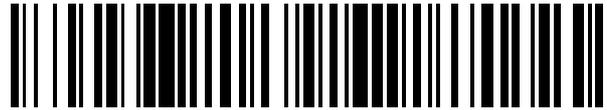


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 875 248**

21 Número de solicitud: 202030389

51 Int. Cl.:

A01N 63/14 (2010.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

04.05.2020

43 Fecha de publicación de la solicitud:

08.11.2021

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDADE DA CORUÑA (100.0%)
OTRI- EDIFICIO DE SERVICIOS CENTRALES DE
INVESTIGACIÓN, CAMPUS DE ELVIÑA, S/N
15071 A CORUÑA (A Coruña) ES**

72 Inventor/es:

**FAGÚNDEZ DÍAZ, Jaime y
SERVIA GARCÍA, María José**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones:

La lista de secuencias está accesible al público en la página web de la OEPM para su descarga en formato electrónico.

54 Título: **USO DE SPANOLEPIS SELLOANAE COMO AGENTE DE CONTROL BIOLÓGICO DE LA PLANTA INVASORA CORTADERIA SELLOANA**

57 Resumen:

Uso de *Spanolepis selloanae* como agente de control biológico de la planta invasora *Cortaderia selloana*. La presente invención se refiere al uso de una nueva especie de díptero identificada y nombrada como *Spanolepis selloanae* como agente de control biológico frente a la planta exótica invasora *Cortaderia selloana*. Adicionalmente, la presente invención describe composiciones que comprenden dicho díptero y/o larvas del mismo, así como sus usos en métodos de control y erradicación de dicha planta invasora. Adicionalmente, la invención también se refiere a los métodos de conservación del agente de control.

ES 2 875 248 A1

DESCRIPCIÓN

Uso de *Spanolepis selloanae* como agente de control biológico de la planta invasora
Cortaderia selloana

5

CAMPO TÉCNICO

La presente invención se refiere al uso de una nueva especie de díptero identificada y nombrada como *Spanolepis selloanae* como agente de control biológico para el control de la planta exótica invasora *Cortaderia selloana*. Adicionalmente, la presente invención describe composiciones que comprenden dicho díptero, así como sus usos en métodos de control y erradicación de la planta invasora. La presente invención también se refiere a los métodos de conservación del agente de control. Por lo tanto, la presente invención se engloba dentro del campo técnico del sector medioambiental, y más concretamente del sector destinado al control del crecimiento de especies vegetales invasoras mediante el uso de agentes de control biológico.

10
15

ESTADO DE LA TÉCNICA

Las especies exóticas invasoras representan uno de los principales problemas ambientales a nivel global. Estas especies se encuentran naturalizadas en áreas geográficas diferentes a su distribución nativa. Se caracterizan por presentar un comportamiento agresivo y afectar negativamente a las comunidades y especies nativas, o bien tienen un impacto negativo de tipo ambiental, económico, social o de salud pública.

20
25

La especie *Cortaderia selloana* es una de las principales plantas invasoras en el sur de Europa, ampliamente extendida y con una fuerte presión sobre los hábitats en los que se instala. *C. selloana* coloniza áreas alteradas por el uso humano como márgenes de carreteras y solares. A partir de estas áreas, la especie invade hábitats naturales sensibles como las marismas costeras. Esta especie está incluida en el “Catálogo español de especies exóticas invasoras” (Real Decreto 630/2013, de 2 de agosto).

30

La invasión de la especie *C. selloana* es creciente y genera una gran alarma social, por su alto impacto socio-económico, sanitario y ambiental. Los métodos actuales para el control del crecimiento y expansión de dicha especie se basan principalmente en métodos

35

mecánicos y/o químicos, dirigidos sobre las plantas adultas, pero no se conocen métodos de control que limiten la reproducción sexual que culmina con la producción de semillas, la estrategia principal que utiliza dicha especie para su propagación.

- 5 El control mecánico consiste en el desbroce o la corta total o parcial (inflorescencias) de las plantas de forma individual. Requiere uso de maquinaria pesada, y para que sea efectivo es necesario retirar también la base del tallo, por lo que implica la movilización de una gran cantidad de suelo. Además, dicho método de control debe ser repetido durante un periodo de varios años hasta conseguir la desaparición de los cepellones de la planta.
- 10 En el caso del corte de las inflorescencias, es importante que sean cortadas antes de la polinización y la maduración de las semillas (generalmente a partir de septiembre), colocándolas en una bolsa bien cerrada para evitar la dispersión. El control químico consiste en la aplicación de herbicidas sistémicos, tales como, por ejemplo, el glifosato, de forma individualizada y requiriendo además varias aplicaciones para que surta efecto. Este
- 15 método está limitado por diferentes normativas medioambientales al ser el glifosato un compuesto tóxico, y de hecho no se permite su uso en áreas sensibles, sumado todo esto al elevado coste del producto. En los últimos años también se ha utilizado el agente de control selectivo para monocotiledóneas quizalofop, pero sus resultados han sido muy pobres y no impidieron el rebrote de la planta después de su aplicación. En resumen, los
- 20 métodos actuales utilizados para el control de la especie invasora *C. selloana* son poco efectivos y altamente costosos.

El control biológico se presenta como una alternativa eficaz y libre de riesgo frente a los numerosos y crecientes problemas derivados del uso de los productos químicos biocidas.

- 25 El control biológico se lleva a cabo mediante enemigos naturales de las especies invasoras, tales como, por ejemplo, predadores, herbívoros o parásitos. En el control de plantas invasoras, los insectos son con frecuencia los agentes más efectivos. Así, los insectos que reducen la producción de semillas son especialmente efectivos en plantas en las que la reproducción sexual es la forma principal de reproducción.

30

Debido a la compleja biología de los agentes de control biológico, el éxito de su utilización no está asegurado si no va precedido de estudios detallados y rigurosos sobre las interrelaciones que se establecen entre ellos, sobre su especificidad y sobre las características ambientales y biológicas que rigen sus ciclos de vida. Es conocido que

35 algunos insectos, como por ejemplo la mayoría de las moscas formadoras de agallas

(dípteros pertenecientes a la familia Cecidomyiidae), son altamente específicos y selectivos (atacan a una sola especie de planta hospedadora), siendo por tanto candidatos adecuados para el control biológico al no afectar su uso a especies vegetales nativas. *Dasineura dielsi* Rübtsaamen y *Dasineura rubiformis* Kolesik son dos ejemplos de dípteros cecidómidos que atacan las semillas de dos especies invasoras de Acacias (*Mimosiidae*) (Adair, R.J. Australian Journal of Entomology. 2005; 44:446-456; Impson FA, et al. De Wild, in South Africa. South African J Bot. 2013; 87:118-121, Post JA, et al. Biol Control. 2010; 53:68-75). Ambas especies tienen un ciclo vital sincronizado con la fenología de la planta hospedadora, y depositan la puesta en las flores de la planta inmediatamente antes de la antesis. Estos insectos han demostrado que el uso de agentes de control biológico en el manejo de las especies invasoras es el método más efectivo, selectivo y con menor coste económico y ambiental.

En este sentido, para el caso concreto de la especie invasora *C. selloana* no se conocen depredadores naturales ni parásitos que puedan ser utilizados para su control biológico. Por tanto, existe en el estado de la técnica la necesidad de buscar métodos alternativos a los conocidos para el control de la especie invasora *C. selloana*, mucho más efectivos, selectivos y económicos que los actuales, capaces de controlar el crecimiento y la expansión de dicha especie invasora.

20

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención describe el uso de una nueva especie de díptero (moscas y mosquitos) no conocida hasta ahora, que se ha incluido dentro de la familia Cecidomyiidae, y se le ha dado el nombre de *Spanolepis selloanae*, como agente de control biológico frente a la especie invasora *C. selloana*.

25

Así, en un primer aspecto, la presente invención se refiere al uso del díptero *S. selloanae*, así como a las larvas del mismo, como agente de control biológico frente a la especie exótica invasora *C. selloana*.

