

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 769 549**

51 Int. Cl.:

**A01N 63/04** (2006.01)

**A01N 25/22** (2006.01)

**A01N 25/06** (2006.01)

**A01P 7/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.05.2014 PCT/EP2014/060674**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.11.2014 WO14187963**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.05.2014 E 14726351 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.11.2019 EP 3003032**

54 Título: **Formulación de pulverización y su uso en la protección de plantas**

30 Prioridad:

**24.05.2013 EP 13169157**

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

**26.06.2020**

73 Titular/es:

**BIOCARE GESELLSCHAFT FÜR BIOLOGISCHE  
SCHUTZMITTEL MBH (100.0%)**

**Dorfstrasse 4  
37574 Einbeck, DE**

72 Inventor/es:

**PATEL, ANANT;  
LOHSE, RIEKE y  
JAKOBS-SCHOENWANDT, DESIREE**

74 Agente/Representante:

**LOZANO GANDIA, José**

**Observaciones:**

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

ES 2 769 549 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 de pulverización y su uso en la protección de plantas

5 La presente invención se refiere a una formulación de pulverización y su uso en la protección de plantas. En particular, dicha formulación de pulverización es una formulación de pulverización adaptada para la colonización de plantas con esporas de endófitos, en particular, endófitos entomopatógenos. La formulación de pulverización de acuerdo con la presente invención incluye un tensioactivo, un compuesto protector UV, un nutriente y esporas de los endófitos. En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso de dicha formulación de pulverización en la protección de plantas, en particular, protección de plantas de cultivo y control de plagas, por ejemplo, contra fitopatógenos y plagas de plantas. Además, se proporciona un procedimiento de prevención o tratamiento de infestación de plantas con fitopatógenos y plagas de plantas que comprende la etapa de aplicar una formulación de pulverización de acuerdo con la presente invención sobre las plantas o una parte de las plantas. Finalmente, se proporciona un kit que comprende esporas de endófitos y una formulación de pulverización como se define en el presente documento.

## Técnica anterior

20 La protección de plantas contra fitopatógenos y las plagas de plantas es una demanda constante en agricultura. Típicamente, los plaguicidas comerciales que incluyen insecticidas se basan en entidades químicas. Sin embargo, existe una demanda continua del gobierno y del consumidor para reducir los plaguicidas e insecticidas químicos en consecuencia. En particular, la población solicita productos alimenticios u orgánicos ecológicos donde se reducen o eliminan los componentes químicos nocivos y los plaguicidas o insecticidas químicos.

25 Además, la eficacia de muchos plaguicidas disponibles comercialmente (por ejemplo, insecticidas, fungicidas, acaricidas) basados en entidades químicas ha disminuido debido al incremento en la resistencia en los fitopatógenos, incluyendo plagas y malezas.

30 Por tanto, existe una demanda continua de protección de plantas alternativa o complementaria, como estrategias de protección de cultivos incluyendo la aplicación de nuevos bioplaguicidas para el control de plagas.

35 El término endófito, como se introdujo por primera vez en 1866, se refiere ampliamente a cualquier organismo hallado dentro de los tejidos de autótrofos vivos. La definición de trabajo para el término se introdujo más tarde por Petrini en 1991 y desde entonces se ha aceptado. Define los endófitos como organismos que en algún momento de su vida colonizan tejidos vegetales internos sin provocar un daño aparente a su huésped. Los endófitos comprenden un grupo polifilético diverso de microorganismos que pueden presentar más de un tipo de historia vital en distintas fases de vida. Los endófitos son microorganismos que viven al menos partes de su ciclo vital de forma más o menos asintomática en las plantas.

40 (Pirttilä *et al.* 2011, Endophytes of forest trees, Springer Dordrecht)

45 Los endófitos se pueden transmitir verticalmente (directamente de progenitor a descendiente) o bien horizontalmente (entre individuos). Los endófitos fúngicos se describen en la técnica por ser útiles como bioplaguicidas. Los endófitos pueden beneficiar a las plantas huésped evitando que los organismos patógenos las colonicen. Es decir, un porcentaje notable de los endófitos tienen actividad entomopatógena. Por ejemplo, por micosis y/o liberación de una amplia gama de compuestos, es posible un control de enfermedades de plantas y plagas de plantas, por ejemplo, combatir plagas de insectos o fitopatógenos incluyendo prevenir la infestación de plantas con enfermedades de plantas y plagas de plantas.

50 El trabajo pionero sobre endófitos entomopatógenos se realizó en *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Ascomycota: Hypocreales), un hongo ubicuo transmitido por el suelo que es bioactivo contra una amplia gama de huéspedes de insectos (> 700 especies de insectos) y uno de los bioplaguicidas fúngicos más comercializados. *B. bassiana* es un endófito entomopatógeno que puede colonizar una amplia gama de especies de plantas, de las que muchas son de interés económico. Además, el *B. bassiana* endófito muestra eficacia contra una amplia gama de plagas de insectos dentro de las plantas y tiene el potencial de convertirse en un agente de biocontrol rentable. Por ejemplo, la cepa de *Beauveria bassiana* ATCC 74040 se describe como una herramienta disponible para el control de plagas, dicha cepa se comercializa como bioplaguicida "Naturalis" por Troy Biosciences, pero aún no para uso endófito.

60 Es decir, hasta la fecha, se ha determinado que más de 700 especies de hongos son patógenos para insectos y ácaros. Un hongo entomopatógeno bien conocido con distribución en todo el mundo debido a su amplia gama de huéspedes es *Beauveria bassiana* (Balsamo-Crivelli) Vuillemin. La vía de infección de *B. bassiana* implica típicamente varias etapas. Después de la unión de las esporas a la cutícula del insecto huésped, un tubo de germinación penetra en la cutícula con la ayuda de proteasas extracelulares. La invasión de *B. bassiana* en el cuerpo del huésped depende de la unión previa al tegumento, un proceso mediado por fuertes fuerzas de unión, hifas especializadas y condiciones ambientales adecuadas para la germinación de los conidios aéreos. Después de

superar la respuesta y reacción de defensa inmunitaria del huésped, el hongo comienza a proliferar dentro del huésped formando cuerpos hifales o blastosporas. Después de la muerte del huésped, *B. bassiana* forma nuevos conidios aéreos en la superficie del cuerpo por crecimiento saprófito.

5 Hoy en día, se han comercializado más de 170 agentes de control biológico de insectos basados en hongos entomopatógenos y más de un 75 % de estos productos se basan en los hongos Hypocreales *B. bassiana*,  
 10 *Metarhizium anisopliae*, *Isaria fumosorosea* y *Beauveria brongniartii*. Típicamente, se usan diferentes formulaciones de conidios aéreos para controlar las plagas de insectos herbívoros en el campo. Dos tercios de estos productos comercializados están compuestos de preparaciones de conidios aéreos de *B. bassiana* y *M. anisopliae*, aunque las  
 15 desventajas de las aplicaciones aéreas de estas formulaciones con conocidas desde hace mucho tiempo (Jackson *et al.* 2010, Biocontrol 55(1):129-145). La causa principal de la inestabilidad ambiental de los agentes de biocontrol es la irradiación solar debido a la sensibilidad de las esporas fúngicas (Cohen y Joseph 2009, Appl Clay Sci 42(3-4):569-574). Por lo tanto, su actividad se limita en condiciones de campo. Además, los agricultores deben tener en cuenta las condiciones climáticas durante las aplicaciones. Específicamente, la lluvia lavará las esporas de la superficie de la planta. La evitación del comportamiento en caso de contacto con *B. bassiana* o limpieza se ha encontrado en diferentes órdenes de insectos, lo que reduce la eficacia global de *B. bassiana* como agente de biocontrol.

20 Por ejemplo, en el documento WO 2011/117351 se describen un nuevo bioplaguicida y procedimientos para el control de plagas en base al *Beauveria bassiana* endofítico, DSM24665. Como se describe en él, *Beauveria bassiana* permite la colonización endofítica de diversas plantas incluyendo plantas comerciales importantes, permitiendo así proporcionar una protección contra plagas en comparación con la colonización epifítica con *B. bassiana* de dichos cultivos.

