3%	101/150 = 67,3%,	50/60 = 83,3%
	Total general	303/420 = 72%		

ENSAYO 2

Material y métodos

25 El segundo ensayo también se llevó a cabo en FITZGERALD NURSERIES con diferentes combinaciones y se incubó de manera similar en túnel de polietileno durante 6 días a temperaturas de entre 7 y 15°C. En el día 6 se

retiraron todas las bolsitas de malla de plástico por separado para cada maceta como parte superior, central e inferior y se examinaron visualmente todos los insectos muertos para determinar si el cambio de color coincidía con el nematodo beneficioso específico lo que puede sugerir qué especie de nematodos infectó al huésped (larvas o pupas de insecto), o se disecaron los insectos muertos bajo el microscopio estereoscópico para determinar la presencia de los nematodos beneficiosos.

C- Usar 1 especie del género *Steinernema* y 2 especies del género *Heterorhabditis* se asemeja solamente a una estrategia de búsqueda de huéspedes.

Steinernema kraussei se usa habitualmente para controlar coleópteros, gorgojos del pino, gorgojos de la vid.

En este ensayo, se usaron 5 larvas de cresa, 5 pupas de gusano de la harina, 5 larvas de gusano de la harina y 3 larvas de *Galleria* en este ensayo.

Resultados y discusión

La tabla 5 muestra que *S. kraussei* siguió el mismo patrón que en *H. downesi* y en *S. carpocapsae*, cuando se aplicó solo, tabla 1 y tabla 3. El mayor ataque en la parte superior y menor en la parte inferior. Sin embargo, cuando se usó en múltiples especies (mayoría y minoría), 2 especies de *Heterorhabditidae* y una especie de *Steinernematidae*, todas representan buscadores de huéspedes mediante deambulación. (*H. downesi* (mediante deambulación), *H. megidis* (mediante deambulación) y *S. kraussei* (mediante deambulación)).

La tabla 5 también muestra una mayor cantidad de larvas y pupas infectadas (más del 30 - 100%) aunque el ataque total es menos la en la aplicación de múltiples especies de *H. downesi*, tabla 6, todavía es una mejora de casi el 50% con respecto a la especie individual (véanse las tablas 5 y 6).

Tabla 5

Porcentaje de larvas de insectos atacadas por <i>S. kraussei</i> solo				
Ubicación	Larvas de cresa (5)	Pupas de gusano de la harina (5)	Larvas de gusanos de la harina (5)	Larvas de <i>Galleria</i> (3)
Parte superior	18/44 = 40,9%	36/50 = 72%	48/50 = 96%	25/30 = 83,3%
Parte central	7/43 = 16,3%	34/50 = 68%	37/50 = 74%	27/30 = 90%
Parte inferior	3/35 = 8,8%	21/50 = 42%	0/50 = 0%	8/30 = 23,3%
Total	28/122 = 22,9	91/150 = 60,7%	85/150 = 56,7%	60/90 = 66,7%
	Total general	264/512 = 51,6%		

Tabla 6

Porcentaje de larvas de insectos atacadas por una aplicación de múltiples especies novedosa (<i>H. downesi</i> , <i>H. megidis</i> y <i>S. kraussei</i>)				
Ubicación	Larvas de cresa (5)	Pupas de gusano de la harina (5)	Larvas de gusanos de la harina (5)	Larvas de <i>Galleria</i> (3)
Parte superior	22/41 = 53,6%	40/50 = 80%	50/50 = 100%	30/30 = 100%
Parte central	10/42 = 23,8%	45/50 = 90%	49/50 = 98%	30/30 = 100%
Parte inferior	13/44 = 29,5%	40/50 = 80%	13/50 = 26%	30/30 = 100%
Total	45/127 = 35,4%	125/150 = 83,3%	112/150 = 74,7%	90/90 = 100%
	Total general	37,2/517 = 72%		

D- Usar 1 especie del género *Steinernema* y 2 especies del género *Heterorhabditis* se asemeja a "dos estrategias de búsqueda de huéspedes".

