



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 334 763**

⑫ Número de solicitud: 200930883

⑮ Int. Cl.:
A01N 31/02 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **21.10.2009**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **15.03.2010**

⑭ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
15.03.2010

⑰ Solicitante/s: **Universidad de Valladolid**
Plaza de Santa Cruz, 5 - Bajo
47002 Valladolid, ES

⑱ Inventor/es: **Pajares Alonso, Juan Alberto y**
Hall, David Robert

⑳ Agente: **Ungría López, Javier**

② Título: **Cebo atrayente para capturar el insecto coleóptero perforador del pino, *Monochamus galloprovincialis*.**

③ Resumen:

Cebo atrayente para capturar el insecto coleóptero perforador del pino, *Monochamus galloprovincialis*.

La presente invención se refiere a un cebo para capturar el insecto *M. galloprovincialis* caracterizado porque comprende al menos la feromona de *M. galloprovincialis* 2-undeciloxi-1-etanol y al menos dos cairomonas atractivas para esta especie, preferentemente a un cebo que comprende 2-undeciloxi-1-etanol, ipsenol, 2-metil-3-butenol y α -pineno.

ES 2 334 763 A1

DESCRIPCIÓN

Cebo atrayente para capturar el insecto coleóptero perforador del pino, *Monochamus galloprovincialis*.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se relaciona con un método para atraer a trampas donde sea capturado y controlado el insecto perforador del pino *Monochamus galloprovincialis*, actual transmisor en Europa del nematodo del pino (*Bursaphelenchus xylophilus*), un patógeno causante de la enfermedad del marchitamiento de los pinos.

10

Antecedentes de la invención

La enfermedad del *marchitamiento de los pinos*, ("Pine Wilt Disease", PWD), representa en estos momentos la más seria y destructiva amenaza que gravita sobre las masas de pinares en nuestro país y en Europa. Esta letal patología está causada por el nematodo de la madera del pino ("Pine wood nematode", PWN) *Bursaphelenchus xylophilus*, un organismo originario de Norteamérica considerado de cuarentena en la Unión Europea, que ya ha ocasionado la muerte de millones de árboles en Japón, China, Corea y Taiwán. En 1999 se detectó la introducción de este patógeno por primera vez en Europa en Portugal. Hasta recientemente, la enfermedad se expandió lentamente, circunscrita en un área demarcada dentro de la península de Marateca (Setúbal). En 2008, la enfermedad ha sido detectada en numerosas áreas forestales de Portugal, algunas peligrosamente próximas a la frontera española, y todo el país ha sido declarado zona demarcada.

Las prospecciones realizadas en España han encontrado que materiales de madera (palets, trozas) procedentes de Portugal contenían este nematodo y finalmente ha sido declarado oficialmente un positivo en un árbol situado en la provincia de Cáceres. Por tanto, el riesgo grave de introducción del PWN en nuestro país hace urgente aplicar medidas de control para evitar el patógeno se establezca y se extienda por nuestras masas forestales. Existe pues actualmente una gran necesidad y demanda de herramientas que permitan realizar efectivamente este control.

El PWN requiere necesariamente la acción de insectos coleópteros cerambícidos del género *Monochamus* para que pueda ser transmitido e infectar a los árboles. En Europa la especie transmisora es *Monochamus galloprovincialis*. Este insecto se reproduce en el tronco de los árboles decadentes o recién muertos, pero es capaz de infectar a los árboles sanos cuando los adultos sexualmente inmaduros recién emergidos se dirigen a alimentarse en los ramillos de los árboles sanos, de forma que, si los insectos transportan nematodos, éstos abandonan entonces el insecto y penetran en el árbol, infectándolo, a través de las mordeduras de alimentación.

35

El control directo del nematodo en monte ha resultado hasta ahora inviable, y los esfuerzos para limitar la extensión e incidencia de la enfermedad se centran en tratar de controlar el insecto vector. Un método de gran utilidad en el seguimiento, detección y control de las poblaciones del insecto vector es su captura en trampas cebadas con atrayentes. En Asia (Japón, Corea, Taiwan y China) se han utilizados como atrayentes para sus especies de *Monochamus* vectoras (*M. alternatus*, *M. saltuarius*) diversos monoterpenos de los pinos, principalmente α -pineno, junto con etanol. Esta mezcla resulta ligeramente atractiva y solamente tiene cierta utilidad en la detección y monitoreo de los insectos. En Norteamérica, donde el nematodo es originario pero no resulta virulento sobre las especies nativas de pinos, se ha descrito que la respuesta atractiva de los *Monochamus* Norteamericanos (*M. scutellatus* y *M. clamator* entre otros) se ve aumentada cuando junto a α -pineno y etanol se emiten algunos compuestos que se conocen como componentes de las feromonas de agregación de insectos coleópteros escolítidos perforadores de los pinos: ipsenol principalmente, e ipsdienol. Técnicamente, todos estos compuestos atractivos a una especie pero de origen ajeno a ella (por ejemplo, el árbol hospedante, presas, competidores, etc) se denominan genéricamente cairomonas (a diferencia de las feromonas, que son producidas por la propia especie).

En Europa se ha estudiado recientemente la atracción de *M. galloprovincialis* a diversas combinaciones de sustancias cairomonales del árbol y de los escolítidos, y se ha demostrado que la emisión combinada de α -pineno, ipsenol y 2-metil-3-buten-1-ol supone un buen cebo atractivo para *M. galloprovincialis*, que no resulta mejorado si se le añaden otras sustancias cairomonales (Pajares *et al.*, 04; Ibeas *et al.*, 07). Estos resultados han supuesto un importante avance en el manejo de esta plaga, al suponer un cebo que aumenta la eficacia en la detección y monitoreo de este vector, si bien no resultan suficientes para un control directo de los insectos vectores mediante captura masiva, lo cual resultaría necesario para un manejo efectivo de la enfermedad.

Para mejorar la posibilidad de controlar este insecto mediante un potente cebo atractivo se han emprendido estudios para conocer si *M. galloprovincialis* poseía una feromona sexual o agregativa que provocase la atracción entre los individuos de ambos sexos, lo cual ha sido recientemente sugerido, sin que dicha sustancia fuese conocida (Ibeas *et al.*, 08).

Descripción de la invención

La presente invención tiene como objeto identificar la feromona sexual de *M. galloprovincialis* y obtener un cebo altamente atractivo para el control directo de esta especie, y por tanto de la enfermedad que transmite, combinando esta feromona sexual con otras sustancias cairomonales.

Cebo en el sentido de la presente invención no se debe entender como una composición química, sino que las sustancias que lo componen se disponen y utilizan juntas, pero no tienen por qué estar mezcladas entre sí. Tampoco se debe entender como un cebo alimentario, puesto que no contiene componentes alimentarios. La palabra cebo en este campo no debe entenderse necesariamente como algo para comer, sino aquí como algo que atrae (en inglés se usa más propiamente para estos casos "lure").

La presente invención se refiere por lo tanto a un cebo para capturar el insecto *M. galloprovincialis* caracterizado porque comprende la feromona de *M. galloprovincialis* 2-undeciloxi-1-etanol y al menos dos cairomonas atractivas para esta especie.