25 Vandenberg J.D. *et al.*, 1998, Biological and Microbial Control, 91 (3) 625 se refiere a una evaluación de pulverizaciones de *Beauveria bassiana* para el control de una palomilla dorso de diamante en crucíferas. Tefera y Vidal, Biocontrol, 2009, 54:663-669 describen un efecto del procedimiento de inoculación y el medio de crecimiento de plantas sobre la colonización endofítica de sorgo por el hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*. En el documento WO 2011/117351 A1 se describe un bioplaguicida y un procedimiento para el control de plagas.

30 La aplicación de los bioplaguicidas se puede llevar a cabo por diversos medios, dependiendo del punto temporal de aplicación, así como de la parte de la planta que se va a tratar.

**Formulación y aplicación de hongos entomopatógenos endofíticos**

35 Para obtener un agente de control biológico eficaz, se debe formular la biomasa fúngica para protegerla contra los factores de estrés ambiental. Se pueden considerar tres estrategias diferentes para la inoculación de plantas con hongos entomopatógenos endofíticos: por una aplicación de una suspensión de esporas a las partes aéreas de las plantas, por recubrimiento de semillas o bien por incorporación de esporas fúngicas o micelio en el suelo. Como en  
 40 muchos casos todavía se desconoce cómo se introducen exactamente los hongos entomopatógenos endofíticos en la planta, la formulación sigue siendo un desafío científicotécnico.

Puesto que la idea de la utilización de hongos entomopatógenos endofíticos como *B. bassiana* como agentes de biocontrol todavía es nueva, solo existen unos pocos informes sobre enfoques de formulación. Ninguno explora y  
 45 compara las tres opciones de aplicación. Por tanto, el siguiente análisis se ocupará principalmente de la formulación clásica del hongo entomopatógeno *B. bassiana*. Pero se debe mencionar en particular que las formulaciones deseadas para endofitos tienen que transportar los hongos fuera y dentro de las plantas y a los insectos. Obviamente, esto afectará a la estrategia de formulación y aplicación.

**50 Formulación de esporas fúngicas en pulverizaciones**

El procedimiento de inoculación más prevalente de hongos entomopatógenos es la aplicación por medio de pulverización de una suspensión de esporas sobre las hojas de plantas infestadas con los herbívoros objetivo. Casi todos los aproximadamente 170 micoinsecticidas y micoacaricidas disponibles comercialmente, de los que 58 se basan en *B. bassiana*, se formulan en diferentes tipos de pulverizaciones que contienen en un 70 % de los casos conidios aéreos, a menudo mezclados inevitablemente con micelio, a partir de una fermentación en estado sólido. Debido a su tiempo de vida útil relativamente alto, se requiere menos investigación en técnicas de formulación para estabilizar estas esporas. Ya se obtuvo una semivida de más de 210 días cuando se secaron conidios aéreos al 4-6 % de humedad y se almacenaron a 25 °C en 1997. Debido a sus características superficiales hidrófobas,  
 55 normalmente se formulan en pulverizaciones oleosas o polvos humectables. Las blastosporas de una fermentación sumergida son esporas de paredes finas con una función biológica que es crecer dentro de insectos infectados y no mantenerse ni sobrevivir en hábitats desfavorables. La opción de producir blastosporas en procesos de fermentación avanzados con altos rendimientos y productividad combinados con una rápida infección de insectos ha tentado a los grupos de investigación a investigar las formulaciones de estas esporas sensibles. Lane *et al.* (1991, Mycol Res 95(7):821-828) informaron de que las blastosporas de *B. bassiana* pierden viabilidad (es decir, capacidad para germinar) después de unos días cuando se almacenan a temperatura ambiente, otros mostraron que se obtuvo una  
 60

tasa de germinación de un 90 % cuando las blastosporas se secaron por pulverización con leche en polvo y jarabe de remolacha azucarera. Hasta ahora no se publican datos sobre el tiempo de vida útil de formulaciones de blastosporas y no está disponible ningún producto comercial basado en blastosporas de *B. bassiana*.

5 En comparación con blastosporas, las conidiosporas sumergidas presentan una velocidad de eliminación menor pero un tiempo de vida útil *per se* mayor y es por eso que las conidiosporas sumergidas son las esporas más prometedoras para una formulación estable. Pero hasta ahora, ninguna publicación se ocupa de la formulación de conidiosporas sumergidas de *B. bassiana*.

10 Para incrementar la viabilidad, la tasa de germinación y el tiempo de vida útil del *B. bassiana* endófito en las plantas y para ayudar al hongo a penetrar y colonizar las plantas con una formulación de pulverización adecuada, se sugiere incluir aditivos como humidificantes, adherentes, humectantes, nutrientes y protectores solares. Pero hasta ahora, la mayoría de los grupos de investigación usan formulaciones de pulverización simples basadas en agua y un detergente para la colonización de plantas con *B. bassiana* y otros hongos entomopatógenos endófitos.

15 En el caso de formulaciones de pulverización para el tratamiento de las hojas, retoños o brotes, la formulación de pulverización debe cumplir determinados requisitos. En particular, cuando se pulveriza la formulación de pulverización en las plantas, por ejemplo, las hojas, el ángulo de contacto de las gotas de pulverización con las hojas debe ser suficiente para permitir la difusión de la formulación sobre la superficie de la planta e incrementar los puntos de entrada para los endófitos. Además, se debe proporcionar protección contra el medio ambiente, por ejemplo, protección contra radiación UV o deshidratación de los endófitos antes de que los endófitos puedan colonizar la planta en consecuencia. Por ejemplo, la humedad debe ser suficiente para permitir la germinación de esporas.

20 Además, se han descrito formulaciones de pulverización basándose en bacterias como bioplaguicidas para tratar y controlar fitopatógenos. El documento EP 2070417 A1 describe microorganismos novedosos que controlan fitopatógenos aislados de *Cladosporium cladosporioides*. Se muestra la eficacia contra fitopatógenos infestados. Además, cabe señalar que el aislado puede crecer en la filosfera. Además, el documento WO 03/000051 A2 describe un biofungicida novedoso. En él se describe un procedimiento para controlar organismos fúngicos usando una cepa de cepa de *B. licheniformis* que tiene propiedades particulares, a saber, formando una capa de esporas densa con una alta resistencia relativa al daño por luz UV del sol para el tratamiento de infestación fúngica. En el documento CN20051120672, se identifica una suspensión adecuada como pulverización que contiene una combinación de un microorganismo entomopatógeno y un insecticida químico para tratar plantas infestadas con patógenos, en particular, plagas de insectos. El documento CN20101536189 se refiere a un procedimiento para mejorar las tasas de germinación de esporas de *B. bassiana* en cultivo usando un agitador pero no se refiere a una formulación de pulverización.

35 Por tanto, un objetivo de la presente invención es proporcionar nuevas formulaciones de pulverización que superen las desventajas descritas anteriormente, en particular, que son útiles para pulverizar en hojas o brotes permitiendo una alta tasa de colonización de la planta después de esto. Otro objetivo de la presente invención es proporcionar formulaciones de pulverización para su uso en la protección de plantas así como procedimientos para prevenir o tratar la infestación de plantas con enfermedades de plantas y plagas que incluyen fitopatógenos y plagas de insectos.

#### 45 **Sumario de la presente invención**

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a una formulación de pulverización adaptada para la colonización de plantas de acuerdo con la reivindicación 1 con esporas de endófitos, en particular, de endófitos entomopatógenos, dicha formulación de pulverización comprende:

- 50
- un tensioactivo, en un intervalo de desde un 0,01 a un 5 % en peso en base al peso total de la formulación de pulverización;
  - 55 - un compuesto protector UV, en un intervalo de desde un 0,05 a un 7 % en peso en base al peso total de la formulación de pulverización;
  - un nutriente, en un intervalo de desde un 0,1 a un 7 % en peso en base al peso total de la formulación de pulverización en la que el nutriente se selecciona de fuentes de carbono, glúcidos o extracto de levadura;
  - 60 - esporas de los endófitos en una cantidad de  $10^2$  a  $10^8$  esporas/ml de formulación de pulverización; y
  - opcionalmente, líquido hidrófilo, en particular, agua.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a la formulación de pulverización de acuerdo con la presente invención para su uso en protección de plantas, en particular, protección de plantas de cultivo, contra plagas de plantas y fitopatógenos, como plagas de insectos.