Steinernema feltiae se usa habitualmente para controlar larvas de dípteros, *Sciaridae* de invernadero y destruye larvas de *Sciaridae* en compost de hongos.

En este ensayo se usaron 5 larvas de cresa, 5 pupas de gusano de la harina, 5 larvas de gusano de la harina y 3 larvas de *Galleria* en este ensayo.

Resultados y discusión

La tabla 7 muestra que *S. feltiae* siguió el mismo patrón que en *H. downesi*, tabla 1, *S. carpocapsae*, tabla 3 y *S. kraussei*, tabla 5, cuando se aplicaron solos. El mayor ataque en la parte superior y menor en la parte inferior. Sin

5 embargo, cuando se usó en múltiples especies, 2 especies de *Heterorhabditidae* y una especie de *Steinernematidae*, dos mediante deambulaci3n y una intermedia (mediante deambulaci3n y emboscada) (*H. downesi* (mediante deambulaci3n), *H. megidis* (mediante deambulaci3n) y *S. feltiae* [intermedia (mediante deambulaci3n y emboscada)]. La tabla 8 tambi3n muestra una mayor cantidad de larvas y pupas infectadas (m3s del 30 - 100%) el ataque total en la aplicaci3n de m3ltiples especies de *S. feltiae*, tabla 8, todav3a es una mejora de m3s del 70% con respecto a la aplicaci3n de una especie individual (v3ase la tabla 7).

Tabla 7

Porcentaje de larvas de insectos atacadas por <i>Steinernema feltiae</i> solo.				
Ubicaci3n	Larvas de cresa (5)	Pupas de gusano de la harina (5)	Larvas de gusanos de la harina (5)	Larvas de <i>Galleria</i> (3)
Parte superior	10/36 = 27,8%	40/50 = 80%	45/50 = 90%	22/30 = 73,3%
Parte central	6/32 = 35,3%	25/50 = 50%	7/50 = 14%	10/30 = 33,3%
Parte inferior	4/37 = 10,8%	20/50 = 40%	7/50 = 16%	3/30 = 10%
Total	20/105 = 19%	85/150 = 56,7%	59/150 = 39,3%	35/90 = 38,9%
	Total general	199/495 = 40,2%		

10 Tabla 8

Porcentaje de larvas de insectos atacadas por aplicaci3n de m3ltiples especies de <i>Steinernema feltiae</i> (<i>H. downesi</i> , <i>H. megidis</i> y <i>S. feltiae</i>).				
Ubicaci3n	Larvas de cresa (5)	Pupas de gusano de la harina (5)	Larvas de gusanos de la harina (5)	Larvas de <i>Galleria</i> (3)
Parte superior	12/39 = 30,8%	39/50 = 78%	50/50 = 100%	25/30 = 83,3%
Parte central	19/45 = 42,2%	49/50 = 98%	40/50 = 80%	27/30 = 90%
Parte inferior	11/33 = 33,3%	40/50 = 80%	20/50 = 40%	25/30 = 83,3%
Total	42/117=35,9%	128/150 = 85,3%	110/150 = 73,3%	77/90 = 85,5%
	Total general	357/507 = 70,4%		