La feromona 2-undeciloxi-1-etanol está presente en el cebo en una cantidad comprendida entre 10 mg y 1000 mg, preferentemente entre 20 y 500 mg, más preferentemente entre 25 y 300 mg y aún más preferentemente entre 40 y 200 mgr.

La feromona de *M. galloprovincialis* 2-undeciloxi-1-etanol es un compuesto volátil, y esta propiedad es lo que la hace además especialmente apropiada para el objetivo que se pretende.

Según realizaciones particulares de la invención el cebo comprende 2-undeciloxi-1-etanol y cairomonas procedentes tanto del árbol hospedante del insecto como de escolítidos. En otros casos el cebo comprende 2-undeciloxi-1-etanol, al menos una cairomona procedente del árbol hospedante y al menos una cairomona procedente de escolítidos.

La cairomona procedente del árbol hospedante puede ser un monoterpeno, tal como α -pineno. Dicha cairomona procedente del árbol hospedante está presente en el cebo en una cantidad comprendida entre 1 g y 400 g, preferentemente entre 10 g y 300 g, más preferentemente entre 20 g y 200 g y aún más preferentemente entre 30 g y 100 g.

Cuando el cebo comprende cairomonas del árbol hospedante y cairomonas de escolítidos, las primeras están presentes en el cebo en una cantidad comprendida entre 1 g y 400 g, y las cairomonas de escolítidos están presentes cada una en el cebo en una cantidad comprendida entre 10 mg y 20 g, preferentemente las cairomonas del árbol están presentes en el cebo en una cantidad comprendida entre 10 g y 300 g y las cairomonas de escolítidos están presentes cada una en el cebo en una cantidad comprendida entre 15 mg y 15 g, más preferentemente las cairomonas del árbol están presentes en el cebo en una cantidad comprendida entre 30 g y 100 g y las cairomonas de escolítidos están presentes cada una en el cebo en una cantidad comprendida entre 20 mg y 10 g.

Según realizaciones particulares adicionales, el cebo comprende 2-undeciloxi-1-etanol y cairomonas procedentes exclusivamente de escolítidos, preferentemente dos cairomonas de escolítidos.

Las cairomonas de escolítidos están preferentemente seleccionadas entre ipsenol, 2-metil-3-butenol y ipsdienol.

Una realización especialmente preferida es la que comprende 2-undeciloxi-1-etanol, alfa-pineno, ipsenol y 2-metil-3-butenol.

Una realización adicional especialmente preferida es la que comprende 2-undeciloxi-1-etanol, ipsenol y 2-metil-3-butenol.

El ipsenol está presente en el cebo en una cantidad comprendida entre 10 mg y 3000 mg, preferentemente entre 15 mg y 2000 mg, más preferentemente entre 20 y 1000 mg, y aún más preferentemente entre 20 y 700 mg.

El ipsdienol está presente en el cebo en una cantidad comprendida entre 10 mg y 3000 mg, preferentemente entre 15 mg y 2000 mg, más preferentemente entre 20 y 1000 mg, y aún más preferentemente entre 20 y 700 mg.

El 2-metil-3-butenol está presente en el cebo en una cantidad comprendida entre 100 mg y 20000 mg, preferentemente entre 200 mg y 15000 mg, más preferentemente entre 500 y 10000 mg, y aún más preferentemente entre 1000 y 5000 mg.

Una realización especialmente preferida es la de un cebo que comprende:

- 2-undeciloxi-1-etanol en una cantidad comprendida entre 10 mg y 1000 mg
- ipsenol en una cantidad comprendida entre 10 mg y 1000 mg y
- 2-metil-3-butenol en una cantidad comprendida entre 100 mg y 5000 mg.

Una realización adicional especialmente preferida es la de un cebo que comprende:

- 2-undeciloxi-1-etanol en una cantidad comprendida entre 10 mg y 1000 mg
- α -pineno en una cantidad comprendida entre 1 g y 300 g,

ES 2 334 763 A1

- ipsenol en una cantidad comprendida entre 10 mg y 1000 mg,
- 2-metil-3-butenol en una cantidad comprendida entre 100 mg y 5000 mg.

5 Las sustancias que componen el cebo de la invención se pueden emitir desde un difusor único o desde más de un difusor, pero como realización preferente se emiten cada una desde difusores independientes. Por lo tanto no se han mezclado entre ellas sino que la mezcla se produce en el aire al emitirse unas junto a otras. Según realizaciones particulares alguna de ellas pueden emitirse juntas, como el ipsenol y el metil-butenol. Según otras realizaciones el cebo consta de dos o tres difusores (como un kit) que se instalan juntos en la trampa, lo cual es bastante habitual en el campo de los atrayentes. Esto es debido a las diferentes velocidades de difusión de cada una de las sustancias, que obliga a utilizar diferentes difusores para obtener tasas adecuadas de emisión.

10 No hay orden de colocación en la trampa, se cuelgan unas al lado de las otras; el tipo de trampa es irrelevante, siempre que sea dentro de las apropiadas para la captura de este insecto.

15 La presente invención se refiere también a una trampa caracterizada porque comprende el cebo definido anteriormente en esta memoria.

20 La presente invención se refiere también al uso, y más particularmente al uso combinado, de la feromona de *M. galloprovincialis* 2-undeciloxi-1-etanol con al menos dos cairomonas atractivas para esta especie en la preparación de un cebo para capturar el insecto *M. galloprovincialis*. Uso combinado significa, de acuerdo con la invención, el uso simultáneo de la feromona y las cairomonas en un cebo.

25 La presente invención proporciona un cebo atractivo altamente efectivo para la captura del insecto cerambícido perforador de los pinos *Monochamus galloprovincialis*.

30 El ipsenol, 2-metil-3-butenol y α -pineno son cairomonas anteriormente conocidas como atractivas a esta especie. Sin embargo, la combinación de la feromona con las tres cairomonas provoca un efecto sinérgico que supone una atracción el doble de la suma de las atracciones conseguidas por la feromona y por las cairomonas por separado. Este nuevo cebo feromonal-cairomonal permite capturar con gran eficiencia a este relevante insecto, necesario transmisor del peligroso nematodo del pino, un letal patógeno que actualmente amenaza las masas de pinares de España y Europa. La utilización del cebo presentado ampliará y mejorará las posibilidades de control de esta enfermedad.

35 Breve descripción de las figuras

La figura 1 muestra un análisis GC-FID de volátiles de *M. galloprovincialis* colectados durante periodo de luz: (a) análisis de colecciones de ramillos de pino solos (24 hr; traza inferior) y después de añadir un macho maduro de *M. galloprovincialis* (traza superior; 48 hr); (b) análisis de colecciones de ramillos de pino solos (24 hr; traza inferior) y después de añadir una hembra madura de *M. galloprovincialis* (traza superior; 48 hr). Compuesto específico del macho marcado con un *.

La figura 2 muestra un espectro de masas EI de (a) compuesto específico de los machos de *M. galloprovincialis*, (b) este compuesto después de acetilación y (c) 2-undeciloxi-1-etanol sintético.

45 La figura 3 muestra la estructura del compuesto específico de los machos de *M. galloprovincialis*.

La figura 4 muestra un análisis GC-EAG con registro EAG de la antena de la hembra de *M. galloprovincialis*: (a) volátiles de machos maduros; (b) 2-undeciloxi-1-etanol sintético (10 ng inyectados).