30

La familia de los cecidómidos pertenece al orden de los dípteros (Insecta: Diptera: Cecidomyiidae). En su fase adulta estas moscas presentan cuerpos pequeños y delicados y también largas antenas con ornamentación y estructura muy diversas. Las larvas, en la mayor parte de las especies, son parásitas de plantas vasculares, y es frecuente que la

35

relación entre planta y parásito sea exclusiva o altamente específica, ya que la estructura atacada en la planta, el modo de alimentación de la larva o la forma de dispersión de esta fase obligan a dicha especificidad en la relación.

5 En la actualidad se conocen algunos cecidómidos parásitos de especies de gramíneas cuyas inflorescencias son similares a las de *C. selloana* (Ahee JE, et al. Can Entomologist. 2013; 145:235-246). Sin embargo, las características del parásito objeto de la presente invención, *S. selloanae*, son distintas a las de las especies hasta ahora conocidas, y no se ha descrito hasta ahora la existencia de ningún parásito cecidómido de *C. selloana*.

10

Spanolepis selloanae

El agente de control *S. selloanae* de la presente invención se caracteriza por consumir las estructuras reproductivas de las inflorescencias de *C. selloana*. Las hembras del agente de control depositan los huevos dentro de las glumas que rodean las estructuras reproductivas y, tras la eclosión, las larvas se alimentan del ovario, impidiendo así la formación de semillas viables. Mediante el estudio en detalle del parásito los inventores han concluido que se trata de un nuevo género y especie, no descrito con anterioridad. Así, se ha propuesto el nombre de *Spanolepis selloanae* Gagné para la nueva especie (Fagúndez J., Gagné R.J., & Vila M., Phytoparasitica, 2020).

20

Al tratarse, *S. selloanae* de una nueva especie identificada por primera vez por los inventores, se ha procedido a su caracterización morfológica y genética. Esta especie se caracteriza, por un lado, por la asociación específica a la planta hospedadora *C. selloana*, y, por otro lado, por los caracteres de diagnósticos que se detallan a continuación.

25

Spanolepis selloanae presenta un ciclo vital ligado a la fenología de la especie hospedadora, en este caso ligado a la fenología de *C. selloana*. Los adultos emergen a partir de las larvas, más concretamente, a partir de las larvas de tercer estadio hibernantes coincidiendo con la floración de *C. selloana*, visitan las inflorescencias de la planta y ovopositan en las flores en desarrollo. Las larvas eclosionan y, durante su crecimiento y consiguiente paso sucesivo de primer a tercer estadio, destruyen el ovario, ocupando el espacio en las flores femeninas. Las larvas pupan al menos una vez durante la floración, formando la segunda y, potencialmente, sucesivas generaciones de adultos que copulan y generan nuevas puestas. En el momento de la dispersión de *C. selloana*, se liberan flores

35

completas con el fruto en el interior. Cuando estas flores están infectadas con el agente de control de la invención, se dispersan, las larvas del agente de control presentes en las mismas hibernan en el suelo y su ciclo vital vuelve a activarse al verano siguiente.

5 Los individuos adultos de *S. selloanae* miden entre 2-3 mm y presentan un aspecto delicado y un color anaranjado (**Fig. 1a**), con unas alas de un tamaño aproximado de entre 1,4-1,5 mm. Las antenas de los adultos presentan en su segmento basal (escapo) con 3-4 sedas en su parte ventral, y en el segundo segmento (pedicelo) presentan 7-9 sedas, más cortas que las del escapo. Los restantes segmentos de la antena (flagelómeros) alcanzan
 10 un número total de 12 en el caso de los machos, mientras que en las hembras ese número puede ser de 10-11 segmentos. Además, estos flagelómeros son distintos en machos y hembras, ya que en los machos los segmentos presentan una parte basal redondeada y una distal más alargada, mientras que en las hembras carecen de esta parte alargada. En cuanto a otros caracteres distintivos de los adultos, esta especie presenta en la frente 10-
 15 12 sedas, y tanto los escleritos torácicos como los abdominales carecen de las escamas distintivas de géneros próximos.

Respecto a los diferentes estadios larvarios de *S. selloanae*, todos ellos son inmóviles, presentando un tamaño de entre 0,8-1,2 mm con aspecto cilíndrico-elipsoidal, color
 20 anaranjado y cápsula cefálica semiesférica (**Fig. 1b**). En el tercer estadio larvario, que precede a los individuos adultos, las antenas son el doble de largas que anchas, y todo el tegumento es blanco a excepción del último segmento, que es oscuro. El tegumento está recubierto por protuberancias verrucosas a excepción de una larga banda estrecha que recorre el cuerpo de la larva desde las 4 papilas ventrales del primer segmento abdominal
 25 hasta el séptimo segmento abdominal. Otro carácter diagnóstico importante es la ausencia de espátula, que es una estructura esclerotizada presente en especies que pupan en el suelo, donde la usan para excavar, o que se alimentan de tejidos duros de plantas. Además, a diferencia de otros géneros próximos, las larvas de *S. selloanae* presentan un
 30 único triplete de setas laterales en lugar de dos en cada lado de los segmentos torácicos y cuatro en lugar de ocho papilas en el segmento terminal.

En cuanto a la identificación genética de *S. selloanae* se ha tomado como referencia la secuencia del gen *citocromo mitocondrial c oxidasa subunidad I* (COI), del genoma mitocondrial de la especie de cecidómido *Mayetiola destructor*, identificado con el número
 35 de acceso en GenBank: GQ387648.1:1145-2680, y concretamente se han utilizado las

posiciones 1176 a 1874 de dicho gen. Los resultados obtenidos para la identificación genética del agente de control de la presente invención se muestran en el Ejemplo 1. Brevemente, el agente de control de la presente invención, *S. selloanae* presenta dos haplotipos. Ambos haplotipos difieren entre ellos en la sustitución de la posición 327 de la

5 secuencia obtenida del gen COI de *Mayetiola destructor* (número de acceso en GenBank: GQ387648.1: posiciones 1176-1874; Beckenbach y Joy, 2009, Genome Biol Evol 2009: 278-287), y se trata de una transición guanina-adenina en el comienzo de un codón (G/A)AC. El haplotipo 1 (SEQ ID NO: 1) presenta el codón (GAC) que codifica para glicina y el haplotipo 2 (SEQ ID NO: 2) presenta el codón (AAC) que codifica para ácido glutámico.

10

Los haplotipos 1 y 2 (SEQ ID NO: 1 y 2, respectivamente) identificados para el agente de control de la invención se diferencian de las especies más próximas identificadas, *Macrolabis fagicola* (número de acceso en GenBank: JQ684878.1) y *Janetiella glechomae* (número de acceso en GenBank: KR742308.1 utilizado para el haplotipo 1 y los números

15 de acceso: KR740388, KR743364 y KR956680 utilizados para el haplotipo 2) en los siguientes valores:

20

- *Macrolabis fagicola* (número de acceso en GenBank: JQ684878.1): muestra un 90,29% de identidad frente al haplotipo 1 (SEQ ID NO: 1) de *S. selloanae*, y un 90,27% de identidad frente al haplotipo 2 (SEQ ID NO: 2), y
- *Janetiella glechomae* (número de acceso en GenBank: KR742308.1 utilizado para el haplotipo 1 y los números de acceso: KR740388, KR743364 y KR956680 utilizados para el haplotipo 2): muestra un 90,43% de identidad frente al haplotipo 1 (SEQ ID NO: 1) de *S. selloanae*, y un 90,6% de identidad frente al haplotipo 2 (SEQ ID NO: 2) de *S. selloanae*.

25

Una vez caracterizados, morfológica y genéticamente los agentes de control descritos en la presente invención, se incluye también una descripción de cómo *S. selloanae* infecta a la planta huésped *C. selloana*, pudiendo por tanto ser utilizado como agente de control biológico frente a la misma. En este sentido, los adultos copulan y depositan los huevos en

30 las inflorescencias femeninas de *C. selloana* a finales de agosto o principios de septiembre. Una vez las larvas eclosionan, éstas comienzan a alimentarse de los tejidos del ovario durante 1-2 semanas hasta que pupan y se transforman en una nueva generación de adultos, que nuevamente vuelven a depositar huevos de nuevo sobre las inflorescencias a finales de septiembre. Así, las larvas durante su ciclo vital consumen los ovarios de las

35 flores impidiendo la formación de frutos viables y llegado el mes de noviembre, que es la

época en la que se produce la dispersión de las semillas, el lugar que debían ocupar dichas semillas lo ocupan las larvas que hibernarán en esa fase.