15 En general, el ataque por cada especie de nematodos beneficiosos sometidos a ensayo anteriormente se encontr3 principalmente en la parte superior y en menor medida para el ataque m3s profundo. Todos los nematodos usados parecen tener la capacidad de usar diferentes estrategias de b3squeda de hu3spedes, especialmente en el caso de *S. carpocapsaeas*, como buscador mediante emboscada que se encontr3 que pod3a adentrarse m3s profundo en el compost y atacar hu3spedes en todas las ubicaciones (parte superior, central e inferior), tablas 1-8. Sin embargo, la combinaci3n de mayor3a y minor3a aumenta el ataque en un 30- 100% a todos los niveles y por todas las especies de nematodos usadas en este caso. Los comportamientos de b3squeda de hu3spedes no supusieron ninguna diferencia en las combinaciones de mayor3a y minor3a, en todas las combinaciones de especies usadas, mediante emboscada, intermedia (mediante deambulaci3n y emboscada) y (mediante deambulaci3n), tabla 2, dos mediante deambulaci3n y una mediante emboscada, tabla 4, todas representan buscadores de hu3spedes mediante deambulaci3n, tabla 6, y dos mediante deambulaci3n y una intermedia (mediante deambulaci3n y emboscada), tabla 8. Todas las especies est3n presentes y pueden infectar a todos los niveles (parte superior, central e inferior), en mayor medida en la parte superior y central y en menor medida en la parte inferior, pero hay un gran aumento en el ataque de m3s del doble en comparaci3n con la especie individual (v3anse las tablas 1-8).

Otros ensayos se llevaron a cabo para evaluar el beneficio del uso de dos especies del mismo g3nero con estrategias de b3squeda de hu3spedes diferentes o iguales.

30 Tal como puede observarse a partir de la tabla 9, los nematodos beneficiosos (*S. Krause* (mediante deambulaci3n) y *S. feltiae* (intermedio)) lograron atacar al hu3sped a todos los niveles y siguieron el mismo patr3n que en especies individuales y en combinaci3n novedosa. Sin embargo, el nivel del ataque fue tan bajo como en la especie individual (v3anse las tablas 1, 3, 5 y 7).

35 Tabla 9

Porcentaje de larvas de insectos atacadas por <i>Steinernema kraussei</i> y <i>Steinernema feltiae</i>				
Ubicaci3n	Larvas de cresa (5)	Pupas de gusano de la harina (5)	Larvas de gusanos de la harina (5)	Larvas de <i>Galleria</i> (3)
Parte superior	14/50 - 28%	38/50 = 76%	39/50 = 78%	23/30 = 76,7%
Parte central	10/46 = 21,7%	36/50 = 72%	44/50 = 89%	22/30 = 73,3%
Parte inferior	5/48 = 10,4%	27/50 = 54%	3/50 = 6%	20/30 = 66,7%

Total	29/144 = 20%	101/150 = 67,3	86/150 = 57%	65/90 = 72,2%
	Total general	281/534 = 52,6%		

5 La tabla 10 muestra que los nematodos beneficiosos (*S. Krause* (mediante deambulaci3n) y *S. carpocapsae* (mediante emboscada)) lograron atacar al hu3sped a todos los niveles y siguieron de manera similar el mismo patr3n que en la especie individual y en la combinaci3n novedosa. Sin embargo, el nivel del ataque fue tan bajo como en la especie individual (v3anse las tablas 1, 3, 5 y 7).

Tabla 10

N3mero de larvas de insectos atacadas por <i>S. krausei</i> y <i>S. carpocapsae</i> .				
Ubicaci3n	Larvas de cresa (5)	Pupas de gusano de la harina (5)	Larvas de gusanos de la harina (5)	Larvas de <i>Galleria</i> (3)
Parte superior	8/38 = 21%	32/50 = 64%	46/50 = 92%	20/30 = 66,7%
Parte central	6/49 = 12,2%	24/50 = 48%	29/50 = 58%	21/30 = 70%
Parte inferior	2/45 = 4,4%	27/50 = 54%	2/50 = 4%	18/30 = 60%
Total	16/132 = 12,1%	83/150 = 55,5%	77/150 = 51,3%	Larvas de cresa, %
	Total general	235/522 = 45%		

10 La tabla 11 tambi3n muestra que los nematodos beneficiosos, *H. downesi* (mediante deambulaci3n) y *H. megidis* (mediante deambulaci3n), lograron atacar al hu3sped a todos los niveles y siguieron de manera similar el mismo patr3n que en la especie individual y en la combinaci3n novedosa. Sin embargo, el nivel de ataque fue tan bajo como en la especie individual (v3anse las tablas 1, 3, 5 y 7).