50 La figura 5 muestra el número medio de *M. galloprovincialis* capturados por trampa (S. España, Murcia, del 3 de julio al 7 de agosto de 2008) en trampas de embudos múltiples cebadas con cairomonas y con el compuesto feromonal de *M. galloprovincialis*. Compuestos: aP, α -pineno; Is, Ipsenol; Mb, 2-metil-3-butenol; FeB, feromona en dosis baja; FeA, feromona en dosis alta. Para cada sexo, barras seguidas de la misma letra no son significativamente diferentes. Test LSD, $P > 0.05$. ANOVA: Machos: $F = 22.85$, d.f. = 4, $P < 0.0001$, $n = 7$; Hembras: $F = 26.03$, d.f. = 4, $P < 0.0001$, $n = 7$.

55 La figura 6 muestra el número medio de *M. galloprovincialis* capturados por trampa (S. España, Murcia, del 7 de agosto al 26 de septiembre de 2008) en trampas de embudos múltiples cebadas con cairomonas y con el compuesto feromonal de *M. galloprovincialis*. Compuestos: aP, α -pineno; Id, Ipsdienol; Mb, 2-metil-3-butenol; FeB, feromona en dosis baja; FeA, feromona en dosis alta. Para cada sexo, barras seguidas de la misma letra no son significativamente diferentes. Test LSD, $P > 0.05$. ANOVA: Machos: $F = 10.95$, d.f. = 4, $P < 0.0001$, $n = 7$; Hembras: $F = 22.87$, d.f. = 4, $P < 0.0001$, $n = 7$.

65

Ejemplo 1

Se ha preparado un cebo de acuerdo con la invención del siguiente modo:

- 5 Un difusor de 2-undeciloxi-1-etanol conteniendo 50 mgr, un difusor de α -Pineno conteniendo 200 g, un difusor de ipsenol conteniendo 40 mg y un difusor de 2-metil-3-butenol conteniendo 4000 mg. Los cuatro difusores se disponen colgados simultáneamente en la misma trampa.

10 Ejemplo 2

- Para la identificación de la feromona sexual de *M. galloprovincialis* se realizó la colección de volátiles separadamente de ramillas de pino solas, 1 a 3 machos sexualmente maduros junto con ramillas de pino y 1 a 3 hembras maduras con ramillas de pino. La comparación de los cromatogramas de los volátiles obtenidos (Fig 1) reveló la presencia de un compuesto adicional sólo en las aireaciones con machos. El tiempo de retención de este compuesto en el GC (Cromatógrafo de Gases) se indica en la Tabla 1 y el espectro de masas EI en la Figura 2a.

TABLA 1

20 *Datos de retención GC para el compuesto específico de los machos de M. galloprovincialis*

Especie (compuesto)	Índice de Retención (RI) ^a		
	Cera	SPB5	Δ^b
<i>M. galloprovincialis</i>	2126	1617	509
<i>M. galloprovincialis</i>	2152	1778	374
después de acetilación			
2-undeciloxi-1-etanol	2126	1617	509

^a Índices de retención relativos a los tiempos de retención de hidrocarburos de cadena lineal.

^b Diferencia entre RI en columna polar y RI en columna no polar.

- La comparación de las librerías indicó inicialmente un ajuste del 38% para hexiloxietan-1-ol. El espectro de masas del compuesto de los machos de *M. galloprovincialis* (Fig. 2a) mostró un ión inusual en m/z 63 correspondiente al etanodiol protonado ($\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{OH}_2^+$). El ión en m/z 154 podría ser debido a $(\text{C}_9\text{H}_{19}-\text{CH}=\text{CH}_2)^+$ formado por la eliminación de un grupo éter de la estructura $\text{C}_{11}\text{H}_{23}$. Una disposición tipo McLafferty de esta parte daría $\text{C}_7\text{H}_{15}\text{CH}=\text{CH}_2^+$ en m/z 126. El ión en m/z 185 correspondería entonces a una pérdida de $-\text{CH}_2-\text{OH}$ de un peso molecular de 216 por partición α - β al éter. Por tanto, 2-undeciloxietan-1-ol (Fig. 3) fue considerada una estructura posible para el compuesto de los machos. Fue sintetizado a partir de 1-bromoundecano y etanodiol y se comprobó que tenía idéntico tiempo de retención GC (Tabla 1) y espectro de masas (Fig. 2c) que los del compuesto de los machos maduros de *M. galloprovincialis*. Las cantidades obtenidas de dicho compuesto durante la colección de los dos machos durante el periodo de luz fueron 0.4 μg /hora/macho y 1.3 μg /hora/macho.

- Se realizaron análisis electroantenográficos-cromatográficos (GO-EAG) para estudiar su actividad biológica y confirmar la identificación del compuesto de los machos. En los análisis GC-EAG de las colecciones de volátiles de machos y hembras de *M. galloprovincialis* se registró una respuesta EAG consistente en la antena de ambos, hembras (Fig. 4a) y machos al compuesto específico de los machos. El compuesto sintético 2-undeciloxi-1-etanol también produjo una respuesta EAG en la antena de machos y hembras (Fig. 4be). La respuesta de la antena de los machos pareció ser generalmente inferior a la de las hembras. Las respuestas absolutas de la antena por encima del control (blanco) a los 14 ng del compuesto específico natural fueron $0.83 \pm \text{S.E. } 0.32 \text{ mV}$ ($N = 3$) y $1.85 \pm \text{S.E. } 0.15 \text{ mV}$ ($N = 3$) en machos y hembras respectivamente, y las respuestas a 10 ng del compuesto sintético fueron $0.66 \pm \text{S.E. } 0.09 \text{ mV}$ ($N = 5$) y $1.51 \pm \text{S.E. } 0.15 \text{ mV}$ ($N = 9$) respectivamente. Estas diferencias con el blanco fueron significativas en un test t para los 14 ng del compuesto natural $P = 0.001$ y a para los 10 ng del sintético $P = 0.023$.

ES 2 334 763 A1

Para conocer si *M. galloprovincialis* era atraído al compuesto feromonal identificado en campo y demostrar así su función como feromona de la especie, y comparar además esta atracción con la atracción a combinaciones de caïromonas conocidas, se realizaron dos experimentos de campo, el primero durante 5 semanas (3 de julio a 7 de agosto) y el segundo durante 7 semanas (7 de agosto a 26 de septiembre) un monte de *Pinus halepensis* en Sierra Espuria (Murcia). En ambos se utilizó un diseño de bloques completos al azar con siete repeticiones (bloques). Los tratamientos, que estuvieron constituidos por combinaciones de las distintas sustancias atrayentes se dispusieron en trampas de embudos múltiples. Cada una de las sustancias ensayadas se emitió desde difusores independientes. El 2-undeciloxi-1-etanol se emitió desde dos tipos de difusores, un vial y un saqueto, de polietileno conteniendo 50 mgr cada uno. El α -Pino se emitió desde difusores de tubo de polietileno conteniendo 200 gr cada uno. El ipsenol, el ipsdienol y el metil-butenol se emitieron desde difusores comerciales de la casa Pherotech (Canada) conteniendo respectivamente cada uno 40 mgr, 40 mgr y 4000 mgr. Las tasas de emisión de todos estos difusores en condiciones controladas de laboratorio son las que se indican en la Tabla 2. Las combinaciones ensayadas como cebos en el experimento 1 fueron las siguientes:

- 1) la combinación caïromonal triple de ipsenol+metil-butenol+ α -pino,
- 2) 2-undeciloxi-1-etanol a baja emisión
- 3) 2-undeciloxi-1-etanol a alta emisión,
- 4) la combinación caïromonal triple + 2-undeciloxi-1-etanol a baja emisión y
- 5) la combinación caïromonal triple + 2-undeciloxi-1-etanol a alta emisión del ejemplo 1

Los difusores independientes que se describen en el ejemplo 1 son los utilizados en el experimento, en diferentes combinaciones.