- 5 En otro modo de realización, la presente invención se refiere a un procedimiento de prevención o tratamiento de infestación de plantas con fitopatógenos y plagas de plantas, en particular, de plantas de cultivo con plagas de cultivo con lo que la formulación de pulverización de acuerdo con la presente invención se aplica en las plantas para permitir la colonización de los mismos con endófitos.
- 10 Finalmente, la presente invención proporciona un kit que comprende esporas de endófitos, preferentemente endófitos entomopatógenos y, en el mismo recipiente o bien en un recipiente separado, una formulación de pulverización de acuerdo con la presente invención.

**Breve descripción de los dibujos**

15 Figura 1: en la figura 1, se muestra la tasa de penetración de hojas de colza con lo que las esporas se dispersan en agua o bien en una formulación de pulverización de acuerdo con la presente invención. Además, se muestran los controles sin esporas, columna más a la derecha, y sin tensioactivo, segunda columna desde la derecha.

20 Figura 2: en la figura 2 se muestra la viabilidad de *B. bassiana* bajo estrés por UV-B. Como se demuestra, el compuesto protector UV TiO<sub>2</sub> incrementa la viabilidad de las esporas fúngicas drásticamente. Además, la melaza de remolacha azucarera nutritiva conocida por sus propiedades protectoras de UV presenta un incremento en la viabilidad en comparación con el control.

25 Figura 3: en la figura 3 se analiza la colonización de plantas de colza. La combinación de tensioactivo (Triton X-114 al 0,1 %) con nutriente (melaza de remolacha azucarera al 5 %) en presencia de agente protector UV (TiO<sub>2</sub> al 1 %) demuestra una alta colonización de las octavas hojas secundarias.

30 Figura 4: en la figura 4 se muestra la penetración de hojas de tomate. Como se demuestra, la penetración y, en consecuencia, la colonización es posible con la formulación de pulverización de acuerdo con la presente invención.

**Descripción detallada de la presente invención**

35 En un primer aspecto, la presente invención se refiere a una formulación de pulverización para la colonización de plantas con esporas de endófitos, en particular, de endófitos entomopatógenos, que comprende:

- 40 - un tensioactivo, en un intervalo de desde un 0,01 a un 5 % en peso en base al peso total de la formulación de pulverización;
- un compuesto protector UV, en un intervalo de desde un 0,05 a un 7 % en peso en base al peso total de la formulación de pulverización;
- 45 - un nutriente, en un intervalo de desde un 0,1 a un 7 % en peso en base al peso total de la formulación de pulverización en la que el nutriente se selecciona de fuentes de carbono, glúcidos o extracto de levadura;
- esporas de los endófitos en una cantidad de 10<sup>2</sup> a 10<sup>8</sup> esporas/ml de formulación de pulverización; y
- 50 - opcionalmente, líquido hidrófilo, en particular, agua.

La formulación de pulverización de acuerdo con la presente invención puede superar los problemas mencionados anteriormente. Por ejemplo, cuando simplemente se rocían las esporas dispersadas en agua en las plantas, solo se colonizarán unas pocas plantas. Por el contrario, la formulación de pulverización de acuerdo con la presente invención que incluye un tensioactivo, un compuesto protector UV y un nutriente conjuntamente con las esporas de los endófitos permite incrementar la cantidad de esporas en las hojas tratadas, así como una colonización exitosa de las hojas. Es decir, puesto que la cantidad de esporas mantenida en las plantas incrementa, es posible disminuir el número de esporas que se van a aplicar en las plantas. No solo se mejoró la colonización de las plantas sino también la mortalidad de insectos. Además, por la colonización de las plantas con endófitos es posible una protección permanente. Es decir, la formulación de acuerdo con la presente invención mejora la penetración y, posteriormente, la colonización de las plantas con los endófitos, por ejemplo, mejorando la tasa de colonización después del tratamiento con las esporas, pero también el tiempo de colonización y el grado de colonización de cada parte de las plantas. En otras palabras, la formulación mejora la penetración o infiltración de las esporas, en particular, las esporas germinadas y el micelio en las plantas o parte de las plantas. La mejora incluye el tiempo de colonización, así como la extensión de colonización de la planta o parte de la planta.

Como se usa en el presente documento, el término "penetración" se refiere a la entrada de los endófitos en la planta, por ejemplo, en las hojas.

5 Como se usa en el presente documento, el término "colonización" se refiere a la entrada de los endófitos en la planta y que viven en partes de la planta incluyendo hojas, raíces, tallo, semillas y flores. En contraste con el crecimiento en la filosofía de una hoja, es decir, en la superficie de las hojas, la colonización se refiere a vivir y crecer en la planta, incluyendo las hojas. La colonización se refiere en particular a colonización endofítica.

10 Es decir, el uso de la formulación de pulverización de acuerdo con la presente invención que comprende un tensioactivo, un compuesto protector UV, un nutriente y las esporas de los endófitos demuestran una colonización exitosa de plantas después del tratamiento con la formulación de pulverización. La formulación de pulverización de acuerdo con la presente invención es una formulación de pulverización en la que el tensioactivo está presente en un intervalo de desde un 0,01 a un 5 % en peso en base al peso total de la formulación de pulverización; un compuesto protector UV, en un intervalo de desde un 0,05 a un 7 % en peso en base al peso total de la formulación de pulverización; un nutriente en un intervalo de desde un 0,1 a un 7 % en peso en base al peso total de la formulación de pulverización; y esporas de los endófitos, en una cantidad de  $10^2$  a  $10^8$  esporas/ml de formulación de pulverización.

20 La cantidad de tensioactivo está en un intervalo de desde un 0,01 a un 5 % en peso en base al peso total de la formulación de pulverización, como en un intervalo de desde un 0,05 a un 2 % en peso en base al peso total de la formulación de pulverización, en particular, en el intervalo de desde un 0,1 a un 0,5 % en peso en base al peso total de la formulación de pulverización. La cantidad de compuesto protector UV está en un intervalo de desde un 0,05 a un 7 % en peso en base al peso total de la formulación de pulverización, como en un intervalo de desde un 0,2 a un 5 % en peso en base al peso total de la formulación de pulverización, en particular, en el intervalo de desde un 0,5 a un 2 % en peso en base al peso total de la formulación de pulverización. La cantidad de nutriente está en un intervalo de desde un 0,1 a un 7 % en peso en base al peso total de la formulación de pulverización, como en un intervalo de desde un 0,2 a un 5 % en peso en base al peso total de la formulación de pulverización, en particular, en el intervalo de desde un 0,5 a un 2 % en peso en base al peso total de la formulación de pulverización.

30 La cantidad de esporas está en el intervalo de desde  $10^2$  a  $10^8$  esporas/ml de formulación de pulverización. Preferentemente, la cantidad de esporas está en el intervalo de desde  $10^3$  a  $10^7$  esporas/ml de formulación de pulverización, por ejemplo, en el intervalo de desde  $10^4$  a  $10^7$ , como de  $10^4$  a  $10^6$  esporas/ml de formulación de pulverización. El experto en la técnica es consciente de los procedimientos adecuados para determinar la cantidad de esporas necesaria para prevenir o tratar la infestación de las plantas en consecuencia.

35 Típicamente, el componente restante en la formulación de pulverización es un líquido hidrófilo, como agua, u otros disolventes hidrófilos u otro medio de dispersión que no dañe las esporas y que puede dispersar homogéneamente los componentes de la formulación de pulverización. La formulación de pulverización también puede estar en forma de un concentrado o puede estar en forma sólida lista para la reconstitución por el líquido hidrófilo, por ejemplo, en forma de un polvo humectable. Además, las cantidades preferentes de los ingredientes de la formulación de pulverización como se identifica anteriormente se refieren al peso total de una formulación de pulverización lista para su uso. Es decir, la formulación de pulverización puede estar en forma de una solución lista para su uso o puede estar en forma de un concentrado que contiene las esporas de los endófitos o bien no. Además, la formulación de pulverización se puede proporcionar en forma de un polvo humectable, por ejemplo, en el que la formulación de pulverización en polvo se soporta en un vehículo. Preferentemente, el vehículo puede ser un vehículo seleccionado de tierra de diatomeas, talco, arcilla, vermiculita, alginato, glúcidos, matrices de almidón o polímeros sintéticos. El concentrado de la formulación de pulverización, en forma líquida o bien sólida, se puede reconstituir poco antes de aplicar dicha formulación de pulverización en las plantas. Típicamente, la reconstitución se ve afectada por el líquido hidrófilo, en particular, agua. Es decir, la formulación de pulverización puede estar en forma de un polvo humectable o gránulos con vehículos inertes o nutricionales.