5 Los ensayos llevados a cabo por los inventores y que se muestran en los ejemplos incluidos en la presente invención, han puesto de manifiesto una tasa de infección cercana al 75% (una semilla viable por cada 3 consumidas por las larvas).

10 Así, tal y como hemos mencionado anteriormente, en un primer aspecto, la presente invención se refiere al uso del agente de control de la invención, en este caso particular al uso del díptero perteneciente a la especie *S. selloanae* y/o de sus larvas, como agente de control biológico frente a la especie vegetal *C. selloana*.

15 A efectos de la presente invención, el término “agente de control biológico” se refiere a individuos adultos y/o larvas de la especie *S. selloanae*, solos o formulados en forma de composición capaces de producir un daño directo en plantas de la especie *C. selloana*, impidiendo su reproducción y limitando su expansión.

20 A efectos de la presente invención el término “larva” se refiere a individuos juveniles y carentes de estructuras alares de la especie *S. selloanae*, lo que excluye a las fases de pupa y adulto.

25 A efectos de la presente invención, el término “*Cortaderia selloana*”, se refiere a una especie vegetal que se caracteriza por pertenecer a la familia de las Poaceas o gramíneas siendo ésta una familia de plantas herbáceas, o muy raramente leñosas, perteneciente al orden Poales de las monocotiledóneas. La especie *C. selloana*, también conocida como hierba de la Pampa, es una especie nativa de Sudamérica, de la región pampeana y la Patagonia. Posee más denominaciones comunes, entre ellas plumero, plumacho, plumerillo, cola de zorro, carrizo de la Pampa, paja penacho, paina, cortaderia, ginerio, gimnerio o paja brava. Crece en densas macollas, pudiendo alcanzar 3 m de altura; hojas
30 perennes, largas y finas, 1-2 m de largo y 1 cm ancho, con bordes muy afilados (debiéndosela manipular con cuidado), color verde azulinas, pero pueden llegar a gris plateadas. Flores en densa panícula blanca, o en ocasiones rosada, de 3–9 dm de largo y 2–3 m de altura sus varas florales; sus espiguillas de 15-25 mm, c/una con 4-6 flores. Flores masculinas con 3-estambres, ovario rudimentario; femeninas con un ovario desarrollado y

dos estilos plumosos. Florece a fines del verano, el pico de floración se produce en septiembre. Es de hábito hemicriptófito.

5 El agente de control biológico de la presente invención tiene su origen en España, particularmente en la Comunidad autónoma de Galicia. Dado que el agente de control de la invención se trata de un recurso genético, tal y como se entiende y se encuentra cubierto por el Reglamento (UE) n.º 511/2014 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de abril de 2014, relativo a las medidas de cumplimiento de los usuarios del Protocolo de Nagoya sobre el acceso a los recursos genéticos y participación justa y equitativa en los beneficios
10 que se deriven de su utilización en la Unión, los inventores han llevado a cabo la declaración de diligencia debida de conformidad con el Art. 14.3 del Real Decreto 124/2017 de 24 de febrero relativo al acceso a los recursos genéticos procedentes de taxones silvestres y al control de la utilización, así como de conformidad con el Art. 23 de la Ley 24/2015, de 24 de julio, de Patentes y con el Art. 2 de su Reglamento de ejecución. Para
15 que conste en el presente documento, el número de registro de la presentación de la declaración de diligencia debida asociada al agente de control de la presente invención es: O00002023e2000006746.

Método de conservación del agente de control de la invención

20 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método de conservación del agente de control de la invención, de aquí en adelante, método de conservación de la invención.

Hasta la fecha de la presente invención no se conocía nada sobre la biología ni sobre el
25 ciclo de vida de *S. selloanae*. Es bien conocido en el ámbito de la entomología que los requerimientos tróficos, estímulos de oviposición, condiciones climáticas de supervivencia, condiciones óptimas de fertilidad y fecundidad, y otras características biológicas, son distintos en cada especie de insecto y, por lo tanto, es necesario determinar todas estas características para que el agente de control de la invención pueda ser aplicado con éxito
30 frente a la especie invasora *C. selloana*.

Los inventores describen en la presente invención un método de conservación del agente de control de la invención para que pueda ser utilizado a escala industrial y que permita la obtención de gran cantidad de individuos para utilizarlos como agentes de control biológico
35 frente a *C. selloana*.

Así, en otro aspecto, la presente invención se refiere a un método de conservación del agente de control de la presente invención, preferiblemente larvas del agente de control, que comprende las etapas de:

5

- a. recolectar las larvas de *S. selloanae* de las inflorescencias de las plantas femeninas de *C. selloana*,
 - b. introducir las larvas recolectadas en la etapa a) en un sustrato que comprende tierra vegetal, un ingrediente adicional que facilite la aireación, preferiblemente, arena fina, y un ingrediente adicional que permita la retención de agua, preferiblemente
- 10 seleccionado de entre perlita y vermiculita, donde dicho sustrato ha sido previamente esterilizado,
- c. almacenar las larvas junto con el sustrato, en condiciones de oscuridad y a una temperatura de entre 2 °C a 7°C, preferiblemente de 4°C a 5°C.

15

En una realización preferida, el método de conservación de la invención se caracteriza por que la recolección se lleva a cabo en el periodo de tiempo que se produce la dispersión de las plantas y en ese momento se recogen las larvas vivas de las inflorescencias, preferiblemente larvas vivas que se encuentran en el tercer estadio de su ciclo vital. En una

20 realización más preferida, el periodo de recogida de las larvas se lleva a cabo preferiblemente entre los meses de octubre a noviembre.

En una realización preferida del método de recolección de la invención, dicha recolección se lleva a cabo sin alterar el propágulo infectado de la planta y manteniendo la cubierta

25 protectora, es decir el lema o glumela inferior, permitiendo así utilizar la cubierta del propágulo como elemento protector frente a posibles agentes externos, ya sean físicos y/o biológicos, que puedan afectar a la(s) larva(s) que tiene(n) en su interior. En una realización más preferida aún, dicha recolección se lleva a cabo cortando las partes de la inflorescencia infectadas e introduciéndola en un recipiente que garantice la transpiración, por ejemplo,

30 un recipiente tal como un sobre de papel.

A efectos de la presente invención, el término “propágulo” se refiere al conjunto formado por el fruto y la cubierta protectora. El fruto es una cariósida, esto se refiere a que es un fruto formado por una única semilla con una pared delgada. La cubierta está formada por

35 dos brácteas: la glumela inferior o lema, y la glumela superior o pálea. El lema es de gran

tamaño y envuelve todo el conjunto, la pálea es muy reducida y no tiene un papel relevante. El lema además tiene largos cilios que favorecen la dispersión por el viento.

5 A efectos de la presente invención, el término “propágulo infectado” se refiere al propágulo de la planta invasora, concretamente al propágulo de *C. selloana* que contiene una larva del cecidómido que ocupa el lugar y sustituye a la cariósida.

10 En otra realización preferida del método de conservación de la invención, éste se caracteriza porque en la etapa b) el sustrato utilizado comprende tierra vegetal, un ingrediente adicional que facilite la aireación, donde dicho ingrediente es preferiblemente un ingrediente no poroso, inerte químicamente y con dimensiones de sus partículas inferiores a 5 mm, y otro ingrediente adicional que permita la retención de agua, donde dicho ingrediente es preferiblemente un ingrediente poroso. En otra realización más preferida, el sustrato se caracteriza porque el ingrediente no poroso, inerte químicamente
15 y con dimensiones de sus partículas inferiores a 5 mm es preferiblemente, arena fina. En otra realización más preferida, el sustrato se caracteriza porque el ingrediente poroso, se selecciona de entre perlita y/o vermiculita.