En el experimento 2 las combinaciones ensayadas fueron:

- 1) la combinación caïromonal triple de ipsdienol+metil-butenol+ α -pino,
- 2) 2-undeciloxi-1-etanol a baja emisión
- 3) 2-undeciloxi-1-etanol a alta emisión
- 4) la combinación caïromonal doble de ipsdienol+metil-butenol + 2-undeciloxi-1-etanol a baja emisión y
- 5) la combinación caïromonal doble de ipsdienol+metil-butenol + 2-undeciloxi-1-etanol a alta emisión

Dentro de cada bloque, las trampas estuvieron separadas al menos 150 m y la menor distancia entre bloques fue de 500 m. Los recipientes colectores de las trampas fueron dotados con una pastilla insecticida DDVP para evitar que los insectos capturados escaparan. Todas las trampas fueron revisadas periódicamente cada 10 días y los insectos capturados fueron conservados para su posterior identificación y conteo. Se estudió la respuesta de cada sexo de *M. galloprovincialis* frente a cada una de las combinaciones atractivas ensayadas. Los datos para ambos sexos fueron previamente transformados con la función raíz cuadrada para cumplir las condiciones de normalidad y homocedasticidad y fueron sometidos a un análisis de la varianza ANOVA (GLM) para un diseño de bloques aleatorios con el programa informático SAS. Las medias fueron comparadas mediante test LSD de Fisher con un nivel de significación $\alpha=0,05$.

TABLA 2

Dosis de emisión de los compuestos utilizados en los dos experimentos de atracción de M. galloprovincialis en campo, estimados en laboratorio a ¹: 25°C, o a ²: 27°C

Compuesto	Ratio	
	enantiomérico (+:-	Tasa de emisión (mg/24h)
	)	
α -Pino	5-10:90-95	2859 ¹
Ipsenol	50:50	0,4 ¹
Ipsdienol	50:50	0,2 ¹
2-metil-but-3-en-1-ol	---	11 ¹

	2-undeciloxi-1-	---	0.16 ²
	etanol (baja)		
5	2-undeciloxi-1-	---	0.76 ²
	etanol (alta)		

El resultado de emisión indicado de 0.76 mg por día se obtiene por ejemplo en laboratorio a 27°C de temperatura y una velocidad de viento de 8 km/hora.

Los resultados de experimento 1, además de comprobar nuevamente el poder atractivo de la mezcla cairomonal de ipsenol, 2-metil-3-butenol y α -pineno descrita por Ibeas *et al.*(07), mostraron que las hembras, principalmente, y los machos de *M. galloprovincialis* fueron atraídos por 2-undeciloxi-1-etanol sintético, confirmando su papel como feromona en esta especie (Fig. 5). Los difusores de alta emisión capturaron tres veces más hembras que los de baja difusión. Comparando con el cebo cairomonal estándar, la feromona resultó menos atractiva a las dosis ensayadas.

Un resultado de la máxima importancia fue que se encontró un altísimo efecto sinérgico cuando ambos tipos de compuestos, la feromona y las cairomonas, fueron emitidos conjuntamente. El número de hembras atraídas por el cebo feromonal-cairomonal fue más de un 80% superior a la suma de las capturas de cada cebo, feromona y cairomonas, por separado, y en el caso de los machos el efecto sinérgico fue un 80-90% mayor. Aunque el número medio de capturas fue mayor con la combinación feromona (alta) + cairomona (73.6 insectos/trampa) que con feromona (baja) + cairomona (64.8 insectos/trampa), la diferencia entre ambas no fue significativa.

Los resultados del experimento segundo confirmaron lo obtenido en el experimento primero. La mezcla cairomonal triple, con el ipsenol sustituido por el ipsdienol fue atractiva, aunque obtuvo menores capturas (11,4 insectos/trampa) que las logradas en el experimento primero por la primera mezcla triple. Tanto la feromona en baja emisión como en alta resultaron atractivas a machos y hembras de *M. galloprovincialis*, en la emisión alta (13 insectos/trampa), significativamente más en las hembras que la mezcla cairomonal. Nuevamente, la combinación de la feromona con las cairomonas, en este caso con dos de los compuestos de escolítidos sólo, ipsdienol + metil-butenol, obtuvieron un potente efecto sinérgico logrando capturas de 31 insectos/trampa para la combinación con emisión baja de la feromona y 57,8 insectos/trampa, significativamente más, para la combinación con la feromona en emisión alta. Las capturas obtenidas por este último cebo no fueron sin embargo tan altas como las obtenidas durante menos tiempo por la combinación de la feromona en emisión alta + ipsenol, 2-metil-3-butenol y α -pineno testada en el experimento 1 (73.6 insectos/trampa), indicando que esta combinación podría ser superior, si bien los dos experimentos se realizaron en periodos distintos por lo que ambas combinaciones no se pueden comparar directamente.

Por lo tanto, 2-undeciloxi-1-etanol es producido por los machos sexualmente maduros de *M. galloprovincialis*, provoca respuestas electroantenográficas en la antena de ambos sexos y es atractivo en campo a machos y hembras de esta especie, con lo que se demuestra su papel como feromona agregativa de *M. galloprovincialis*. 2-undeciloxietanol es el primer caso en la subfamilia Lamiinae (Cerambycidae) de un compuesto feromonal sexo-específico con actividad de comportamiento significativa para ser utilizado en atraer y capturar a los individuos en campo. Pero no sólo 2-undeciloxi-1-etanol es una feromona atractiva, sino que sinergiza enormemente la atracción de esta especie a la mezcla de cairomonas conocidas, constituyendo ambos un cebo combinado de gran utilidad, que captura tanto machos como, muy importantemente, de hembras. Este altísimo poder atractivo llegó a obtener unas capturas de 2 insectos por trampa y día, en una población no epidémica del cerambícido. Este resultado es muy relevante para el control de esta plaga y de la enfermedad que transmite. Un cebo formado al menos por la combinación de 2-undeciloxi-1-etanol, ipsenol, y 2-metil-3-butenol podría ser utilizado con éxito en el manejo operativo de la enfermedad del marchitamiento de los pinos, a través del seguimiento y captura masiva de su insecto transmisor en trampas cebadas con el cebo atrayente de la invención.