50 La formulación de pulverización de acuerdo con la presente invención puede contener componentes adicionales. Por ejemplo, la formulación de pulverización de acuerdo con la presente invención puede contener un agente adhesivo o adherente para incrementar la adhesión de las plantas de la formulación de pulverización. Los agentes adhesivos o adherentes adecuados son: melaza de remolacha azucarera, derivados de celulosa, leche desnatada, alginato, aceite o sorbitol. Es preferente que el agente adhesivo esté presente en el intervalo de desde un 0,1 a un 5 % en peso en base al peso total de la formulación de pulverización.

60 Además, la formulación de pulverización puede contener otros adyuvantes. Por ejemplo, la formulación de pulverización puede comprender adicionalmente un humectante. El humectante retrasa la evaporación del líquido, típicamente agua, en las gotas pulverizadas en las hojas.

65 Como se usa en el presente documento, el término "humectante" incluye compuestos que pueden retrasar la evaporación del líquido de la formulación de pulverización de acuerdo con la presente invención. Además, el término "humectantes" incluye compuestos con propiedades de retención de líquido, en particular de agua, por ejemplo, para proporcionar un ambiente que favorezca la germinación de las esporas. Los ejemplos típicos de humectantes útiles

de acuerdo con la presente invención incluyen biopolímeros (polipéptidos, polisacáridos), como gelatina, carboximetilcelulosa o xantano. Además, la formulación de pulverización puede contener relleno. Dicho relleno es útil para permitir la preparación uniforme de la formulación de pulverización, por ejemplo, puede suprimir la aglutinación de los componentes presentes en la formulación de pulverización. Los ejemplos adecuados de rellenos incluyen: arcilla, lactosa o talco. El relleno puede estar presente en el intervalo de desde un 15 a un 45 % en peso en base al peso total de la formulación de pulverización. Además, la formulación de pulverización puede contener un estimulante que facilita la germinación de las esporas y/o la entrada de los endófitos en la planta. Como se usa en el presente documento, el término "estimulante" se refiere a sustancias que incrementan la germinación de esporas y/o el crecimiento de las hifas fúngicas en las superficies de plantas. Además, también se pueden usar inductores y otras sustancias de señalización de plantas como estimulantes.

Los ejemplos adecuados de estimulantes son: aminoácidos, extractos de plantas, glúcidos, oligosacáridos, harina de maíz, quitosano o gelatina. Los estimulantes tienen preferentemente una actividad de promover la germinación de las esporas y/o de promover el crecimiento, así como la penetración, de los endófitos mientras germinan y/o penetran. Preferentemente, los estimulantes están presentes en el intervalo de desde un 0,1 a un 1 % en peso en base al peso total de la formulación de pulverización. Otros auxiliares adecuados incluyen agentes antiespumantes, dichos agentes antiespumantes que son bien conocidos para experto en la técnica, están preferentemente en el intervalo de un 0,01 a un 1 % en peso en base al peso total de la formulación de pulverización. Además, puede estar presente un espesante, el espesante puede estar presente en el intervalo de desde un 0,1 a un 3 % en peso en base al peso total de la formulación de pulverización.

Dependiendo del tipo de aplicación de la formulación de pulverización y el almacenamiento de la formulación de pulverización, pueden estar presentes otros auxiliares o adyuvantes en la formulación de pulverización de acuerdo con la presente invención.

A este respecto, cabe señalar que el término "comprender" y "que comprende" o "contener" o "que contiene" que se usan de manera intercambiable en el presente documento incluyen el modo de realización de "consistir" o "que consiste en".

La formulación de pulverización de acuerdo con la presente invención contiene un nutriente para las esporas en germinación. Como se usa en el presente documento, el término "nutriente" se refiere a los componentes nutritivos que un organismo utiliza para sobrevivir y crecer, es decir, cualquier sustancia que nutra a un organismo. Dicho nutriente se selecciona de una fuente de carbono, en particular, una melaza de remolacha azucarera, glúcidos como sacarosa o glucosa o extracto de levadura. Por ejemplo, en el caso de melaza de remolacha azucarera, dicha melaza presenta adicionalmente efecto protector UV. Es decir, por ejemplo, mayores cantidades, como un 4 % o superior, como un 5 % o superior de melaza de remolacha azucarera tienen un efecto protector UV además de ser un nutriente para las esporas. En menores cantidades, como aproximadamente un 1 % o menos, la melaza de remolacha azucarera se usa principalmente por sus propiedades nutritivas.

El tensioactivo presente en la formulación de pulverización de acuerdo con la presente invención es preferentemente un tensioactivo no iónico. Los ejemplos típicos de tensioactivos adecuados incluyen tensioactivos basados en trisiloxano, Triton X-114 u otros miembros de la familia Triton. Además, el tensioactivo es preferentemente una sustancia tensioactiva que tiene una tensión de superficie de menos de 40 mN/m, por ejemplo, de menos de 30 mN/m. El tensioactivo permite mejorar el ángulo de contacto de la formulación en las hojas o brotes y reducir la tensión de superficie.

Además, el compuesto protector UV se selecciona preferentemente de dióxido de titanio, melaza de remolacha azucarera o rojo de metilo. Es decir, en base al efecto del rayo solar, la radiación UV se refleja o se absorbe. Para llevar el dióxido de titanio a solución, puede ser necesario acidificar la formulación permitiendo que el dióxido de titanio esté presente en forma de suspensión. En caso de usar melaza de remolacha, la cantidad de la misma es preferentemente de un 4 % o superior, como un 5 % o superior.

El experto en la técnica conoce bien o puede derivar fácilmente los ingredientes adecuados de la formulación de pulverización, en particular, tensioactivos adecuados, compuestos protectores UV y nutrientes. Los componentes de la formulación de pulverización se seleccionan de forma que se minimice el lavado de las gotas de pulverización en las hojas, se incremente el área de contacto entre la planta, por ejemplo, la hoja y las gotas, y se facilite la entrada de los endófitos en la planta. En particular, el experto en la técnica es consciente de seleccionar componentes adecuados que no dañen la viabilidad de las esporas.

Típicamente, las esporas de los endófitos, en particular, de endófitos entomopatógenos, están presentes en una cantidad de  $10^2$  a  $10^8$  esporas/ml de formulación de pulverización, como de  $10^4$  a  $10^7$  esporas/ml en formulación de pulverización en base a la formulación lista para su uso.

Dependiendo de las circunstancias, la formulación de pulverización de acuerdo con la presente invención puede estar en forma de una única formulación o puede estar presente en forma de dos o más partes separadas en recipientes diferentes. En un modo de realización alternativo, la formulación de pulverización se puede proporcionar

en partes separadas que contienen por un lado las esporas, en una parte separada el líquido hidrófilo, como agua para la reconstitución de un concentrado que está presente en una tercera parte de la formulación de pulverización de acuerdo con la presente invención.

5 La formulación de pulverización de acuerdo con la presente invención es adecuada para pulverizar de 0,5 a 4 bar con una boquilla de pulverización comercial o en una pulverización de volumen ultrabajo. Por supuesto, es posible aplicar la formulación por otros medios incluyendo cepillar las plantas o parte de las plantas o sumergirlas, etc.

10 Como se identifica anteriormente, los endófitos son preferentemente endófitos entomopatógenos, permitiendo así combatir la infestación de plagas o plantas.

Es preferente que las esporas de los endófitos sean blastosporas conidiosporas sumergidas o aeroconidios o mezclas de los mismos. Es en particular preferente que se use una mezcla de conidiosporas y blastosporas o conidiosporas solas.

15 Es preferente que estos endófitos entomopatógenos se seleccionen de los hongos *Beauveria bassiana* o *Metarhizium anisopliae*, también denominado actualmente *Metarhizium spp.* tal como *M. anisopliae* Aggr.

