

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 681 528**

21 Número de solicitud: 201830269

51 Int. Cl.:

A01N 63/04 (2006.01)

C12N 1/14 (2006.01)

C12R 1/885 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

20.03.2018

43 Fecha de publicación de la solicitud:

13.09.2018

71 Solicitantes:

UNIVERSIDAD DE LEÓN (100.0%)

Av. de La Facultad 25

24071 LEÓN ES

72 Inventor/es:

CASQUERO LUELMO, Pedro Antonio;

RODRÍGUEZ GONZÁLEZ, Álvaro;

CAMPELO RODRÍGUEZ, María Piedad;

LORENZANA DE LA VARGA, Alicia;

MAYO PRIETO, Sara;

CARRO HUERGA, Guzmán y

GUTIÉRREZ MARTÍN, Santiago

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

54 Título: **COMPOSICIÓN FITOSANITARIA QUE COMPRENDE CEPAS DE TRICHODERMA PARA SU USO EN EL TRATAMIENTO Y/O PREVENCIÓN DE INSECTOS PLAGA DE ALMACÉN**

57 Resumen:

Composición fitosanitaria que comprende cepas de *Trichoderma* para su uso en el tratamiento y/o prevención de infecciones provocadas por microorganismos fitopatógenos. La invención se refiere a dos nuevas cepas de hongos pertenecientes a la especie *Trichoderma*, específicamente *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma citrinoviride* capaces de inhibir el crecimiento de microorganismos fitopatógenos. Por ello, se propone su uso para la prevención y/o tratamiento de infecciones en plantas, específicamente la alubia (*Phaseolus vulgaris*), provocadas por microorganismos fitopatógenos, preferiblemente por insectos plaga de almacén, concretamente *Acanthoscelides oblectus*.

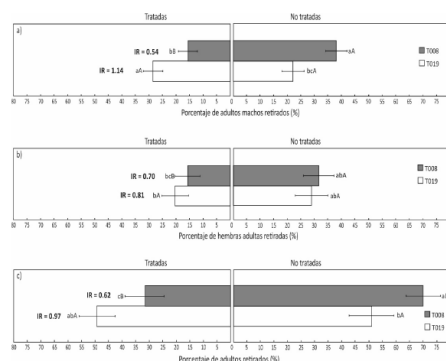


Figura 1

ES 2 681 528 A1

DESCRIPCIÓN

COMPOSICIÓN FITOSANITARIA QUE COMPRENDE CEPAS DE *TRICHODERMA* PARA SU USO EN EL TRATAMIENTO Y/O PREVENCIÓN DE INSECTOS PLAGA DE ALMACÉN

5

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se encuadra en el sector técnico de la microbiología agrícola, más concretamente en el relativo a la aplicación de microorganismos en los cultivos agrícolas para el control de plagas y/o enfermedades.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

El uso de insecticidas en agricultura, a pesar del elevado coste y de las consecuencias negativas que produce al medio ambiente, aún es la forma más habitual para el control de los insectos y plagas en los cultivos, sobre todo en los países menos desarrollados.

15

Uno de los órdenes de insectos que más daños causan en productos agrícolas almacenados es el *Coleoptera*. El insecto *Acanthoscelides obtectus* (*A. obtectus*) pertenece a dicho orden y es una plaga que afecta a la alubia *Phaseolus vulgaris* L. Esta plaga comienza el ataque en campo y continúa en almacén, causando grandes pérdidas económicas ya que deprecia el producto al alimentarse de las semillas. Las larvas se alimentan de la semilla, siendo sólo observable el daño cuando practica el orificio de salida del adulto. En post-cosecha sus daños son más importantes si cabe que en campo, al deteriorar el grano ya almacenado reduciendo su peso.