Referencias

- IBEAS, F., GALLEGO, D., DIEZ, J. J., and PAJARES, J. A. 2007. An operative kairomonal lure for managing pine sawyer beetle *Monochamus galloprovincialis* (Coleoptera: Cerambycidae). *J. Appl. Entomol.* 131:13-20.
- PAJARES, J. A., IBEAS, F., DIEZ, J. J., and GALLEGO, D. 2004. Attractive responses by *Monochamus galloprovincialis* (Col., Cerambycidae) to host and bark beetle semiochemicals. *J. Appl. Entomol.* 128:633-638.
- IBEAS, F., DIEZ, J. J., and PAJARES, J. A. 2008. Olfactory sex attraction and mating behaviour in the pine sawyer *Monochamus galloprovincialis* (Coleoptera: Cerambycidae). *J. Insect Behav.* 21:101-110.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un cebo atrayente para capturar el insecto coleóptero perforador del pino, *Monochamus galloprovincialis* **caracterizado** porque comprende la feromona de *M. galloprovincialis* 2-undeciloxi-1-etanol y al menos dos cairomonas atractivas para esta especie.
2. Un cebo según la reivindicación 1, **caracterizado** porque 2-undeciloxi-1-etanol está presente en el cebo en una cantidad comprendida entre 10 mg y 1000 mg.
- 10 3. Un cebo según la reivindicación 1, **caracterizado** porque dichas cairomonas proceden del árbol hospedante del insecto o de escolítidos.
- 15 4. Un cebo según la reivindicación 3, **caracterizado** porque comprende al menos una cairomona procedente del árbol hospedante y al menos una cairomona procedente de escolítidos.
5. Un cebo según una de las reivindicaciones 3 ó 4, **caracterizado** porque las cairomonas del árbol están presentes en el cebo en una cantidad comprendida entre 1 g y 400 g, y las cairomonas de escolítidos están presentes cada una en el cebo en una cantidad comprendida entre 10 mg y 20 g.
- 20 6. Un cebo según una de las reivindicaciones 3 a 5, **caracterizado** porque dicha cairomona procedente del árbol es un monoterpeno.
7. Un cebo según la reivindicación 6, **caracterizado** porque dicho monoterpeno es α -pineno.
- 25 8. Un cebo según la reivindicación 7, **caracterizado** porque el α -pineno está presente en el cebo en una cantidad comprendida entre 1 g y 400 g.
9. Un cebo según la reivindicación 1 ó 3, **caracterizado** porque comprende dos cairomonas procedentes de escolítidos.
- 30 10. Un cebo según la reivindicación 3 o 9, **caracterizado** porque dichas cairomonas de escolítidos están seleccionadas entre ipsenol, 2-metil-3-butenol e ipsdienol.
- 35 11. Un cebo según la reivindicación 1, **caracterizado** porque comprende 2-undeciloxi-1-etanol, alfa-pineno, ipsenol y 2-metil-3-butenol.
12. Un cebo según la reivindicación 1, **caracterizado** porque comprende 2-undeciloxi-1-etanol, ipsenol y 2-metil-3-butenol.
- 40 13. Un cebo según una de las reivindicaciones 10 a 12, **caracterizado** porque el ipsenol está presente en el cebo en una cantidad comprendida entre 10 mg y 3000 mg.
14. Un cebo según la reivindicación 10, **caracterizado** porque el ipsdienol está presente en el cebo en una cantidad comprendida entre 10 mg y 3000 mg.
- 45 15. Un cebo según una de las reivindicaciones 10 a 12, **caracterizado** porque el 2-metil-3-butenol está presente en el cebo en una cantidad comprendida entre 100 mg y 20000 mg.
- 50 16. Un cebo según la reivindicación 12, **caracterizado** porque comprende:
 - 2-undeciloxi-1-etanol en una cantidad comprendida entre 10 mg y 1000 mg
 - ipsenol en una cantidad comprendida entre 10 mg y 3000 mg y
 - 55 - 2-metil-3-butenol en una cantidad comprendida entre 100 mg y 20000 mg.
17. Un cebo según la reivindicación 11, **caracterizado** porque comprende:
 - 60 - 2-undeciloxi-1-etanol en una cantidad comprendida entre 10 mg y 1000 mg
 - α -pineno en una cantidad comprendida entre 1 g y 400 g,
 - 65 - ipsenol en una cantidad comprendida entre 10 mg y 3000 mg,
 - 2-metil-3-butenol en una cantidad comprendida entre 100 mg y 20000 mg.

ES 2 334 763 A1

18. Un cebo según la reivindicación 1 **caracterizado** porque la feromona y cada una de las cairomonas están presentes en el cebo en el mismo difusor o en difusores independientes.

5 19. Una trampa **caracterizada** porque comprende el cebo definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18.

20. Uso combinado de la feromona de *M. galloprovincialis* 2-undeciloxi-1-etanol con al menos dos cairomonas atractivas para esta especie en la preparación de un cebo para capturar el insecto *M. galloprovincialis*.

10

15

20

25

30

35

40

45

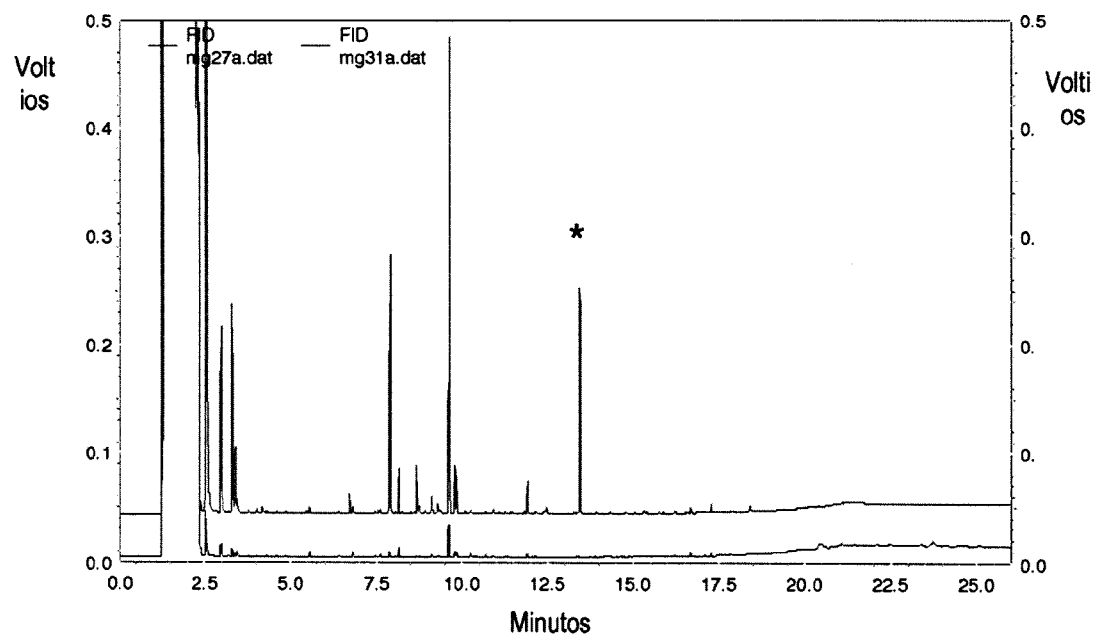
50

55

60

65

(a)