20 La formulación de pulverización de acuerdo con la presente invención está adaptada para la colonización de plantas con esporas de endófitos. Es preferente que dichas plantas sean plantas de cultivo o plantas ornamentales, en particular, de colza, tomate, maíz (*Zea mays*), grano, algodón, patata, remolacha azucarera, plantas de café, vid, *Vicia faba*, garbanzo, tabaco, soja, plantas de cacao, adormidera, frijol, repollo, pino, arroz, palmera datilera, plátano, orquídeas o sorgo. Por ejemplo, las plantas son plantas multiplicadas y cultivadas por micropropagación.

25 Es decir, la formulación de pulverización representa un bioplaguicida adecuado para la protección de plantas de plantas de cultivo o plantas ornamentales económicamente valiosas. En particular, la formulación de pulverización permite proteger dichas plantas de fitopatógenos y plagas de plantas, como plagas de insectos, desde dentro, tal como hacen las plantas transgénicas. Sin embargo, en contraste con las plantas transgénicas, la formulación de pulverización útil como bioplaguicida permite colonizar dichas plantas con endófitos entomopatógenos, protegiéndolas así de la plaga o del fitopatógeno en consecuencia.

30 La formulación de pulverización es en particular útil en la protección de plantas como la protección de plantas de cultivo. Además, la formulación de pulverización es útil en la protección contra fitopatógenos y plagas de plantas, como plagas de cultivo.

35 Como se usa en el presente documento, el término "plagas de plantas" incluye insectos, nematodos, ácaros y garrapatas. El término "fitopatógenos" como se usa en el presente documento incluye microorganismos como hongos o bacterias responsables o que son parte de enfermedades de plantas.

40 Es decir, la pulverización de acuerdo con la presente invención es en particular útil para prevenir la infección con fitopatógenos incluyendo microorganismos e infestación con insectos, así como para proteger contra infestación con fitopatógenos.

45 Es decir, la formulación de pulverización puede incluir esporas del endófito de *B. bassiana* que permite proteger contra *Ceutorhynchus napi*, *Brassicogethes aeneus* o *Ceutorhynchus assimilis*, *Plutella xylostella* en plantas de colza. Por ejemplo, las plantas son colza y el endófito es *B. bassiana*, como el aislado de *B. bassiana* DSM 24665.

50 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento para prevenir o tratar la infestación de plantas con fitopatógenos y plagas de plantas, en particular, de plantas de cultivo con plagas de cultivo, incluyendo o comprendiendo la etapa de aplicar la formulación de pulverización de acuerdo con la presente invención a plantas, en particular, parte de las plantas para la colonización de las plantas con endófitos.

55 El término "plantas" como se usa en el presente documento incluye también partes de las plantas, como hojas, semillas, tallos, ramas, raíces, brotes o retoños, a menos que se indique de otro modo. Es preferente que la formulación de pulverización de acuerdo con la presente invención se aplique al menos en las hojas y brotes de la planta. Si es necesario, se puede repetir la liberación de la formulación de pulverización sobre las plantas. Es preferente que el procedimiento de acuerdo con la presente invención sea un procedimiento en el que una espora del aislado de *B. bassiana*, por ejemplo, la cepa de *B. bassiana* depositada bajo el número DSM 24665, se rocíe en colza para proteger dichas plantas contra plagas de insectos, como *Ceutorhynchus napi*, *Brassicogethes aeneus* o *Ceutorhynchus assimilis*.

60 *Beauveria bassiana*, que se puede usar en la formulación de pulverización de acuerdo con la presente invención, así como en los procedimientos de acuerdo con la presente invención, son eficaces para infectar y matar una amplia variedad de insectos económicamente importantes, en particular insectos transmitidos por el suelo, pero incluyendo también algunos insectos que habitan el suelo y el dosel. Los insectos que se pueden controlar por el *Beauveria bassiana* incluyen los gorgojos de la raíz, gusanos de la raíz, gusanos de alambre, gusanos, chinches, pulgones,

5 escarabajos, gorgojos de la raíz, barrenadores, moscas de la fruta, gusanos del suelo, gusanos de la raíz, termitas y hormigas, en particular gusano de la raíz del maíz (*Diabrotica spp.*), gorgojo de la vid negra (*Otiorynchus sulcatus*), gorgojo de la raíz de cítricos (*Diaprepes abbreviatus*), gorgojo de la batata (*Cylas formicarius*), gusano de la raíz de la remolacha azucarera (*Tetanops myopaeformis*), gusano de la col (*Delia radicum*), gusano de la cebolla (*Delia antigua*), gusano del nabo (*Delia floralis*), gusano de la semilla de maíz (*Delia platura*), mosca de la zanahoria (*Psila rosae*), escarabajo japonés (*Popillia japonica*), gusano blanco europeo (*Rhizotrogus majalis*), barrenador del café (Hypothenemus hampei), barrenador del tallo (Chilo partellus), termita subterránea (*Reticulitermes* y *Coptotermes spp.*). Además, determinados insectos que habitan en el dosel, en especial los que habitan en la corteza, se pueden controlar por el *Beauveria bassiana* de la presente invención. Estos insectos incluyen el barrenador esmeralda del fresno (*Agilus planipennis*), polilla gitana (*Lymantria dispar*) y gorgojo de la pacana (*Curculio caryae*).

La formulación de pulverización de acuerdo con la presente invención es adecuada como bioplaguicida contra insectos herbívoros u otras plagas, como se detalla a continuación:

15 **plagas del maíz:** gusano del maíz (*Helicoverpa zea*), gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda*), gusano soldado común (*Pseudaletia unipuncta*), barrenador del tallo (*Papaiperna nebris*), pulgón de la hoja del maíz (*Rhopalosiphum maidis*), barrenador europeo del maíz (*Ostrinia nubilalis*) (BCE), mosca de los estigmas del maíz (*Euxesta stigmatis*), barrenador menor del tallo del maíz (*Elasmopalpus lignosellus*), delfácido del maíz (*Peregrinus maidis*), gusano de la raíz del maíz occidental (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte), barrenador del maíz del suroeste (*Diatraea grandiosella*), gorgojo del maíz (*Sitophilus zeamais*)

20 **plagas de la colza:** *Meligethes aeneus*, chinche arlequín (*Murgantia histrionica*), escarabajos pulga (*Phyllotreta* sp.), palomilla dorso de diamante (*Plutella xylostella*), gusano del ejército Bertha (*Mamestra configurata*), gusano de la raíz (*Delia* sp.), saltamontes, chinches de *Lygus* (*Lygus* spp.), larvas de escarabajo de campo oscuro, caracoles y babosas.

25 **plagas del algodón:** gorgojo de la cápsula, gusano de la cápsula del algodón gusano de la cápsula rosa (*Pectinophora gossy-piella*); los trips del chile (*Scirtothrips dorsalis*) y el insecto de la semilla de algodón (*Oxycarenus hyalinipennis*).

30 **Plagas del cacao:** barrenador de la vaina de cacao (*Conopomorpha cramerella*), chinches del cacao o cápsides

35 **Plagas del trigo:** la llama (*Axyliia putris*), polilla nocturna del trigo (*Apamea sordens*), polilla *Setaceous Hebrew character* (*Xestia c-nigrum*), polilla del nabo (*Agrotis segetum*).

**Plagas del sorgo:** *Chilo partellus*, *Busseola fusca*, *Sesamia calamistis*.

40 En otro aspecto, la presente invención proporciona un kit que comprende esporas de endófitos, preferentemente endófitos entomopatógenos y en un recipiente separado una formulación de pulverización de acuerdo con la presente invención sin contener dichas esporas de dichos endófitos. Las esporas de los endófitos pueden estar presentes en forma liofilizada o forma seca, mientras que la formulación de pulverización restante de acuerdo con la presente invención, excluyendo las esporas de dichos endófitos, está en forma de concentrado, en forma liofilizada o como una formulación lista para su uso. El kit se puede usar para preparar la formulación de pulverización de acuerdo con la presente invención.

45 El kit de acuerdo con la presente invención es en particular útil en el procedimiento de acuerdo con la presente invención para prevenir o tratar la infestación de plantas con fitopatógenos y plagas de plantas incluyendo plagas de insectos, en particular, por ejemplo, prevenir o tratar la infestación de plantas de cultivo con plagas de cultivo. La formulación de pulverización lista para su uso se puede preparar inmediatamente antes de pulverizar la formulación de pulverización sobre las plantas. El experto en la técnica es consciente de los medios adecuados para pulverizar la formulación de pulverización.