20 A efectos de la presente invención el término “sustrato” se refiere a la mezcla artificial de elementos o ingredientes, libres de patógenos, que imitan las condiciones del suelo y que permite la hibernación de las larvas de *S. selloanae*.

25 A efectos de la presente invención el término “arena fina” se refiere a un conjunto de partículas que es resultado de la desintegración natural de las rocas o de la trituración de las mismas, los granos obtenidos tienen dimensiones inferiores a los 5 milímetros. A efectos de la presente invención, se entiende también que la arena fina es un ingrediente no poroso e inerte químicamente.

30 A efectos de la presente invención el término “tierra vegetal” se refiere a un sustrato natural formado por restos vegetales en diferentes grados de descomposición y tamaño heterogéneo, procedente del suelo turboso o altamente orgánico generado en condiciones naturales con cubierta vegetal, que contiene alrededor de un 60%-80% de materia orgánica y un 20-40% de compuestos minerales.

A efectos de la presente invención el término “perlita” se refiere a partículas granulares resultantes de la fusión de rocas volcánicas silíceas a temperaturas cercanas a los 1000°C, con dimensiones inferiores a los 6 milímetros. A efectos de la presente invención, la perlita se define también como un ingrediente poroso.

5

A efectos de la presente invención el término “vermiculita” se refiere a partículas granulares resultantes del calentamiento a temperaturas superiores a 870°C de un mineral de la familia de la mica compuesto por silicatos de hierro o magnesio, con dimensiones inferiores a los 5 milímetros. A efectos de la presente invención, la vermiculita se define también como un

10

En otra realización preferida del método de conservación de la invención, este se caracteriza por que el sustrato comprende al menos un 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49% o 50% de arena fina, preferiblemente al menos un 35%, más preferiblemente al menos un 40% y más preferible aún un 40% de arena fina, respecto al porcentaje total del sustrato. En otra realización preferida del método de conservación de la invención, este se caracteriza por que el sustrato comprende al menos un 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49% o 50% de tierra vegetal, preferiblemente al menos un 35%, más preferiblemente al menos un 40% y más preferible aún un 40% de tierra vegetal, respecto al porcentaje total del sustrato. En otra realización preferida del método de conservación de la invención, este se caracteriza por que el sustrato comprende al menos un 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29% o 30% de perlita, preferiblemente al menos un 15%, más preferiblemente aún al menos un 20% y más preferible aún un 20% de perlita y/o vermiculita, respecto al porcentaje total del sustrato.

15

20

25

En otra realización preferida del método de conservación de la invención, este se caracteriza por que el sustrato comprende un 40% de arena fina, un 40% de tierra vegetal y un 20% de perlita y/o vermiculita.

30

En otra realización preferida del método de conservación de la invención, este se caracteriza por que el sustrato presenta un grado de humedad de al menos un 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49% o 50%, preferiblemente un grado de humedad de al menos un 35%, más

35

preferiblemente un grado de humedad de al menos un 40% y más preferible aún un grado de humedad de un 40%. En otra realización preferida, el método de conservación de la invención se caracteriza por que el sustrato presenta un grado de humedad del 40%.

- 5 Tal y como se ha mencionado anteriormente, el sustrato previamente a ponerlo en contacto con las larvas vivas recolectadas ha sido sometido a un proceso de esterilización. De manera general, el proceso de esterilización comprende el autoclavado de cada uno de los componentes de dicho sustrato a una temperatura de al menos 121°C durante al menos un tiempo de 20 minutos, a una presión de al menos 1 atmósfera. La esterilización de los
- 10 componentes del sustrato hace que se inactiven las posibles semillas que puedan estar en la mezcla de los componentes que forman dicho sustrato y se limita el crecimiento de microorganismos que puedan afectar a la conservación de las larvas.

En otra realización preferida del método de conservación de la invención, este se

15 caracteriza por que la etapa b) se lleva a cabo en condiciones controladas que mantienen el aire libre de partículas en suspensión, preferentemente en una campana de flujo laminar, para reducir cualquier tipo de contaminación que pudiese darse por agentes externos tales como hongos u otros organismos.

- 20 En otra realización preferida del método de conservación de la invención, éste se caracteriza por que en la etapa b) se introducen al menos 5 larvas de *S. selloanae*/g de sustrato, preferiblemente de 5 a 8 larvas/g de sustrato.

En otra realización preferida del método de conservación de la invención, éste se

25 caracteriza por que una vez contactadas las larvas con el sustrato en la etapa b), éstas se guardan en recipientes estériles, preferiblemente placas Petri, de un diámetro preferido de 5,5 cm y se sellan, preferiblemente con parafilm, para evitar su contaminación. En otra realización preferida del método de conservación de la invención, el recipiente de almacenamiento, comprende al menos 4 gramos de sustrato con las larvas.

30

En otra realización preferida del método de conservación de la invención, éste se caracteriza por que se almacena, en oscuridad y a una temperatura de entre 2°C a 10°C, preferiblemente de 2°C a 8°C, más preferiblemente de 3°C a 6°C, más preferiblemente aún de 4°C a 5°C. La elección de la temperatura preferida de conservación de entre 4 a 5°C es

debida a que se pretende reproducir las condiciones que se dan en la fase de diapausa o letargo invernal que sufren las larvas en el medio natural.

5 En otra realización particular del método de conservación de la invención, éste se caracteriza porque las larvas se mantienen almacenadas en las condiciones indicadas en la etapa c) durante al menos un periodo de 9 meses.

10 Cualquier valor en un intervalo dado aquí se puede extender o alterar sin perder los efectos buscados, como sería aparente para una persona experta en la materia. Así, los intervalos dados, tales como concentraciones, y similares se deberían considerar aproximados, a menos que se especifique lo contrario.

15 Siguiendo el método de conservación de las larvas del agente de control de la presente invención, los inventores han obtenido una viabilidad de las mismas del 100% en las condiciones mostradas en los ejemplos (véase Tabla 1).

Composición y usos

20 Otro aspecto de la presente invención se refiere a una composición, a partir de ahora composición de la invención, que comprende al menos un agente de control según se describe en la presente invención, preferiblemente estando dicho agente de control en el estadio de larva, en combinación con un sustrato que comprende tierra vegetal, un elemento que permita la aireación, tal como por ejemplo, arena fina, y un elemento con
25 capacidad para retener la humedad, tal como por ejemplo, perlita y/o vermiculita, como se han descrito previamente a lo largo del presente documento.

30 A efectos de la presente invención el término "composición" se refiere a una composición para eliminar plantas o especies vegetales indeseadas, o bien para controlar el desarrollo de las mismas. A efectos de la presente invención, dicha composición va dirigida específicamente a controlar el crecimiento y la expansión de plantas de la especie *C. selloana*. En una realización más preferida, la composición de la invención, como se ha mencionado anteriormente, comprende el agente de control de la invención y el sustrato, como se ha definido a lo largo del presente documento.

35

Tanto el agente de control, preferiblemente en el estadio de larva, como el sustrato que forman parte de la composición de la invención se han definido previamente, y dichas definiciones aplican de la misma manera al presente aspecto de la invención.

- 5 En una realización preferida de la composición de la invención, esta se caracteriza porque el agente de control se encuentra en estadio larvario, y a una densidad de al menos 5 larvas por gramo de sustrato.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de la composición de la invención en el control biológico de la especie invasora *C. selloana*.

Método de control biológico *C. selloana* mediante el uso del agente de control *S. selloanae*

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método de control biológico, de aquí en adelante método de control biológico de la invención, de *C. selloana* mediante el uso del agente de control *S. selloanae*, preferiblemente en su estadio larvario, o de la composición de la invención, donde dicho método se caracteriza porque comprende las siguientes etapas:

- 15 a) Contactar plantas de la especie *C. selloana* con una cantidad efectiva de *S. selloanae*, preferiblemente en su estadio larvario, o de la composición de la invención,
- 20 b) Dejar actuar durante el tiempo suficiente para que el agente de control, preferiblemente en estadio larvario, se transforme en individuo adulto para llegar hasta las inflorescencias de las plantas *C. selloana* y proceder a su infección, preferiblemente, dicho tiempo será de al menos 15 días, más preferiblemente, de
- 25 al menos 20 días, y
- c) Opcionalmente repetir los pasos a) y b).