(b)

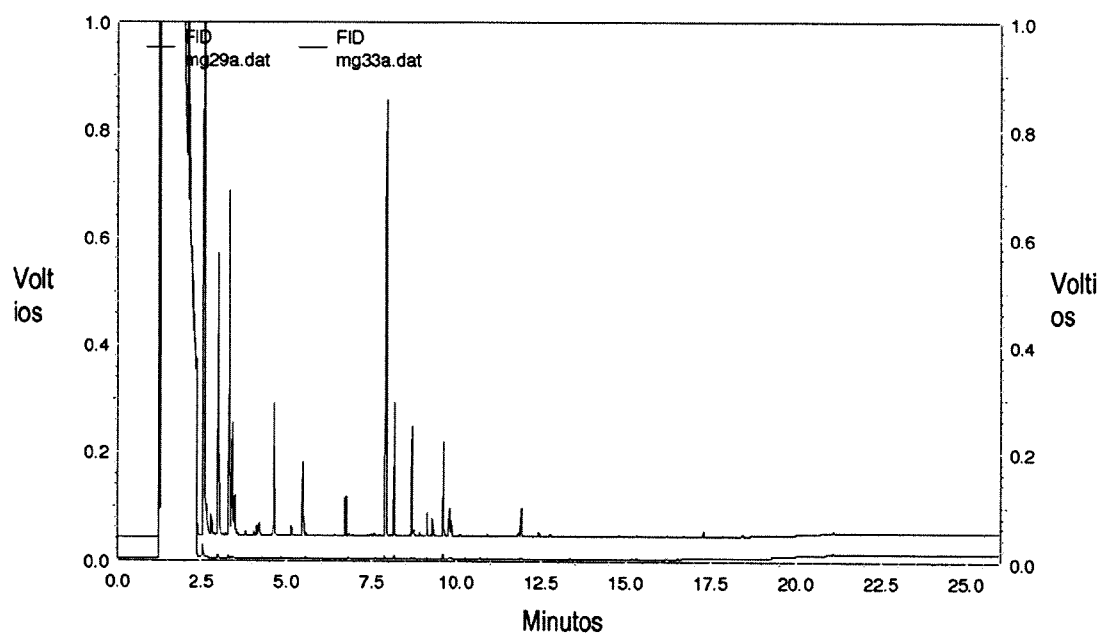


Figura 1

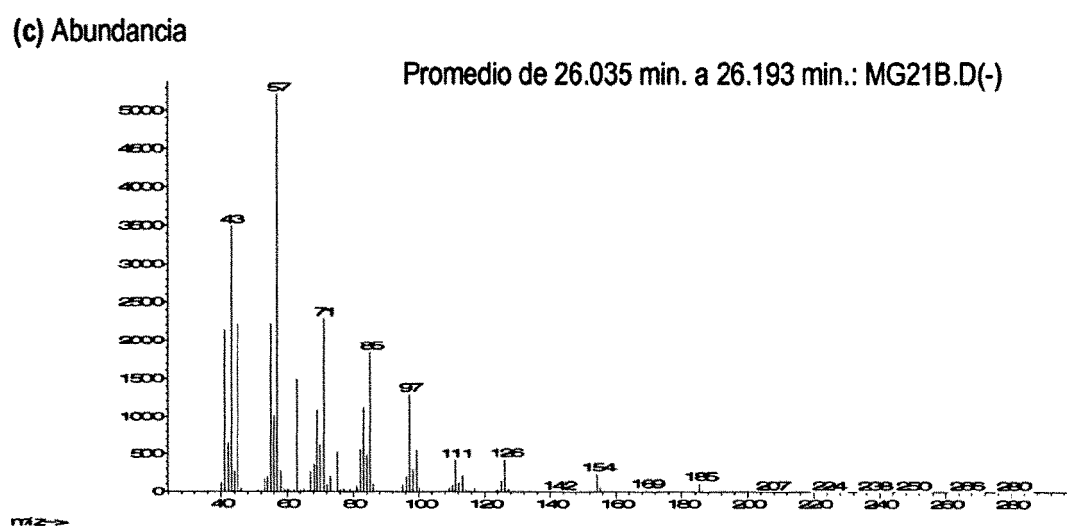
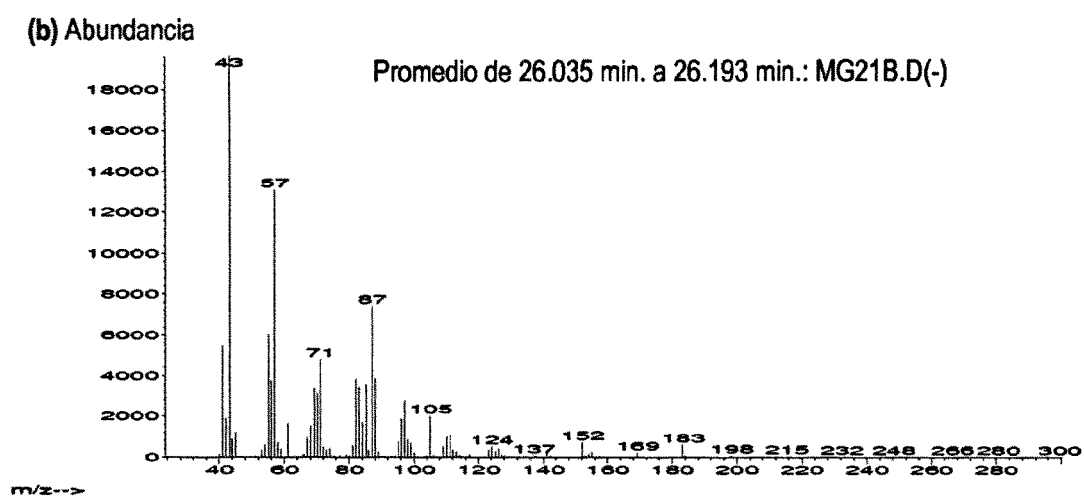
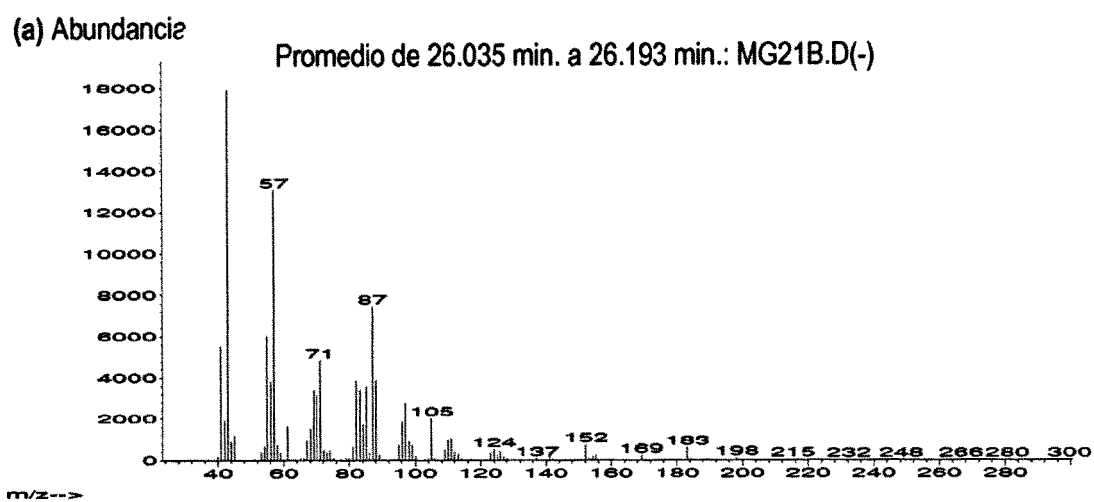