50 La presente invención se describirá además por medio de ejemplos.

## 55 Ejemplo 1

### Preparación de la formulación de pulverización

60 La formulación de pulverización como se muestra en la tabla 1 se ha preparado como sigue: las formulaciones de pulverización se prepararon como soluciones a base de agua. Todos los componentes, con la excepción de las esporas de *B. bassiana*, se esterilizaron antes de su uso. Los tensioactivos Break-Thru S240 (Evonik Industries, Essen, Alemania) y Triton X 114 (Applichem, Darmstadt, Alemania), la gelatina humectante 280 Bloom (Gelita, Eberbach, Alemania) y el nutriente melaza de remolacha azucarera (Südzucker, Warburg, Alemania) se mezclaron con agua hirviendo y se almacenaron a temperatura ambiente hasta que se añadieron esporas. Inmediatamente después de su adición, la formulación se mezcló cuidadosamente y se pulverizó en las plantas.

Para formulaciones con dióxido de titanio, se añadieron 2 ml/l de una solución diluida de ácido nítrico con un pH de 3,38 para permitir que el dióxido de titanio esté presente en forma de suspensión.

Tabla 1

5

N.º	Tensioactivo	Humectante	Nutriente	Compuesto protector UV	Esporas
1	Break-Thru S240 (0,1 %)		melaza de remolacha azucarera (1 %)	dióxido de titanio (1 %)	10 <sup>6</sup> esporas/ml
2	Triton X 114 (0,1 %)		melaza de remolacha azucarera (1 %)		10 <sup>6</sup> esporas/ml
3	Break-Thru S240 (0,1 %)	gelatina 280 Bloom (0,1 %)			10 <sup>6</sup> esporas/ml
4	Triton X 114 (0,1 %)	gelatina 280 Bloom (0,1 %)			10 <sup>6</sup> esporas/ml
5	Break-Thru S240 (0,1 %)	gelatina 280 Bloom (0,1%)	melaza de remolacha azucarera (1 %)		10 <sup>6</sup> esporas/ml
6	Triton X 114 (0,1 %)	gelatina 280 Bloom (0,1 %)	melaza de remolacha azucarera (1 %)		10 <sup>6</sup> esporas/ml
7	Break-Thru S240 (0,1 %)				10 <sup>6</sup> esporas/ml
8	Triton X 114 (0,1 %)				10 <sup>6</sup> esporas/ml
9	Break-Thru S240 (0,1 %)	gelatina 280 Bloom (0,1%)	melaza de remolacha azucarera (1 %)		
10	Triton X 114 (0,1 %)	gelatina 280 Bloom (0,1%)	melaza de remolacha azucarera (1 %)		
11	Break-Thru S240 (0,1 %)		levadura de panadería (1 %)		
12	agua				

### Ejemplo 2

#### Pruebas de formulaciones de pulverización en plantas de colza

10 Las formulaciones se pulverizaron con una boquilla de pulverización comercial en la sexta hoja secundaria de plantas de colza de 7 semanas y se incubó aproximadamente a un 45 % de humedad relativa y 20 °C. En las primeras 48 h después de la aplicación, las hojas tratadas se envolvieron con una bolsa de plástico, de modo que se obtuvo una humedad relativa de un 95 %. La cantidad aplicada de formulación de pulverización se determinó con el peso del depósito antes y después de la pulverización. Después de 7 semanas, la colonización de las octavas hojas secundarias se detectó con PCR, realisamiento y microscopía.

### Ejemplo 3

20 Las formulaciones de pulverización se aplicaron en el ápice de la hoja de plantas de colza y se incubó. Después de 2 semanas en secciones transversales de control, se pudo mostrar cualquier crecimiento de hongos, pero en secciones transversales de rasgaduras medias de plantas tratadas con *B. bassiana* se pudo mostrar crecimiento fúngico hongos intercelular, véase la figura 1. Aunque se muestran altas tasas de colonización para formulaciones que contienen el tensioactivo, el nutriente, las esporas y, opcionalmente, el compuesto protector UV, excluir el tensioactivo o el nutriente reduce extraordinariamente las tasas de colonización. El control más a la derecha que no contiene esporas y el control solo con agua, más a la izquierda, casi no muestran colonización. Cabe destacar que las pruebas se realizan sin radiación UV. Además, cabe destacar que la melaza de remolacha azucarera presenta ambos rasgos característicos, es un nutriente y tiene propiedades protectoras UV.

25

De las diferentes formulaciones de pulverización que contienen diferentes cantidades de humectantes, nutrientes, componentes de absorción UV y tensioactivos, la formulación n.º 2 de la tabla 1 dio los mejores resultados conteniendo Triton X-114 como tensioactivo, melaza de remolacha azucarera como nutriente y dióxido de titanio como compuesto protector UV.

5

#### Ejemplo 4

Viabilidad de *B. bassiana* bajo luz UV-B

10 Diferentes agentes de protección UV como melaza de remolacha azucarera al 5 % y dióxido de titanio al 1 %, que se acidificaron con ácido nítrico a pH 6,0, se sometieron a autoclave durante 20 min a 121 °C y después, se inoculó con  $10^6$  esporas/ml. Además, NaCl al 0,9 % con  $10^6$  esporas/ml sirvió como control. A continuación, se colocaron 10 ml de cada muestra en una placa de Petri con un diámetro de 65 mm y se trataron con radiación UV-B (lámpara UV portátil UVM 57 de 302 nm, UVP, Cambridge, Reino Unido) durante 0, 10, 30, 60 y 120 min. La intensidad de radiación en la parte superior de la suspensión de esporas se ajustó a  $100 \pm 5 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ .

15

Se investigó la influencia de diferentes agentes de protección UV sobre la viabilidad de esporas después de radiación UV-B debido a que la luz solar es uno de los factores más dañinos a los que se enfrentan los hongos en las hojas. Dos posibles agentes de protección UV, a saber, dióxido de titanio al 1,0 % y melaza de remolacha azucarera al 5 %, se mezclaron con  $10^6$  esporas/ml y se trataron con radiación UV-B durante 120 min, como se muestra en la figura 2. En vista de las desviaciones estándar, la viabilidad de las esporas en la solución de NaCl al 0,9 % sin radiación UV-B se mantuvo estable con el tiempo. Por el contrario, la viabilidad de las esporas en la solución de NaCl al 0,9 % disminuyó hasta un 0 % y la suspensión de esporas con melaza de remolacha azucarera al 5 % y dióxido de titanio al 1 % presentó una viabilidad de un  $79 \pm 14$  % y  $92 \pm 17$  %, respectivamente. Durante la radiación UV-B en curso se observó una reducción adicional de las viabilidades a un  $57 \pm 14$  % para melaza y  $77 \pm 11$  % para dióxido de titanio.

20

25

#### Ejemplo 5

30 Ensayo de colonización en plantas de colza

Las formulaciones de pulverización que consisten en diferentes composiciones de tensioactivo al 0,1 %, humectante al 0,1 %, nutriente al 1 % y agente de protección UV al 1 % se sometieron a autoclave por separado durante 20 min a 121 °C. Después de mezclar bien, la suspensión de esporas se añadió de modo que la formulación de pulverización final contenía  $10^6$  esporas/ml. La formulación de control no contenía biomasa fúngica. Las formulaciones de pulverización se aplicaron por cepillado en el lado adaxial de las sextas hojas secundarias de plantas de colza de 7 semanas. Después de 12 h de oscuridad, se comenzó el fotoperíodo de 12 h. Para incrementar la humedad relativa al 95 %, las hojas tratadas se envolvieron con bolsas de plástico durante las primeras 48 h. La concentración de esporas por área se determinó por el peso de la formulación de pulverización aplicada. Después de 7 semanas, se recogieron las octavas hojas secundarias para la detección de colonización endofítica con *B. bassiana*.