A efectos de la presente invención el término “cantidad efectiva” o “concentración efectiva” se refiere a la cantidad agente de control biológico o de la composición de la invención que se utiliza para llevar a cabo la eliminación efectiva de las semillas de la especie *C. selloana*.

Cualquier valor en un intervalo dado aquí se puede extender o alterar sin perder los efectos buscados, como sería aparente para una persona experta en la materia. Así, los intervalos

datos, tales como concentraciones, y similares se deberían considerar aproximados, a menos que se especifique lo contrario.

5 En una realización preferida del método de control biológico de la presente invención, éste se caracteriza porque en la etapa a) el contacto se produce al menos dos semanas antes de que comience la floración de las plantas de la especie *C. selloana*, más preferiblemente, el contacto se produce al menos una semana antes de que comience la floración.

10 En otra realización preferida del método de control biológico de la presente invención, éste se caracteriza porque las etapas a) y b) se pueden repetir tantas veces como sea necesario hasta que se establezca una población del agente de control *S. selloanae* de la invención, estable, que reduzca o disminuya la producción de semillas de las inflorescencias, y por tanto, la expansión de la planta invasora *C. selloana*. En otra realización más preferida, el agente de control es capaz de reducir al menos un 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%,
15 85%, 90%, 95% o 100%, la producción de semillas de las inflorescencias infectadas de *C. selloana*. En otra realización más preferida, dichas repeticiones de las etapas a) y b) se llevan a cabo durante la misma temporada de floración o en diferentes temporadas de floración.

20 En una realización preferida del método de control biológico de la invención, este se caracteriza por que la composición de la invención, que preferiblemente se encuentra en un recipiente o placa, a partir de aquí se utilizará el término placa para hacer referencia al lugar donde se encuentra la composición de la invención, tal y como se ha detallado previamente en el presente documento, se introduce en un recipiente desechable que se
25 depositará, a temperatura ambiente en el entorno de las plantas a infectar, al menos dos semanas antes de la floración de las plantas, aunque más preferiblemente, al menos una semana antes de la floración de las plantas.

Dicho recipiente desechable, preferiblemente es de cartón, aunque puede utilizarse
30 cualquier material adecuado para el uso requerido. El recipiente desechable preferiblemente presenta unas dimensiones de 120 mm de ancho x 60 mm de alto (**Fig. 2a**). En dicho recipiente desechable se introducen al menos 4 placas (placa Petri o similar donde se haya almacenado la composición de la invención) con la composición de la invención, preferiblemente al menos 2 placas, más preferiblemente al menos 4 placas con
35 la composición de la invención por planta de *C. selloana* que se quiere infectar. Dichos

recipientes desechables que comprenden las placas con la composición de la invención se colocarán a una distancia, entre ellos, de al menos un metro, pudiendo dicha distancia variar dependiendo de la densidad de la población de plantas de *C. selloana* que se quieran infectar. Cualquier experto en la materia sería capaz de determinar cuántas placas serán
5 necesarias y a qué distancia deberían colocarse para que el método de control biológico descrito en la presente invención sea efectivo.

En otra realización preferida del método de control biológico de la invención, éste se caracteriza porque los recipientes desechables con las placas que comprenden la
10 composición de la invención en su interior, se colocan bajo las plantas que se quieren infectar, a una distancia máxima de dicha planta de un metro, o bien dichos recipientes desechables se fijan a un cilindro, o a cualquier otro elemento que tenga cualquier forma, con la condición de que pueda colocarse alrededor de la inflorescencia de la planta, siendo dicho elemento preferiblemente de tela (Ver **Fig. 2 b, c**). Una vez depositados los
15 recipientes desechables con las placas de la composición de la invención en su interior, se procede a su apertura de dichas placas para que los adultos que emerjan de las larvas y puedan acceder a las inflorescencias de las plantas, aparearse, volver a depositar los huevos y que éstos hagan su función tal y como se ha explicado anteriormente en el presente documento.

20 Realizaciones alternativas de los recipientes desechables de la presente invención, en el caso, por ejemplo, de que las condiciones climáticas durante la fase de aplicación del método de control biológico de la invención no lo permitan, comprenden conectar dicho recipiente desechable a un elemento preferiblemente rectangular, más preferiblemente con
25 forma de prisma o rectangular que permita colocarlo alrededor de la inflorescencia de la planta, preferiblemente con un tamaño aproximado de 200 mm de diámetro x 500 mm de alto, aunque el tamaño dependerá del tamaño de la inflorescencia, formado por una estructura de alambre o malla de plástico de aproximadamente 10mm x 10 mm de luz de malla recubierta por un material con luz de malla inferior a 1 mm, preferiblemente un
30 material que no retenga la humedad, más preferiblemente siendo dicho material tela de nylon (**Fig. 2b**). Dicho cilindro o prisma se coloca sobre la inflorescencia femenina que se quiera infectar y, dependiendo de las condiciones del terreno y de la planta, puede además, opcionalmente fijarse al suelo para evitar su caída (**Fig. 2c**).

Para evitar potenciales contaminaciones de cualquier organismo, se recomienda un tratamiento adecuado para los recipientes desechables y placas que comprenden la composición de la invención a los 20 días tras la colocación bajo las plantas. Aunque los recipientes se hayan esterilizado previamente, es posible que los propágulos porten esporas de hongos, por lo que el recipiente desechable con los recipientes de la composición de la invención en su interior, se recomienda ser esterilizado para un mejor aprovechamiento del método de control biológico de la invención.

Tal y como se muestra en el Ejemplo 3 de la presente invención, se consigue una reducción de al menos un 75% de los propágulos de *C. selloana*, lo que repercutirá en una menor expansión de dicha planta invasora, llevándose a cabo un control biológico de la misma mediante el método propuesto en la presente invención.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o etapas. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Aspecto general de un adulto hembra (**a**) y de una larva (**b**) de *S. selloanae*. La barra de escala representa 1mm.

Figura 2. Diseño propuesto para el recipiente de transporte que contienen el agente de control de la invención (**a**). El recipiente puede unirse a un tubo con estructura de malla plástica cubierta de tela si las condiciones de aplicación lo requieren (**b**). Este tubo cubierto de tela podrá ser, opcionalmente, fijado al suelo según las condiciones del terreno (**c**).

EJEMPLOS

A continuación, se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, en los que pone de manifiesto la efectividad del producto de la invención. Los

siguientes ejemplos sirven para ilustrar la invención y no deben ser considerados como limitativos del alcance de la misma.

Ejemplo 1. Identificación y caracterización de *S. selloanae*.

5

Materiales y métodos.

Se ha extraído el ADN genómico de ocho larvas y nueve adultos recogidos en la localidad de Zapateira, A Coruña, España, utilizando un kit comercial (*High Pure PCR Template Preparation Kit, Roche*), siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez obtenido el ADN, se han secuenciado dos regiones tomando como referencia la secuencia del gen citocromo mitocondrial c oxidasa subunidad I (COI), del genoma mitocondrial de la especie de cecidómido *Mayetiola destructor*, identificado en la base de datos GeneBank: GQ387648.1:1145-2680, concretamente se han tomado como referencia las posiciones

10 1176 a 1874 de dicho gen. Para la secuenciación se utilizaron los cebadores CeciLCOF (5'-TTC TAC TAA TCA TAA AGA TAT TGG-3' SEQ ID NO: 3) (Folmer et al. 1994; *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3(5): 294-299); y CeciNancyr (5'-CCW GGT AAA ATT AAA ATA TAA ACT TC-3', SEQ ID NO: 4) (Simon et al. 1994; *Annals of the Entomological Society of America*, 87(6): 651-701). Las condiciones de reacción consistieron en un ciclo

15 de dos minutos a 95°C seguido de 35 ciclos de 45 segundos a 94°C, 50°C y 68°C. Finalmente, un ciclo de siete minutos a 68°C. Los fragmentos amplificados se purificaron y secuenciaron en un analizador Applied Biosystems. La inspección de los electroferogramas y los alineamientos se realizó con el programa CODONCODES 3.7.1.1.