Figura 2

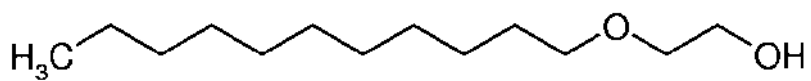
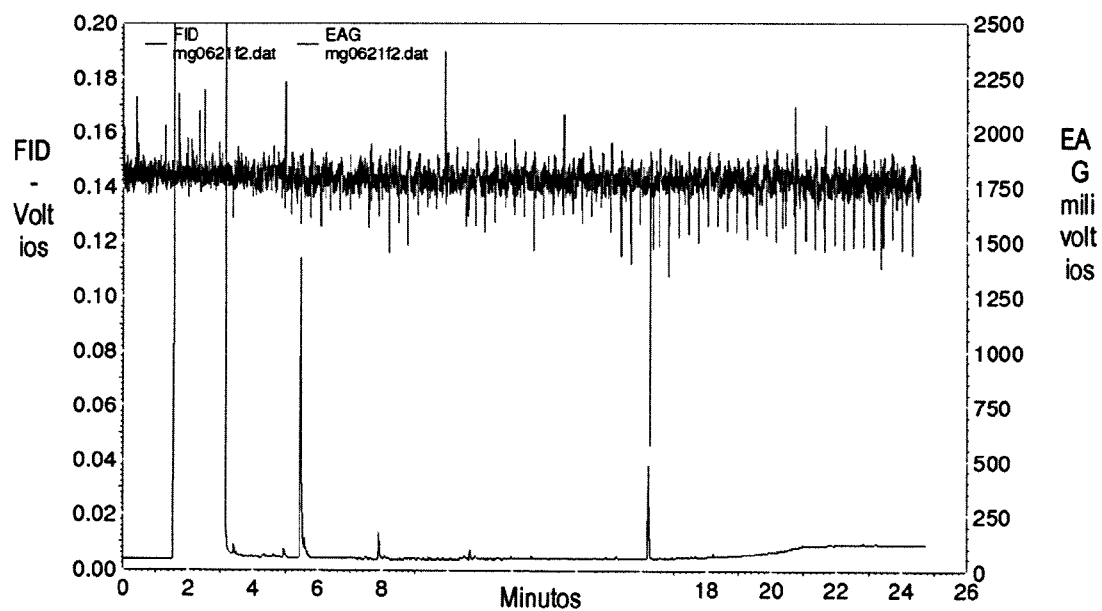


Figura 3

(a)



(b)