20

25

Hasta el momento, la forma de controlar a *A. obtectus* en almacén es mediante la aplicación de insecticidas de síntesis química como fosfinas, piretroides y organofosforados. Un ejemplo es la patente CN105494382, la cual se refiere en particular a un pesticida para la prevención y el control de *A. obtectus*. El plaguicida contiene: 19-hidroxiandrost-4-eno-3,17-diona, 3,7-dimetil-1,6-octadien-3-ol, (E, E) -3,7-dimetil- 2,6-octadien-1-ol-2-metil-2-butenoato, 17b-hidroxil-17a-metil-1,4-androstadien-3-ona y 4-metil-1- (1-metiletil) -3- ciclohexeno-1-ol.

30

Otras formulaciones conocidas se encuentran en la patente CN105494381, en la que se describe un pesticida para la prevención y el control de *Callosobruchus caculatus*, aunque también se observó un buen rendimiento para *A. obtectus*. El pesticida contiene: 11b-

35

hydroxyandrost-4-eno-3,17-dione, 2,2-bis (aliloximetil) butan-1-ol, 1,6-hexanodiol dimetacrilato, 18-methylestra-2,5 (10) -dien-3b-metoxi-17-ona y dimetacrilato de etilenglicol.

5 Sin embargo, estos tratamientos pueden causar problemas como el desarrollo de resistencias, daños al ecosistema y toxicidad a seres humanos y animales. Por lo tanto, la necesidad de alternativas al control químico para suprimir esa plaga y la creciente demanda de la sociedad por métodos menos perjudiciales para el medio ambiente, justifican la búsqueda de otros métodos como el control biológico, incluido el uso de insecticidas vegetales, hongos y variedades resistentes. Estos métodos juegan un papel crítico en la viabilidad cualitativa y
10 cuantitativa de una agricultura ecológica y sostenible.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a una composición fitosanitaria que comprende dos nuevas
15 cepas de hongos pertenecientes a la especie *Trichoderma*, específicamente a *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma citrinoviride* capaces de inhibir el crecimiento de otros microorganismos fitopatógenos. Específicamente, se propone su uso para la prevención y/o tratamiento de infecciones de plantas provocadas por microorganismos fitopatógenos, preferiblemente por insectos plaga de almacén, concretamente *Acanthoscelides obtectus*,
20 agente causante de daños en alubias.

Una de las cepas que incluye la composición es la cepa T019 de *Trichoderma harzianum*, la cual fue depositada el 07 de Febrero de 2018, en la Colección Española de Cultivos Tipo (Universidad de Valencia, 56100 Burjassot, Valencia, España) con CECT N° 21099 según el
25 Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos para Fines del Procedimiento de Patente.

La otra cepa es la T008 de *Trichoderma citrinoviride*, la cual fue depositada el 07 de Febrero de 2018, en la Colección Española de Cultivos Tipo (Universidad de Valencia, 56100
30 Burjassot, Valencia, España) con CECT N° 21098 según el Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos para Fines del Procedimiento de Patente

En un primer aspecto de la invención, la composición fitosanitaria comprende una de las cepas
35 de *Trichoderma* anteriormente citadas, preferiblemente en estado esporulado, o productos del metabolismo de las cepas o una combinación de las cepas con sus productos, es decir, los

productos del metabolismo de la cepa de la invención pueden ser aislados y aplicados, solos o en combinación con dicha cepa, directamente sobre la planta afectada o bien sobre la semilla.

5 En otro aspecto, la composición puede incluir adicionalmente un aditivo, un emulsionante, un nutriente para las plantas, un agente de humectación, un micronutriente para las plantas o un sustrato. Específicamente, el sustrato puede ser un medio de cultivo nutritivo, un abono, un vegetal o una parte del mismo, turba u otro sustrato, madera o un trozo de la misma, arcilla o cortezas.

10

Dadas las propiedades de esta composición, en la presente invención se contempla su uso para el control biológico de plagas y adicionalmente potenciar la estimulación de las raíces, germinación, crecimiento y/o producción de cultivos hortícolas o plantas, específicamente, la planta es la alubia (*Phaseolus vulgaris*).