25 Se identificaron dos haplotipos que difieren entre ellos en la sustitución de la posición 327 de la secuencia del gen COI de *Mayetiola destructor* (número de acceso en GenBank: GQ387648.1:1145-2680), concretamente las posiciones 1176-1874 de dicho gen. Se trata de una transición guanina-adenina en el comienzo de un codón (G/A)AC. El haplotipo 1 (SEQ ID NO: 1) presenta el codón (GAC) que codifica para glicina y el haplotipo 2 (SEQ ID

30 NO: 2) presenta el codón (AAC) que codifica para ácido glutámico.

Los haplotipos identificados (SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2) se introdujeron en la base de datos NCBI utilizando BLASTN 2.9.0+ (Zhang et al. 2000: *Journal of Computational Biology*, 7:203-214) y en el Sistema de identificación BOLD (Ratnasingham & Hebert 2007,

35 *Molecular Ecology Notes*, 7: 355-364), para identificar cuáles eran las especies más

cercanas a ésta, así como sus porcentajes de identidad. Las especies más próximas identificadas fueron *Macrolabis fagicola* (número de acceso en GenBank: JQ684878.1) y *Janetiella glechomae* (número de acceso en GenBank: KR742308.1 utilizado para el haplotipo 1 (SEQ ID NO: 1) y los números de acceso: KR740388, KR743364 y KR956680
5 utilizados para el haplotipo 2 (SEQ ID NO: 2)), siendo los porcentajes de identidad obtenidos los siguientes:

- *Macrolabis fagicola* (número de acceso en GenBank: JQ684878.1): muestra un 90,29% de identidad frente al haplotipo 1 (SEQ ID NO: 1) de *S. selloanae*, y un 90,27% de identidad frente al haplotipo 2 (SEQ ID NO: 2), y
- 10 - *Janetiella glechomae* (número de acceso en GenBank: KR742308.1 utilizado para el haplotipo 1 y los números de acceso: KR740388, KR743364 y KR956680 utilizados para el haplotipo 2): muestra un 90,43% de identidad frente al haplotipo 1 (SEQ ID NO: 1) de *S. selloanae*, y un 90,6% de identidad frente al haplotipo 2 (SEQ ID NO: 2) de *S. selloanae*.

15

Ejemplo 2. Análisis de la viabilidad de las larvas de *S. selloanae* tras ser conservadas mediante el método de conservación de la invención.

En la época de dispersión de la planta *C. selloana* se seleccionaron 120 larvas viables de
20 las inflorescencias de pies femeninos. Las larvas seleccionadas se conservan sin alterar el propágulo infectado, manteniendo la cubierta protectora (lema o glumela inferior). Las 120 larvas se introdujeron en 6 placas Petri (aproximadamente, unas 20 larvas en cada placa de Petri) donde cada una de las placas comprendía 4 gramos de sustrato. El sustrato comprende 40% arena grano fino, 40% tierra vegetal y 20% de perlita, y presenta un grado
25 de humedad aproximado del 40%.

Los componentes de dicho sustrato fueron previamente esterilizados (temperatura de 121°C durante 20 minutos a una 1 atmósfera de presión).

30 A continuación, las larvas junto con el sustrato, se conservan en oscuridad a una temperatura de entre 4°C-5°C, siguiendo el protocolo del método de conservación descrito en la presente invención.

Tras un mes de conservación, la viabilidad de las larvas se ha analizado mediante la
35 visualización en dos placas de Petri de una muestra de al menos diez propágulos

infectados, cada una con una larva en su interior, en cada placa. Esta operación se ha realizado de nuevo tras dos meses de conservación, en la que se volvieron a visualizar las dos placas anteriores y dos nuevas, y tras tres meses de conservación, en la que se visualizaron las cuatro placas anteriores y dos nuevas adicionales.

5

Para la determinación de la viabilidad, se han estudiado en el laboratorio dos indicadores de viabilidad: color y movimiento. Así, un color o pigmentación naranja muy llamativa es característica de las larvas vivas o viables. Un color crema o blanquecino indica que la larva ha perdido viabilidad, o bien un color marrón o ennegrecido, que indica la muerte de la larva. El movimiento se determina por la estimulación física suave sobre la larva con aguja, que provoca una respuesta en forma de ligeras contracciones corporales y demuestra viabilidad.

10

En la Tabla 1 mostrada a continuación se observa que las larvas analizadas muestran un 100% de viabilidad tras ser sometidas al protocolo de conservación de la invención.

15

Tabla 1. Análisis de la viabilidad de las larvas de *S. selloanae* conservadas siguiendo el método descrito en la invención. La viabilidad se comprueba con los indicadores de pigmentación y reacción motriz a estimulación física.

20

Placa número	11/12/2019	15/01/2020	14/02/2020
1	10-15 larvas <i>100% viables.</i>	10-15 larvas <i>100% viables.</i>	10-15 larvas <i>100% viables.</i>
2	10-15 larvas, <i>100% viables.</i>	10-15 larvas, <i>100% viables.</i>	10-15 larvas, <i>100% viables.</i>
3		10-15 larvas, <i>100% viables.</i>	10-15 larvas, <i>100% viables.</i>
4		10-15 larvas, <i>100% viables.</i>	10-15 larvas, <i>100% viables.</i>
5			10-15 larvas, <i>100% viables.</i>
6			15-20 larvas, <i>100% viables.</i>

Ejemplo 3. Control biológico *C. selloana* mediante el uso del agente de control de la invención.

Las placas almacenadas y conservadas en frío, que comprenden la composición de la invención se introducen, para su transporte y colocación en el lugar de tratamiento, en un
 5 recipiente desechable fabricado con cualquier material, preferiblemente cartón, y que presenta un tamaño aproximado de 120 mm de ancho x 60 mm de alto (**Fig. 2a**). Dicho recipiente se deposita a temperatura ambiente en el entorno de las plantas hembra de la especie *C. selloana*, preferiblemente al menos dos semanas antes, más preferiblemente al
 10 menos una semana antes, de la floración de las mismas.

Cada recipiente desechable contiene a su vez en su interior al menos 4 placas que comprenden la composición de la invención. Es recomendable usar de entre 1 a 2 placas con la composición de la invención por planta que se pretende infectar. Es recomendable
 15 colocar los recipientes desechables a una distancia de al menos un metro de distancia entre ellos, pero dependerá de la densidad de plantas que haya en el lugar donde se lleve a cabo el tratamiento.

Cuando la población está formada por pocas plantas, por ejemplo, unas 10 plantas o
 20 menos, o estas se encuentran dispersas a cierta distancia, por ejemplo, a una distancia aproximada de al menos 5 metros o más, entre ellas, los recipientes desechables se sitúan individualmente para cada planta. Cuando la población está formada por numerosas plantas en una densidad alta, por ejemplo, una densidad de plantas mayor de 0,5 plantas/m², las placas se sitúan en un intervalo regular en forma de malla, con una distancia
 25 entre placas de 3-5 metros.

Si las condiciones climáticas durante la fase de aplicación de los recipientes desechables con la composición de la invención para llevar a cabo el control biológico de *C. selloana* son desfavorables, sobre todo con vientos fuertes, se puede asegurar el método de
 30 infección conectando el recipiente desechable que contiene las placas con la composición de la invención a un cilindro o prisma rectangular capaz de colocarse alrededor de la inflorescencia de la planta, y que puede tener un tamaño aproximado de 200 mm de diámetro x 500 mm de alto, formado por una estructura de alambre o malla de plástico de aproximadamente 10mm x 10 mm de luz de malla recubierta por una tela de nylon o tejido
 35 similar de luz de malla inferior a 1 mm y que no retenga humedad (**Fig. 2b**). Dicho cilindro

o prisma se coloca sobre la inflorescencia femenina que se quiera infectar y, dependiendo de las condiciones del terreno y de la planta, puede, además, fijarse al suelo para evitar su caída (**Fig. 2c**). Este elemento, podrá variar en cualquier forma y tamaño, siempre teniendo en cuenta que se utiliza para proteger la inflorescencia y que se produzca la infección de una manera más directa, sobre todo cuando las condiciones climáticas no son idóneas. Alternativamente, el elemento protector de la inflorescencia se podrá retirar durante la época de dispersión de las semillas de *C. selloana*, que suele ocurrir alrededor de al menos 2 meses después del inicio de la infección.