35

40

Las formulaciones de pulverización novedosas se aplicaron en las sextas hojas secundarias de plantas de colza de 7 semanas ( $n=8$ ). Se observó que la adición de un tensioactivo dio lugar a un incremento de 15 veces de la concentración de formulación adherida y, por lo tanto, a un incremento en la concentración de esporas fúngicas de  $5,6 \pm 1,2 \times 10^5$  esporas/hoja a  $0,4 \pm 0,1 \times 10^5$  esporas/hoja. Después de un tiempo de incubación de 7 semanas, el crecimiento de hifas endofíticas de *B. bassiana* se detectó en el tejido de octavas hojas secundarias por microscopía óptica. Para cuantificar la colonización a partir de la detección microscópica de *B. bassiana*, se seleccionaron al azar cuatro plantas de ocho réplicas y por razones logísticas se investigó una sección transversal de hoja a medio rasgar por planta. La cantidad de octavas hojas secundarias colonizadas se calculó en base a estas 4 secciones transversales, véase la figura 3. No se detectó crecimiento de hifas en los tratamientos sin biomasa fúngica, figura 3, carril 2. Además, se detectó *B. bassiana* en un 25 % de las octavas hojas secundarias de plantas que se trataron con una suspensión de esporas en agua, figura 3, carril 1. Las formulaciones basadas en Break-Thru® al 0,1 % o Triton X-114 al 0,1 %, opcionalmente con melaza de remolacha azucarera al 1 %, y en combinación con dióxido de titanio al 1 % y  $10^6$  esporas/ml incrementan la colonización de hojas. La colonización de las octavas hojas secundarias se incrementó hasta un 75 % para plantas tratadas con la formulación a base de Triton X-114 en presencia de dióxido de titanio e incluso hasta un 100 % para plantas tratadas con la formulación a base de Triton X-114 en combinación con la melaza de remolacha azucarera y en presencia de dióxido de titanio. Además de la detección microscópica de *B. bassiana* en las hojas, el hongo también fue detectable por medio de reaislamiento y posterior PCR anidada. Además, *B. bassiana* se reaisló de algunas de las plantas tratadas con la formulación que contenía Triton X-114 al 0,1 %, melaza al 1 %, dióxido de titanio al 1 % y  $10^6$  esporas/ml.

45

50

55

60

Tabla 2

N.º	Tensioactivo	Nutriente	Compuesto protector UV	Esporas
1				10 <sup>6</sup> esporas/ml
2	Triton X-114 (0,1 %)	melaza de remolacha azucarera (1 %)	dióxido de titanio (1 %)	
3	Triton X-114 (0,1 %)		dióxido de titanio (1 %)	10 <sup>6</sup> esporas/ml
4	Triton X-114 (0,1 %)	melaza de remolacha azucarera (1 %)	dióxido de titanio (1 %)	10 <sup>6</sup> esporas/ml

### Ejemplo 6

#### Ensayo de penetración en plantas de tomate

5 Además de la aplicación en colza, las formulaciones de pulverización también se aplicaron en dos segundas hojas secundarias de plantas de tomate de 6 semanas. Se aplicaron por cepillado las pulverizaciones en aproximadamente 2 cm de las puntas de hojas y se marcaron las áreas de hojas tratadas. Después de 12 h de oscuridad, se comenzó el fotoperíodo de 12 h. Para incrementar la humedad relativa hasta un 95 %, las hojas tratadas se envolvieron con bolsas de plástico durante 48 h. Después de 7 días, se cortaron las puntas de las hojas y se recogió el área no tratada de las hojas para la detección de colonización endofítica con *B. bassiana*.

15 Se sometieron a prueba diferentes formulaciones de pulverización en base a Triton X-114 al 0,1 %, melaza de remolacha azucarera al 1 % y dióxido de titanio al 1 % con 10<sup>6</sup> esporas/ml para determinar su potencial para colonizar hojas de tomate con *B. bassiana* (n=10). En este "ensayo de penetración" (figura 4), las suspensiones se aplicaron por cepillado en las puntas de hojas y el crecimiento de hifas endofíticas de *B. bassiana* se debe detectar en la base de la hoja no tratada después de 7 días. Se observó crecimiento de hifas en secciones transversales de rasgaduras medias de hoja. En cada caso se investigaron cinco secciones transversales por planta. La penetración de las hojas se calculó en base a estas secciones transversales. Además, la sección transversal de la rasgadura media se consideró como penetrada, cuando se encontró una hifa. La penetración media de un tratamiento fue calculada por diez plantas tratadas. Se detectó crecimiento de hifas en un 4 % de las secciones transversales de rasgadura media de las hojas que no se tratan con esporas fúngicas y en un 6 % de las secciones transversales de rasgadura media de las hojas tratadas con la suspensión de esporas en agua. Además, también se detectó microscópicamente crecimiento de hifas endofíticas en un 46 % de las áreas no tratadas de las hojas tratadas con todos los componentes de la formulación después de 7 días. Una incubación a una humedad relativa de un 95 % dio lugar a un incremento adicional de hojas de tomate penetradas al 54 %.

Tabla 3

N.º	Tensioactivo	Nutriente	Compuesto protector UV	Esporas	Humedad relativa
1				10 <sup>6</sup> esporas/ml	55 %
2	Triton X-114 (0,1 %)	melaza de remolacha azucarera (1 %)	dióxido de titanio (1 %)		55 %
3	Triton X-114 (0,1 %)	melaza de remolacha azucarera (1 %)	dióxido de titanio (1 %)	10 <sup>6</sup> esporas/ml	95%
4	Triton X-114 (0,1 %)	melaza de remolacha azucarera (1 %)	dióxido de titanio (1 %)	10 <sup>6</sup> esporas/ml	55 %

30 En comparación con el tratamiento de agua, el uso de protectores UV podría incrementar la viabilidad de esporas tratadas después de radiación UV durante 60 minutos en un 79-92 %, además de germinaciones y crecimiento de los endófitos en hojas, la penetración y colonización así como la eficacia en bioensayos con *Plutella xylostella* como plaga de cultivo demuestra la utilidad de la formulación de pulverización de acuerdo con la presente invención.

35

**REIVINDICACIONES**

1. Una formulación de pulverización para la colonización de plantas con esporas de endófitos que comprende:
  - 5 - un tensioactivo en un intervalo de desde un 0,01 a un 5 % en peso en base al peso total de la formulación de pulverización;
  - un compuesto protector UV en un intervalo de desde un 0,05 a un 7 % en peso en base al peso total de la formulación de pulverización;
  - 10 - un nutriente en un intervalo de desde un 0,1 a un 7 % en peso en base al peso total de la formulación de pulverización en la que el nutriente se selecciona de fuentes de carbono, glúcidos o extracto de levadura;
  - esporas de los endófitos en una cantidad de  $10^2$  a  $10^8$  esporas/ml de formulación de pulverización; y,
  - 15 - opcionalmente, líquido hidrófilo.
2. El uso de una formulación de pulverización de acuerdo con la reivindicación 1 para la colonización de plantas de cultivo o plantas ornamentales incluyendo colza, tomate, maíz (*Zea mays*), grano, algodón, patata, remolacha azucarera, plantas de café, vid, habas, garbanzo, tabaco, soja, plantas de cacao, adormidera, frijol, repollo, pino, arroz, palmera datilera, plátano, orquídeas o sorgo, con esporas de endófitos.
3. La formulación de acuerdo con la reivindicación 1, en la que las esporas de dichos endófitos son esporas fúngicas.
- 25 4. La formulación de pulverización de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3, en la que los endófitos son endófitos entomopatógenos que se seleccionan de los hongos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*.
- 30 5. La formulación de pulverización de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 y 4 que comprende además un agente adhesivo en el intervalo de desde un 0,1 % a un 5 % en peso en base al peso total de la formulación de pulverización.
- 35 6. La formulación de pulverización de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3-5 que comprende además al menos uno de los siguientes componentes de un humectante en el intervalo de desde un 0,1 a un 5 % en peso en base al peso total de la formulación de pulverización, un relleno en el intervalo de desde un 15 a un 45 % en peso en base al peso total de la formulación de pulverización, un estimulante en el intervalo de desde un 0,01 a un 1 % en peso en base al peso total de la formulación de pulverización, un antiespumante en el intervalo de desde un 0,01 a un 1 % en peso en base al peso total de la formulación de pulverización, y/o un espesante en el intervalo de desde un 0,1 a un 3 % en peso en base al peso total de la formulación de pulverización.
- 40 7. La formulación de pulverización de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3-6 en la que el tensioactivo es un tensioactivo no iónico.
- 45 8. La formulación de pulverización de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3-7 en la que el humectante se selecciona de biopolímeros.
- 50 9. La formulación de pulverización de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3-8, en la que la formulación de pulverización está adaptada para su aplicación como una emulsión, un concentrado o un polvo humectable.
- 55 10. El uso de una formulación de pulverización de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en la protección de plantas contra fitopatógenos y plagas de plantas.
11. Un procedimiento de prevención o tratamiento de infestación de plantas con fitopatógenos y plagas de plantas y patógenos, incluyendo la etapa de aplicar una formulación de pulverización de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3-8 a plantas para la colonización de dichas plantas con endófitos.
- 60 12. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 11, en el que las plantas son de colza.
13. El procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 11 o 12, en el que el endófito es aislado de *Beauveria bassiana* depositado bajo el n.º DSM 24665.