15

En un aspecto de la invención, se propone el uso de la composición para la prevención y/o tratamiento de infecciones de plantas provocadas por microorganismos fitopatógenos, preferiblemente por insectos plaga de almacén, concretamente *Acanthoscelides obtectus*, agente causante de daños en alubias (*Phaseolus vulgaris*). Estas plagas atacan los cultivos durante el desarrollo de la planta o durante su almacenamiento.

20

Los insectos empiezan su ataque en el campo y continúan en los almacenes, haciendo orificios, impidiendo su comercialización para alimentación o propagación. Un manejo inadecuado en post-cosecha durante el almacenamiento, puede afectar la calidad de las semillas y tener grandes pérdidas debido al ataque de insectos.

25

El término "tratamiento", tal como se entiende en la presente invención, se refiere a combatir los efectos provocados como consecuencia de una infección causada por microorganismos fitopatógenos, preferiblemente por insectos plaga de almacén, más preferiblemente por *Acanthoscelides obtectus*. Este término incluye:

30

- (i) inhibir la infección, es decir, detener su desarrollo;
- (ii) aliviar los efectos provocados por la infección, es decir, causar su regresión;
- (iii) estabilizar los efectos provocados por la infección.

35 El término "prevención", tal como se entiende en la presente invención, consiste en evitar la aparición de daños cuya causa sean las infecciones provocadas por microorganismos,

preferiblemente por insectos plaga de almacén, más preferiblemente por *Acanthoscelides obtectus*.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

5

Figura 1. Porcentaje de adultos retirados de cada tratamiento a) Hembras; b) Machos; c) Total de adultos. IR: índice de repelencia (IR>1 atracción; IR<1 repelencia). Como conclusión general de los datos obtenidos, cuando se trataron las alubias con las cepas de *T. harzianum* T019 y *T. citrinoviride* T008 se redujo el número de adultos que llegaban a ellas respecto a las semillas que no fueron tratadas.

10

DESCRIPCIÓN DE MODOS DE REALIZACIÓN

Los ejemplos que siguen a continuación ilustran la presente invención, pero no deben ser considerados como limitaciones a los aspectos esenciales del objeto de la misma, tal como han sido expuestos en los apartados anteriores de esta descripción.

15

Ejemplo 1: Identificación de las cepas de *T. harzianum* T019 y *T. citrinoviride* T008.

Las cepas *Trichoderma harzianum* T019 y *Trichoderma citrinoviride* T008 según la invención fueron identificadas por medio de la observación microscópica de la morfología y mediante identificación molecular de las cepas.

20

Para la determinación microscópica se realizaron replicas en la campana de flujo laminar de las colonias morfológicamente diferentes presentes en las placas y, transcurridos de 12 a 15 días, se procedió a la obtención de un cultivo monoconidial. Para ello, adaptando el método de dilución descrito por Echandi (1971) se preparó la suspensión de un fragmento de micelio del hongo en un mililitro de agua estéril y, a partir de ella, se realizaron diluciones seriadas hasta la cuarta potencia; se sembraron en medio patata-dextrosa-agar (PDA) y se mantuvieron durante 7 días para su determinación, desarrollo y posterior conservación.

25

El cultivo puro se incubó bajo las mismas condiciones que las requeridas para su obtención y la identificación de los distintos géneros de hongos se llevó a cabo mediante caracteres morfométricos siguiendo las obras de Barnett y Hunter (1998) y Von Arx (1981). Para ello, se observó bajo microscopio óptico tanto la placa directamente como las preparaciones, teñidas con azul de lactofenol (Waller et al., 1998), que se fueron obteniendo de cada aislamiento.

30

Cuando fue necesario, se tomaron fotografías y dimensiones de las estructuras mediante el empleo de equipos fotográficos digitales.