Tabla 11

N3mero de larvas de insectos atacadas por <i>H. downesi</i> y <i>H. megidis</i> .				
Ubicaci3n	Larvas de cresa (5)	Pupas de gusano de la harina (5)	Larvas de gusanos de la harina (5)	larvas de <i>Galleria</i> (3)
Parte superior	12/43= 27,9%	37/50 = 74%	13/50 = 26%	23/30 = 76,7%
Parte central	11/50= 22%	37/50= 74%	17/50 = 34%	22/30 = 44%
Parte inferior	5/50= 10%	22/50= 44%	4/50 = 8%)	12/30 = 40%
Total	28/143= 19,6%	96/150= 64%	34/150 = 22,7%	57/90 = 63,3%
	Total general	215/533=40,3%		

15 El resultado de las tablas 9, 10 y 11 sugiere que no hay ning3n beneficio de usar combinaciones que consisten en especies del mismo g3nero. Kaya y Koppenhofer (1996) mencionaron que esta competencia puede reducir la adecuaci3n de nematodos y puede provocar la extinci3n local de una especie de nematodos.

20 Para su confirmaci3n, las ventajas de esta invenci3n con respecto a la t3cnica anterior incluyen los siguientes puntos:

25 (i) La especie minoritaria es m3s eficaz en una formulaci3n de m3ltiples especies de la invenci3n que por s3 misma. Se encontr3 que esto era as3 a todas las profundidades.

(ii) La formulaci3n de esta invenci3n es independiente de la estrategia de b3squeda de hu3spedes usada por el nematodo ya que el efecto de eliminaci3n es fuerte cuando se someten a prueba la misma estrategia de b3squeda de hu3spedes (todos mediante deambulaci3n o todos mediante emboscada) o estrategias de b3squeda de hu3spedes diferentes.

30 (iii) El momento de la introducci3n de las especies de nematodos beneficiosos y de hu3sped por Neumann *et al.* (2006) es diferente de la formulaci3n de esta invenci3n.

35 **Referencias citadas**

Kaya, H. K., y A.M. Koppenhofer (1996). Coexistence of entomopathogenic nematode species (Steinernematidae and Heterorhabditidae) with different foraging behavior. *Fundam. Appl. Nematol.* 19: 175-183.

40 Neumannn, C. y E. J. Shield. 2006. Interspecific Interactions Among Three Entomopathogenic Nematodes, *Steinernema carpocapsae* Weiser, *Steinernema feltiae* Filipjev, and *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar, with

Different Foraging Strategies for Hosts in Multipiece sand Columns. *Environ. Entomol.* 35(6): 1576-1583.