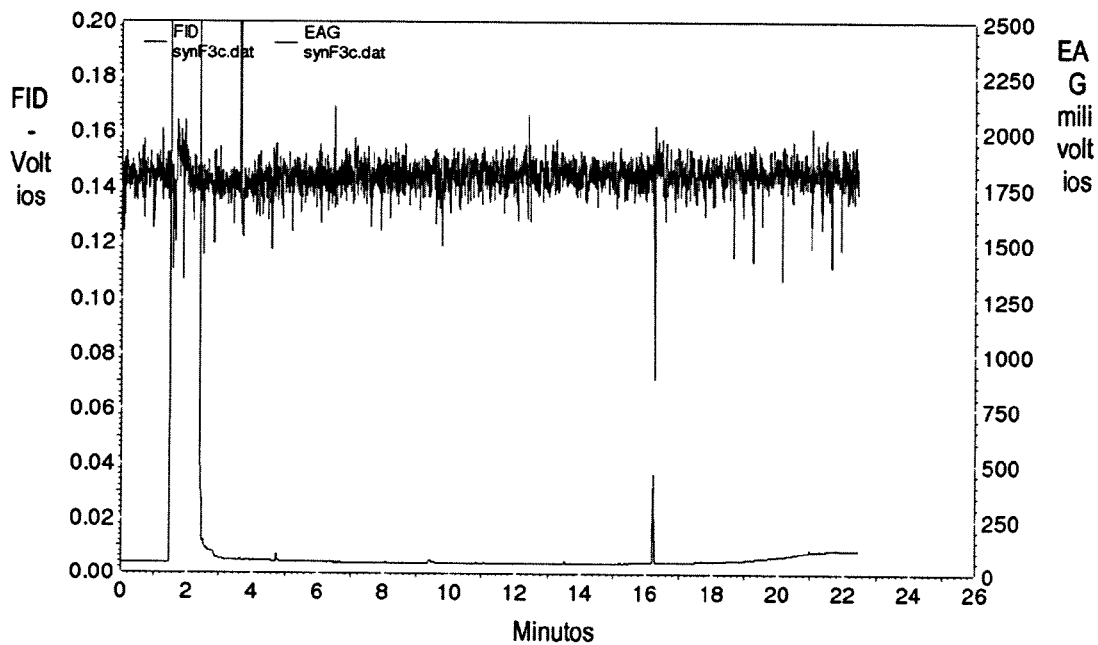


Figura 4

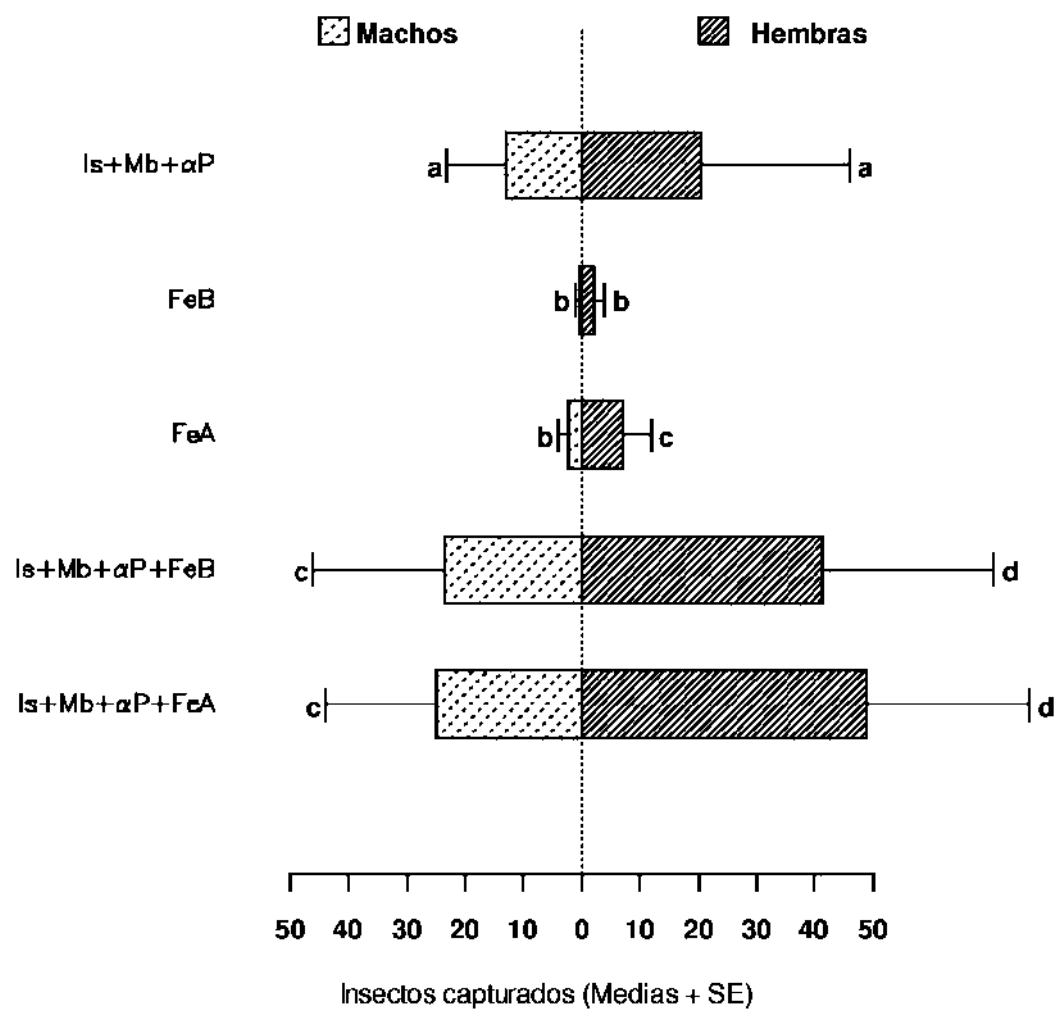


Figura 5

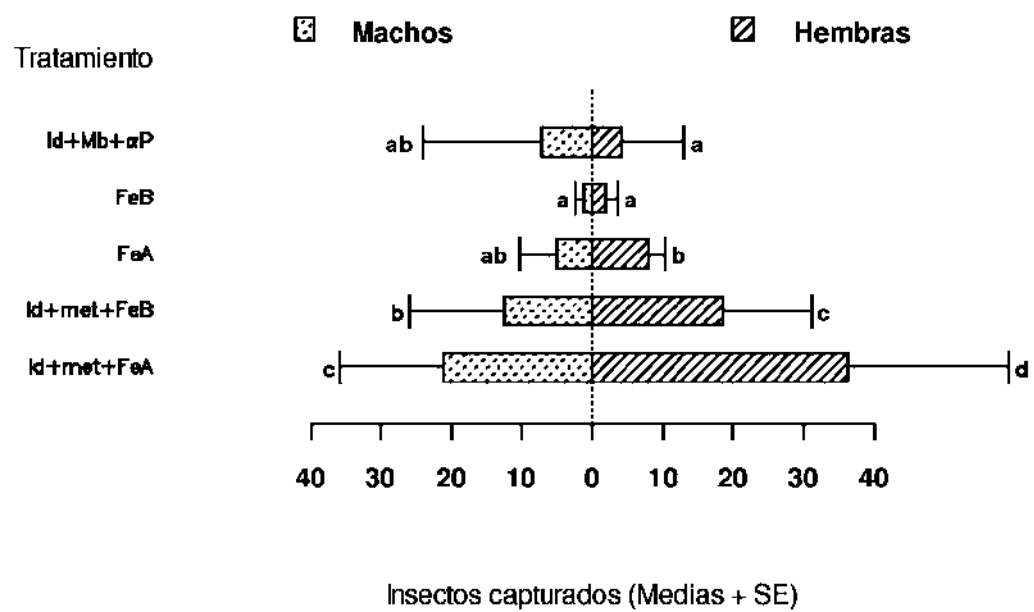


Figura 6



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ ES 2 334 763

⑫ Nº de solicitud: 200930883

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 21.10.2009

⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ Int. Cl.: A01N 31/02 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑯ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	IBEAS, F. et al. Female recognition and sexual dimorphism of cuticular hydrocarbons in <i>Monochamus galloprovincialis</i> (Coleoptera: Cerambycidae): Behavior, 2009, vol 102 (2), páginas 318-325.	1-20
A	IBEAS, F. et al. Olfactory sex attraction and mating behaviour in the pine sawyer <i>Monochamus galloprovincialis</i> (Coleoptera: Cerambycidae) J. Insect. Behav., 2008, vol. 21, páginas 101-110.	1
A	IBEAS; F. et al. An operative kairomonal lure for managing pine sawyer beetle <i>Monochamus galloprovincialis</i> (Coleoptera: Cerymbycidae) J. Appl. Entomol., 2007, vol. 131, páginas 13-20.	1-20
A	FRANCARDI, V. et al. Pine volatiles and terpenoid compounds attractive to European xylophagus species, vectors of <i>Bursaphelenchus</i> spp. nematodes. Phytoparasitica, 2009, vol. 37, páginas 295-302.	1-20

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

12.02.2010

Examinador

A. Polo Díez

Página

1/4

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, BIOSIS, HCAPLUS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 12.02.2010

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	1-20	SÍ
	Reivindicaciones		NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	1-20	SÍ
	Reivindicaciones		NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión:

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

1. Documentos considerados:

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	Ibeas et al.	2009
D02	Ibeas et al.	2008
D03	Ibeas et al.	2006
D04	Francardi et al.	2009

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

Novedad y actividad inventiva (art. 6 y 8 de la L.P)

La invención se refiere a un cebo para atraer al insecto coleóptero *Monochamus galloprovincialis* que comprende 2-undeciloxi-1-etanol, una feromona de este insecto y al menos, dos cairomonas atractivas para esta especie (reivindicación 1). El resto de las reivindicaciones dependientes (2-19) detallan el cairomonas, así como las cantidades de cada uno de los compuestos. La reivindicación 20 se refiere al uso de 2-undeciloxi-1-etanol y al menos dos cairomonas atractivas para este insecto en la preparación de un cebo para capturar al insecto.

Los documentos D1 y D2 tratan del comportamiento sexual del insecto *Monochamus galloprovincialis*, tratando de determinar que compuestos están relacionados con el reconocimiento y la atracción sexual de este insecto. En el documento D1 se llegan a extraer compuestos de la cutícula de hembras y machos, en su mayoría hidrocarburos, y se comprueba su capacidad como atrayentes. Sin embargo, en este artículo no se llega a separar un sólo compuesto ni a determinar su composición ni su utilidad como cebo.

En los documentos D3 y D4 se estudian diversas mezclas de cairomonas para su utilización como cebos de *Monochamus galloprovincialis* y de otros coleopteros perforadores de los pinos.

Se considera que ninguno de los documentos del estado de la técnica anterior a la solicitud citados en el Informe sobre el Estado de la Técnica, tomados solos o en combinación revelan la invención definida en las reivindicaciones 1-20. Además, en los documentos citados no hay sugerencias que dirijan al experto en la materia hacia la invención definida en las mismas. Así, la invención contenida en las reivindicaciones 1-20 se considera que es nueva e implica actividad inventiva (artículos 6 y 8 de la Ley de Patentes).