Para la identificación molecular se amplificó mediante PCR las regiones adyacentes al gen que codifica el rRNA 5,8S con los cebadores ITS1 e ITS4 (White y col., 1990). Mezcla de PCR:

5 100 ng de DNA, 1X de tampón con Cl₂Mg (Biotools), 15 pmoles de cada oligonucleótido iniciador, 100 μM de una mezcla de dNTPs y 2,5U de Taq polimerasa (Biotools). La reacción se incubó en el termociclador 5 min a 94°C, posteriormente se programaron 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 55°C y 2 min a 72°C; y una extensión final de 7 min a 72°C. Las bandas de aproximadamente 600 pb se cortaron de un gel de agarosa al 0,8%. Se purificaron con el

10 kit “*Nucleospin Extract II*” (Macherey-Nagel) y se cuantificaron en agarosa al 1%. Los productos de PCR se secuenciaron en ambas direcciones con los cebadores ITS1 e ITS4. La mezcla de secuenciación fue de 100 ng de PCR y 3 pmoles de cebador en un volumen de reacción de 8 μl. Para la identificación de cada cepa se introdujo la secuencia en la base de datos de NCBI Genbank (National Center for Biotechnology Information,

15 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) usando el BLAST program (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

Como conclusión, dichas cepas de hongo se ubican así en la taxonomía de los microorganismos:

- Reino: *Fungi*
- Subreino: *Dikarya*
- 20 ○ División: *Ascomycota*
- Subdivisión: *Pezizomycotina*
 - Clase: *Sordariomycetes*
 - Subclase: *Hypocreomycetidae*
 - Orden: *Hypocreales*
 - 25 ○ Familia: *Hypocreaceae*
 - Género: *Trichoderma* Persoon, Fries
 - Especies: *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma citrinoviride*

30 Se realizaron varios estudios a fin de evaluar la eficacia de los hongos contra plagas de almacén.

La población de adultos original de *A. obtectus* fue recolectada en distintos almacenes de semillas de alubia. Se mantuvieron en frascos de vidrio (150 mm de diámetro y 250 mm de altura) cubiertos con una malla transpirable pero que impedía la salida de los insectos. Se mantuvieron en cámaras de cultivo con temperatura controlada a 24 ± 1 °C y una humedad relativa del 60 %, con un fotoperiodo de 16 h de luz (1000 lux) y 8 h de oscuridad. Se empleó una población *A. obtectus* de entre 1-3 días de vida para la realización de los ensayos.

Las cepas de *T. harzianum* T019 y *T. citrinoviride* T008 se crecieron en placas Petri de 90 mm de diámetro en medio patata-dextrosa-agar (PDA) (Sigma-Aldrich) durante 7 días a 24 ± 1 °C, con un fotoperiodo de 16 h de luz (1000 lux) y 8 h de oscuridad. Para la obtención de la solución de esporas, se añadieron 10 ml de agua destilada esterilizada en autoclave sobre la superficie del micelio, se raspó y se filtró. Posteriormente con la ayuda de un contador de Neubauer se realizó el conteo y se preparó una solución de esporas de cada cepa a una concentración final de 1×10^7 esporas/ml.

Ejemplo 2: Efecto tóxico de las cepas de *T. harzianum* T019 y *T. citrinoviride* T008 hacia adultos de *A. obtectus*.

Para la aplicación de la solución de esporas se empleó una Torre Potter (Burkard Scientific Limited, PO Box 55 Uxbridge, Middx UB8 2RT, Reino Unido) con una presión de 49 kPa, 1 ml de la solución de esporas (1×10^7 esporas/ml) de cada cepa de *Trichoderma* se aplicó directamente en placas Petri, donde antes se había colocado un papel de filtro estéril (90 mm de diámetro) y humedecido con 1 ml de agua destilada esterilizada en autoclave. 1 h tras la aplicación de los tratamientos se colocaron 20 adultos de *A. obtectus* en cada placa Petri. Se hicieron 5 repeticiones por cada tratamiento. Las placas Petri se sellaron con dos capas de Parafilm® y se incubaron en cámara de cultivo con temperatura controlada a 24 ± 1 °C y una humedad relativa del 60 %, con un fotoperiodo de 16 h de luz (1000 lux) y 8 h de oscuridad. Diariamente se realizó un conteo durante un periodo de 15 días.