El recipiente desechable que contiene en su interior las placas con la composición de la invención se coloca bajo las plantas que se quieren infectar, a una distancia máxima de un metro de éstas, o bien fijadas a cualquier parte del elemento rectangular utilizado para proteger las inflorescencias, evitando dispersar la composición de la invención, particularmente el sustrato de la composición de la invención. Una vez depositados los recipientes, se procede a abrir las placas para que los adultos que emergen de las larvas puedan acceder a las inflorescencias de las plantas y hacer su función.

Es conocido que el cecidómido *Stenodiplosis sorghicola* que afecta a los cultivos de sorgo en Australia, utilizando un protocolo de infección similar al descrito en la presente invención, mediante recipientes/placas con 10 individuos de *S. sorghicola* cada placa, infectaron inflorescencias de *Sorghum halepense* cubiertas por una estructura con tela de nylon, siendo capaz cada hembra de depositar 21,6 huevos, de los que eclosionarán las larvas (Sharma, HC, & Franzmann, BA. J. Appl. Ent. 2001;125:109-114). Dicha cantidad de huevos por hembra se acerca a datos obtenidos para otra especie de cecidómido, *Feltiella acarisuga*, en la que las hembras producen una media de 33,3 huevos a lo largo de su vida adulta (Mo, TL & Liu TX Environ Entomol. 2007;36(2):369-75).

Para el caso de la presente invención, es interesante mencionar que el agente de control biológico, *S. selloanae*, produce al menos una segunda generación de adultos a partir de las larvas conservadas llevando a cabo el método descrito en la presente invención. Así, asumiendo una producción de entre 15 y 20 huevos viables por hembra, durante la vida de la inflorescencia podrán desarrollarse entre 5000 y 10000 larvas aproximadamente. Teniendo en cuenta que una inflorescencia de *C. selloana* puede producir unas 100000 semillas viables, el método de control biológico descrito en la presente invención supondrá la reducción de al menos el 5% de sus semillas viables con una única aplicación. Si

además, se tiene en cuenta que en el medio natural donde se ha encontrado el agente de control biológico de la invención se han observado inflorescencias donde las larvas ocupan el 75% de las flores, la aplicación repetida del método de control biológico propuesto aquí reducirá el número de semillas viables al menos en este porcentaje.

5

Para evitar potenciales contaminaciones de cualquier organismo, se recomienda un tratamiento adecuado para los recipientes que comprenden la composición de la invención a los 20 días tras la colocación bajo las plantas. Aunque los recipientes se hayan esterilizado previamente, es posible que los propágulos infectados porten esporas de hongos, por lo que el recipiente desechable con los recipientes de la composición de la invención en su interior, se recomienda ser esterilizado para un mejor aprovechamiento del método de control biológico de la invención.

10

REIVINDICACIONES

1. Composición que comprende al menos un agente de control biológico de la especie *Spanolepis selloanae* en combinación con un sustrato que comprende tierra vegetal, un ingrediente no poroso, inerte químicamente y con dimensiones inferiores a 5 mm, y otro ingrediente poroso.
5
2. Composición según la reivindicación 1 donde el agente de control se encuentra en estadio larvario y en una proporción de al menos 5 larvas/g de sustrato.
10
3. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 donde el sustrato comprende una concentración de al menos un 35% de tierra vegetal, al menos un 35% del ingrediente no poroso, y al menos un 15% del ingrediente poroso, respecto a la concentración total de la composición.
15
4. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 donde el sustrato comprende una concentración de un 40% de tierra vegetal, un 40% del ingrediente no poroso, y 20% del ingrediente poroso, respecto a la concentración total de la composición.
20
5. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 donde el sustrato comprende tierra vegetal, arena fina como ingrediente no poroso y perlita y/o vermiculita como ingrediente poroso.
25
6. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 caracterizada por que presenta un grado de humedad de al menos un 30%, preferiblemente un 40%.
30
7. Uso del agente de control biológico de la especie *S. selloanae* y/o de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, como agentes de control biológico frente a la especie vegetal *Cordaderia selloana*.
35
8. Método de conservación del agente de control de la especie *S. selloanae*, preferiblemente larvas de *S. selloanae*, que comprende las etapas de:
 - a. recolectar el agente de control *S. selloanae*, preferiblemente en estadio larvario, de las inflorescencias de las plantas femeninas de *C. selloana*,

- b. introducir el agente de control recolectado en la etapa a) en un sustrato que comprende tierra vegetal, arena fina, y perlita y/o vermiculita, donde dicho sustrato ha sido previamente esterilizado,
- c. almacenar el agente de control junto con el sustrato en condiciones de oscuridad y a una temperatura de entre 2 °C a 10°C.
- 5
9. Método de conservación según la reivindicación 8 caracterizado porque la recolección del agente de control se lleva a cabo entre los meses de octubre a noviembre.
- 10
10. Método de conservación según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 9 caracterizado porque en la etapa de recolección, el agente de control, preferiblemente en el estadio larvario, se recolecta vivo, y preferiblemente junto con el propágala de la planta.
- 15
11. Método de conservación según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10 caracterizado porque el sustrato comprende al menos un 35%, preferiblemente un 40%, de tierra vegetal, al menos un 35%, preferiblemente un 40%, del ingrediente no poroso, y al menos un 15%, preferiblemente un 20%, del ingrediente poroso, respecto a la concentración total de la composición.
- 20
12. Método de conservación según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11 caracterizado porque el sustrato comprende al menos un 35%, al menos un 40%, de tierra vegetal, al menos un 35%, preferiblemente un 40%, de arena fina, y al menos un 15%, preferiblemente 20%, de perlita y/o vermiculita, respecto a la concentración total de la composición
- 25
13. Método de conservación según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12 caracterizado por que en la etapa b) se introducen al menos 5 agentes de control, preferiblemente en estadio larvario, por gramo de sustrato.
- 30
14. Método de conservación según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 13 caracterizado porque en la etapa c) la temperatura varía de entre 4°C a 5°C.

15. Método de conservación según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 14 caracterizado porque el agente de control, preferiblemente en estadio larvario, se conserva en la etapa c) durante al menos 9 meses.

5 16. Método de control biológico del crecimiento y expansión de *C. selloana*, que comprende las siguientes etapas:

10 a) poner en contacto plantas de la especie *C. selloana* con una cantidad efectiva del agente de control de la especie *S. selloanae* y/o de una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6,

b) Dejar actuar el tiempo suficiente el agente de control y/o la composición de la etapa a), para permitir que el agente se transforme en individuo adulto e infecte las inflorescencias de las plantas *C. selloana*, preferiblemente, dicho tiempo será de al menos 15 días, más preferiblemente, de al menos 20 días, y

15 c) Opcionalmente repetir las etapas a) y b).

17. Método de control biológico según la reivindicación 16 caracterizado porque tras la etapa b) se lleva a cabo la esterilización de la composición de la invención.