REIVINDICACIONES

1. Producto envasado que comprende una formulación para su uso en el control biológico de plagas de insectos, comprendiendo la formulación una cohorte de nematodos parasitarios de insectos juveniles infecciosos y un medio para los nematodos, consistiendo la cohorte esencialmente en una mezcla de tres especies, en el que dos de las especies son de un primer género seleccionado de uno de *Steinernema* y *Heterorhabditis* y otra de las especies es de un segundo género seleccionado del otro de *Steinernema* y *Heterorhabditis*.
2. Producto envasado según la reivindicación 1, en el que las dos especies son del género *Steinernema* y la otra especie es del género *Heterorhabditis*.
3. Producto envasado según la reivindicación 1, en el que las dos especies son del género *Heterorhabditis* y la otra especie es del género *Steinernema*.
4. Producto envasado según la reivindicación 2 ó 3, en el que la(s) especie(s) de *Heterorhabditis* se selecciona(n) del grupo que comprende: *Heterorhabditis megidis*; *Heterorhabditis downsi* y *Heterorhabditis bacteriophora*.
5. Producto envasado según la reivindicación 2, 3 ó 4, en el que la(s) especie(s) de *Steinernema* se selecciona(n) del grupo que comprende: *Steinernema feltiae*; *Steinernema scapterisci*; *Steinernema riobravis*; *Steinernema carpocapsae*; y *Steinernema kraussei*.
6. Producto envasado según la reivindicación 1, en el que la cohorte de nematodos parasitarios de insectos juveniles infecciosos se selecciona del grupo que consiste en:
- (a) *Heterorhabditis downsi*, *Heterorhabditis bacteriophora* y *Steinernema feltiae*;
- (b) *Heterorhabditis downsi*, *Heterorhabditis bacteriophora* y *Steinernema carpocapsae*;
- (c) *Heterorhabditis megidis*, *Heterorhabditis bacteriophora* y *Steinernema kraussei*;
- (d) *Heterorhabditis megidis*, *Heterorhabditis downsi* y *Steinernema kraussei*;
- (e) *Heterorhabditis downsi*, *Heterorhabditis megidis* y *Steinernema carpocapsae*;
- (f) *Steinernema feltiae*, *Steinernema carpocapsae* y *Heterorhabditis downsi*;
- (g) *Steinernema feltiae*, *Steinernema carpocapsae* y *Heterorhabditis bacteriophora*;
- (h) *Steinernema scapterisci*, *Steinernema carpocapsae* y *Heterorhabditis bacteriophora*;
- (i) *Steinernema scapterisci*, *Steinernema carpocapsae* y *Heterorhabditis downsi*;
- (j) *Steinernema feltiae*, *Steinernema carpocapsae* y *Heterorhabditis megidis*; y
- (k) *Steinernema scapterisci*, *Steinernema carpocapsae* y *Heterorhabditis megidis*.
7. Producto envasado según cualquier reivindicación anterior, en el que el medio se selecciona del grupo que comprende vermiculita, arcilla fina y agua.
8. Método para el control biológico de una plaga de insectos objetivo predeterminada, método que emplea un producto envasado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, y en el que la especie individual en la formulación es un parásito especializado contra la plaga de insectos objetivo predeterminada, comprendiendo el método que la etapa de aplicar la formulación en el producto envasado a la tierra u otros medios en los que estén creciendo un producto agrícola y la plaga de insectos objetivo predeterminada.
9. Método según la reivindicación 8, en el que la plaga de insectos objetivo predeterminada es uno o más de larvas de *Sciaridae* y mosquitos de los hongos, y en el que la cohorte de nematodos juveniles infecciosos consiste en *Steinernema feltiae* y dos especies de *Heterorhabditis*.
10. Método según la reivindicación 8, en el que la plaga de insectos objetivo predeterminada es uno o más de grillo topo leonado y grillo topo meridional, y en el que la cohorte de nematodos juveniles infecciosos consiste en *Steinernema scapterisci* y dos especies de *Heterorhabditis*.
11. Método según la reivindicación 8, en el que la plaga de insectos objetivo predeterminada es uno o más de gorgojos de las raíces, el grillo topo leonado y el grillo topo meridional, y en el que la cohorte de nematodos juveniles

infecciosos consiste en *Steinernema riobravis*, y dos especies de *Heterorhabditis*.

12. Método según la reivindicación 8, en el que la plaga de insectos objetivo predeterminada es un gorgojo de las raíces, y en el que la cohorte de nematodos juveniles infecciosos consiste en *Heterorhabditis megidis*, y dos especies de *Steinernema*, o en el que la plaga de insectos objetivo predeterminada es uno o más de gusanos cogolleros, gusanos cortadores, palomillas, gorgojos de las raíces, barrenadores de madera, polillas de bráctea de la alcachofa, y en el que la cohorte de nematodos juveniles infecciosos consiste en *Steinernema carpocapsae* y dos especies de *Heterorhabditis*, o en el que la plaga de insectos objetivo predeterminada es uno o más de gorgojos de las raíces, barrenadores de madera y escarabajos, y en el que la cohorte de nematodos juveniles infecciosos consiste en *Heterorhabditis bacteriophora* y dos especies de *Steinernema*.