Se realizó un análisis estadístico de los tratamientos completamente aleatorizado mediante una ANOVA con una comparación de medias ($p < 0,05$) mediante una Diferencia Mínima Significativa (DMS). La mortalidad fue corregida con la fórmula de Abbott (Abbott, 1925). Los resultados se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1: Efecto tóxico de las cepas de *Trichoderma* observado frente a adultos de *A. obtectus* expuestos durante 15 días..

Mortalidad de adultos de <i>A. obtectus</i> (%)			
Día	Control	Cepas de <i>Trichoderma</i>	
		<i>T. citrinoviride</i> T008	<i>T. harzianum</i> T019
1	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
2	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
3	0,0±0,0	0,0±0,0	1,0±1,0
4	0,0±0,0	0,0±0,0	5,0±1,5
5	0,0±0,0	5,0±1,5	7,0±2,0
6	1,0± 1,0	12,1±3,0	10,0±2,2
7	3,0±1,2	13,4±3,0	14,3±2,9
8	6,0±2,4	12,5±4,2	16,8±1,6
9	12,0±3,0	14,5±3,6	14,3±3,4
10	13,0±2,5	14,8±2,8	14,5±3,8
11	16,0±1,8	23,9±3,5	31,1±5,3
12	16,0±1,8	26,1±3,9	42,5±3,3
13	16,0±1,8	27,4±3,5	48,6±4,0
14	16,0±1,8	33,3±1,4	53,4±4,8
15	16,0±1,8	46,2±4,9	60,3±7,1

Se concluye que la mortalidad de los adultos de *A. obtectus* en la cepa de *T. citrinoviride* T008 fue de 46,2 % y de la cepa *T. harzianum* T019 fue de 60,3 %, mientras que en el control fue de sólo un 16 %.

Ejemplo 3: Repelencia y/o atracción hacia adultos de *A. obtectus* de las cepas de *T. harzianum* T019 y *T. citrinoviride* T008

El experimento de repelencia fue llevado a cabo en una estructura descrita por Fouad et al., 2012, formada por cuatro envases plásticos (A, B, C y D) (40 mm de diámetro y 70 mm de altura) con un envase central de plástico (E) (120 mm diámetro y 60 mm de altura) conectado a los otros cuatro (A, B, C y D) por tubos cilíndricos plásticos (70 mm de longitud y 7 mm de diámetro).

15

Los envases B y D fueron colocados en diagonal y llenados con 40 semillas de alubia, (*P. vulgaris*), tratadas con una de las cepas de *Trichoderma* para cada tratamiento (se pulverizó mediante Torre Potter 1 ml de suspensión de esporas (1×10^7 esporas/ml) sobre las semillas. Los envases A y C (controles) se llenaron con 40 semillas de alubia (*P. vulgaris*), sin tratar.

5

En el envase central (E) se colocaron 20 adultos de *A. obtectus* (10 machos y 10 hembras). Transcurridas 24 h, se contó el número de individuos que había en cada envase. Se realizaron 4 repeticiones de cada tratamiento.

10 El índice de repelencia (IR) fue calculado siguiendo la fórmula propuesta por Mazzonetto y Vendraim (2003):

$$IR = \frac{2 * T}{T + C} * 100$$

donde IR es índice de repelencia; C es el número de insectos en los envases con las alubias no tratadas; T es el número de insectos en los envases con las alubias tratadas con las cepas
15 *T. harzianum* T019 y *T. citrinoviride* T008. Los valores de IR pueden variar entre 0 y 2, siendo 1 para una actividad neutral, IR>1 atracción e IR<1 repelencia.