**14.** Un kit que comprende esporas de endófitos y, en un recipiente separado, una formulación de pulverización como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3-9 sin contener dichas esporas de dichos endófitos

5 en el que las esporas están en forma liofilizada o forma seca y la formulación de pulverización restante está en forma de un concentrado, liofilizado o formulación lista para su uso.

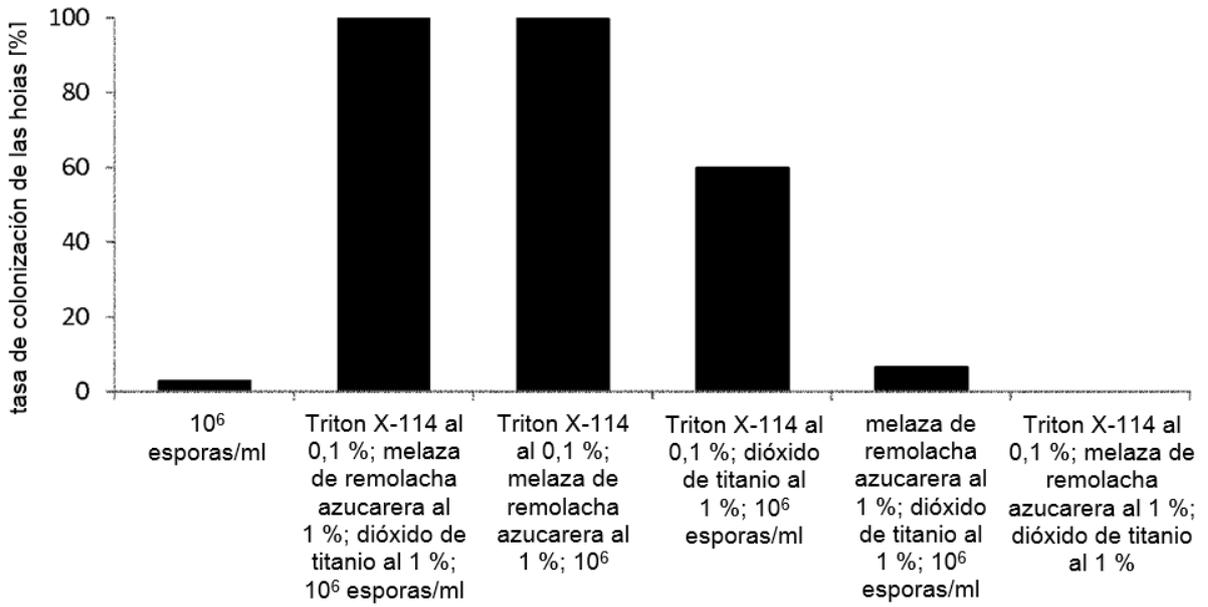


Figura 1

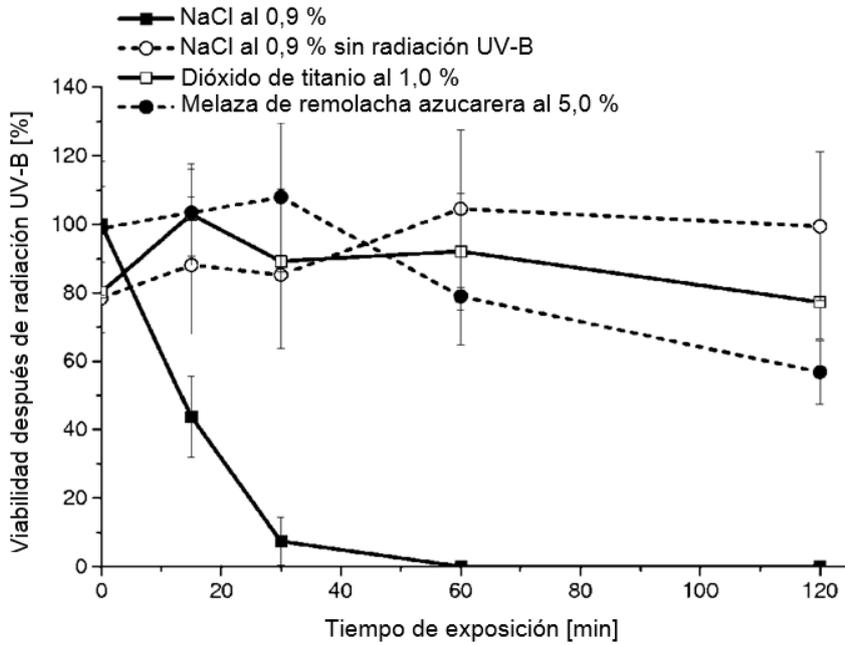
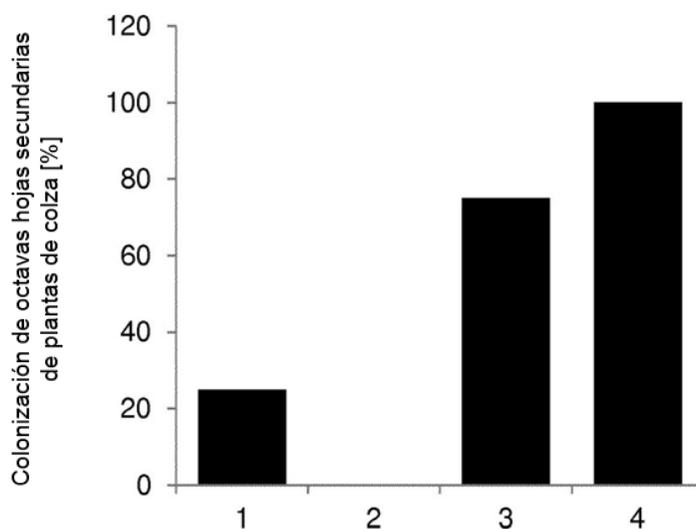
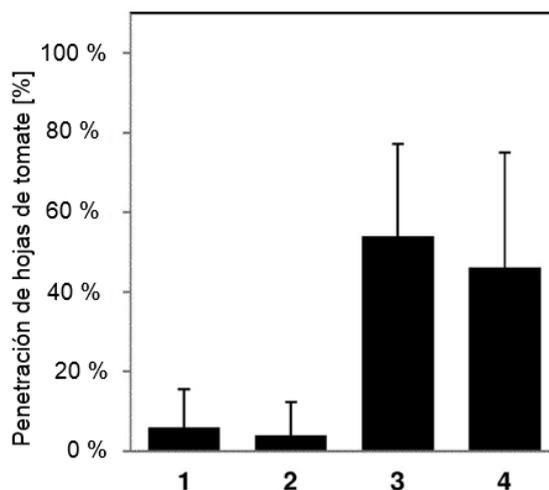


Figura 2



- 1:  $10^6$  esporas/ml
- 2: Triton X-114 al 0,1 %, melaza de remolacha azucarera al 1 %, dióxido de titanio al 1 % (*control*)
- 3: Triton X-114 al 0,1 %, dióxido de titanio al 1 %,  $10^6$  esporas/ml
- 4: Triton X-114 al 0,1 %, melaza de remolacha azucarera al 1 %, dióxido de titanio al 1 %,  $10^6$  esporas/ml

Figura 3



- 1:  $10^6$  esporas/ml
- 2: Triton X-114 al 0,1 %, melaza de remolacha azucarera al 1 %, dióxido de titanio al 1 % (*control*)
- 3: Triton X-114 al 0,1 %, melaza de remolacha azucarera al 1 %, dióxido de titanio al 1 %,  $10^6$  esporas/ml (humedad relativa = 95 %)
- 4: Triton X-114 al 0,1 %, melaza de remolacha azucarera al 1 %, dióxido de titanio al 1 %,  $10^6$  esporas/ml (humedad relativa = 55 %)

Figura 4