20

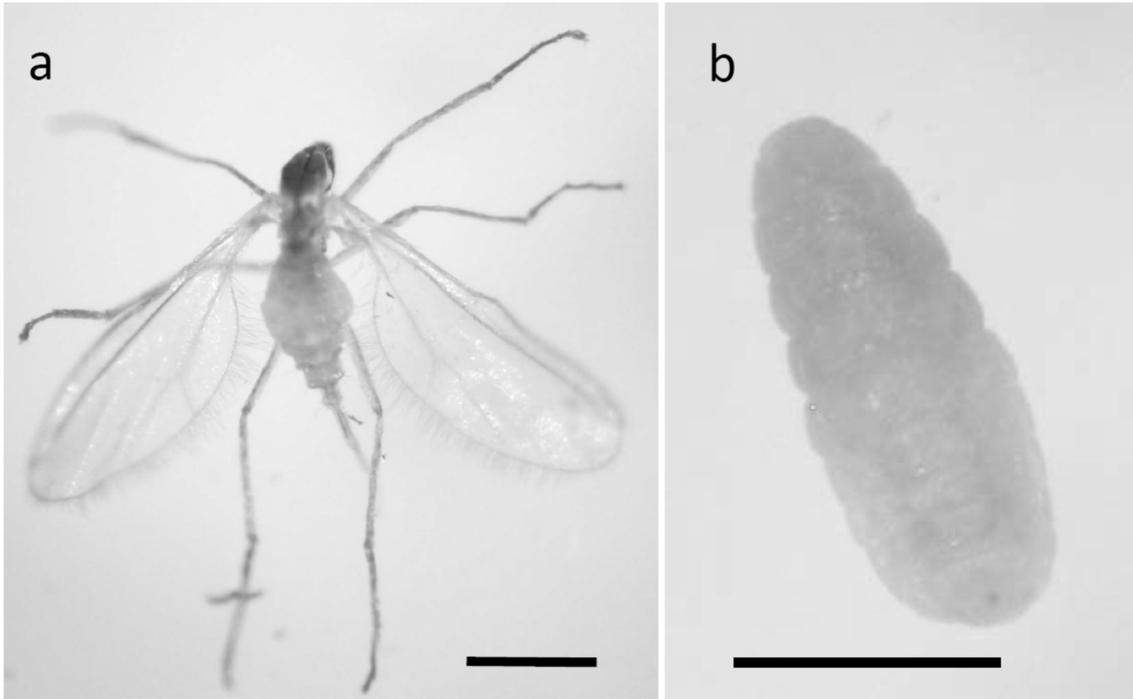


Figura 1

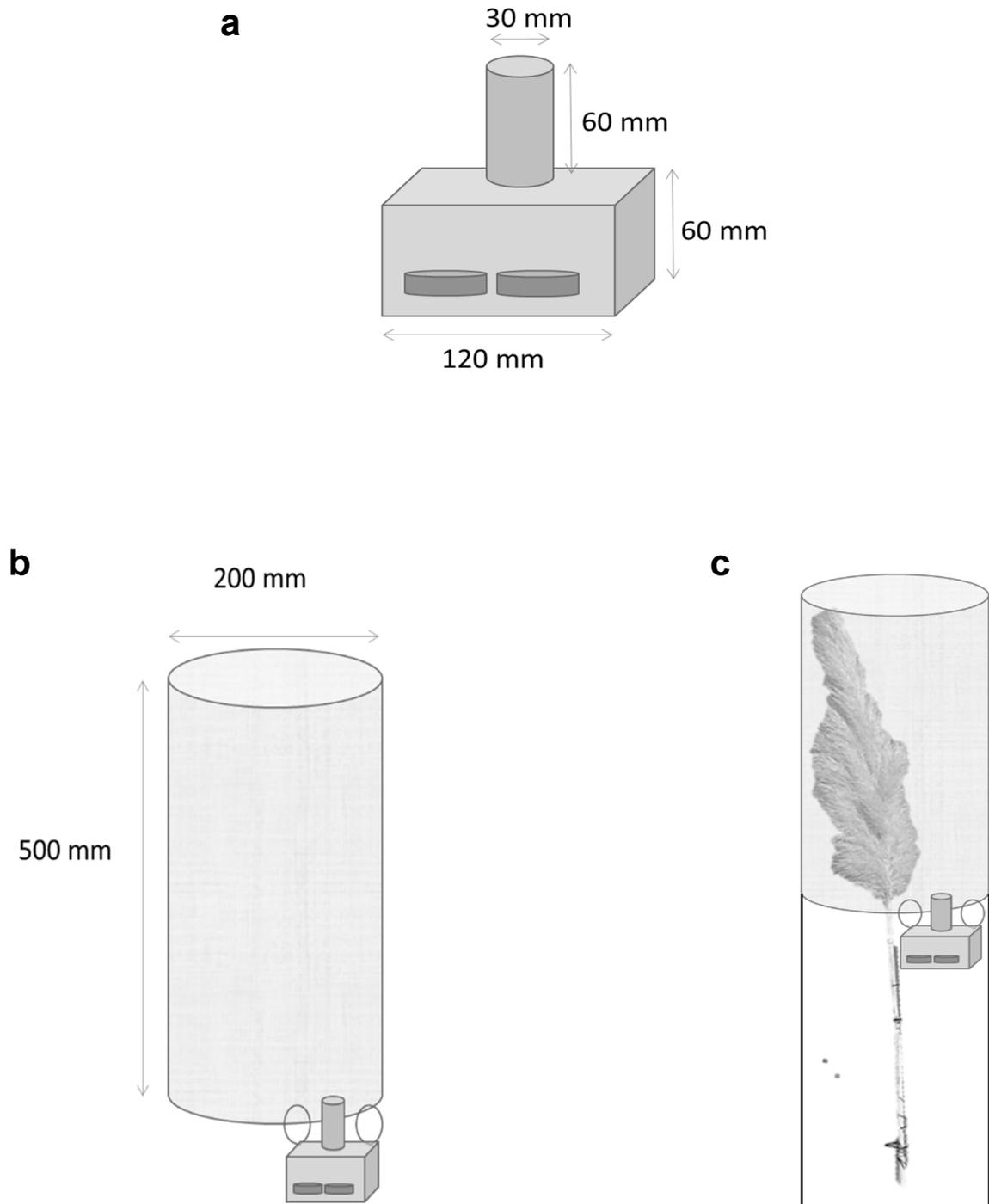


Figura 2



- ②¹ N.º solicitud: 202030389
②² Fecha de presentación de la solicitud: 04.05.2020
③² Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤¹ Int. Cl.: **A01N63/14** (2020.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤ ⁶ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	SUTTON G F et al. "Grasses as suitable targets for classical weed biological control". BIOCONTROL, 20190904 KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS, DORDRECHT, NL. Mercado-Blanco Jesús; Cazorla Francisco M, 04/09/2019, Vol. 64, Nº 6, Páginas 605 - 622, ISSN 1386-6141, <DOI: doi: 10.1007/s10526-019-09968-8>. (ver Tabla 1 y apartado "Grasses as suitable targets for biological control").	1-17
A	VICTORIA ANN FROUDE. "Biological control options for invasive weeds of New Zealand protected areas" SCIENCE FOR CONSERVATION 199, 01/06/2002, Páginas 1-68 Recuperado de Internet <URL: https://www.doc.govt.nz/Documents/science-and-technical/sfc199.pdf >, ISSN 1173-2946. (ver apartado 9.2).	1-17
A	DOLORES IBANEZ MARIA et al. "Ginger and Turmeric Essential Oils for Weed Control and Food Crop Protection". Plants-Basel MAR 10 2019. (10/03/2019), Vol. 8, Nº 3, Páginas Article No.: 59, ISSN 2223-7747(print) ISSN 2223-7747(electronic), <DOI: doi: 10.3390/plants8030059>. (ver apartado 2)	1-17
A	DOLORES IBANEZ MARIA et al. "Tea tree and wintergreen essential oils in the management of the invasive species <i>Cortaderia selloana</i> and <i>Nicotiana glauca</i> ". Journal of Plant Protection Research 2019. , 30/11/2018, Vol. 59, Nº 2, Páginas 160-169, ISSN 1427-4345(print) ISSN 1899-007X(electronic), <DOI: doi:10.24425/jppr.2019.129281>. (ver apartado "In vitro phytotoxic activity of tea tree and wintergreen essential oils against seed germination and seedling growth of <i>Cortaderia selloana</i> and <i>Nicotiana glauca</i> ").	1-17

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
23.11.2020

Examinador
M. d. García Coca

Página
1/2

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A01N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, MEDLINE/NLM, EMBASE/Elsevier, XPESP, Bases de Datos TXT, EMBL-EBI