Tras 24 h, una vez que los adultos decidieron su localización (envase A, B, C o D) fueron transferidos a placas Petri para controlar los efectos de cada cepa de *Trichoderma* en el
20 desarrollo biológico de *A. obtectus*. Fueron monitorizados durante 15 días y anotada la mortalidad para cada tratamiento para cada día. Una vez que el adulto murió, se identificó si era macho o hembra. Los resultados aparecen en la Figura 1.

Las alubias tratadas con T019 fueron más atractivas (IR = 1,14) para los machos, retirando
25 un 28,1 % de éstos. En el caso de T008 se retiraron un 15,7 % de machos y mostró un IR de 0,54. En el caso de las hembras, se observó un IR de 0,70 para T008 y de 0,81 para T019. En el caso del total de individuos retirados de alubias tratadas con las cepas, ambos *Trichoderma* presentaron repelencia, retirando un total de 31,3 % en T008 y de 44,9 % en T019. Es decir, cuando se trataron las alubias con las cepas de *T. harzianum* T019 y *T.*
30 *citrinoviride* T008 se redujo significativamente el número de adultos que llegaban a ellas respecto a las semillas que no fueron tratadas.

Ejemplo 4: Efecto de las cepas *T. harzianum* T019 y *T. citrinoviride* T008 en el desarrollo biológico de *A. obtectus*.

Los adultos de *A. obtectus* en contacto con las semillas de alubia (*P. vulgaris*), y su población resultante (huevos, larvas, adultos emergidos) así como las semillas que se emplearon en el experimento 2, se usaron para estimar los efectos de las cepas *T. harzianum* T019 y *T. citrinoviride* T008 en su desarrollo. Se mantuvieron en las mismas condiciones de desarrollo previamente descritas.

Se emplearon placas Petri con 40 semillas de cada tratamiento con los adultos de *A. obtectus* que habían estado en contacto con ellas y que habían depositado huevos, desarrollado larvas y posteriormente emergieron nuevamente adultos tras 45 días.

La mortalidad de los adultos de *A. obtectus* se contabilizó diariamente durante 45 días, así como el número total de adultos obtenidos en la primera generación y el peso de las alubias de cada unidad experimental. La progenie de adultos obtenidos también fue anotada cada día.

Además, se evaluaron los daños ocasionados por *A. obtectus* en las semillas de alubia que habían sido tratadas o no en el experimento 2. Para ello se pesaron las alubias tras los 45 días en contacto con *A. obtectus*, se contaron el número de orificios que había en cada alubia y el número de adultos emergidos por cada una de ellas. También se evaluó el número de adultos muertos que presentaban *Trichoderma*, para ello se sembraron los insectos muertos en placas Petri con medio PDA durante 5 días y se observó el número de ellos en los cuales se desarrollaba *Trichoderma*.

Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 2 y la Tabla 3.

Tabla 2: Pérdida de peso de la semilla de alubia, número de alubias dañadas así como el número de orificios en las alubias tratadas y no tratadas con *T. harzianum* T019 y *T. citrinoviride* T008.

		<i>T. citrinoviride</i> T008	<i>T. harzianum</i> T019
Pérdida peso semilla alubia (%)	Tratado	1,03±0,23	0,70±0,20
	No tratado	1,81±0,40	1,49±0,43
Semillas alubia dañadas	Tratado	4,75±1,92	3,75±1,17
	No tratado	11,50±1,12	10,00±1,85
	Tratado	1,31±0,77	1,64±0,97

Orificios por semilla de alubia	No tratado	3,11±0,51	2,43±1,11
---------------------------------	------------	-----------	-----------

En la tabla 2 se observa que aquellas alubias que fueron tratadas con las cepas *T. harzianum* T019 y *T. citrinoviride* T008 sufrieron una menor pérdida de peso, se redujo el número de semillas dañadas, así como el número de orificios respecto a las semillas no tratadas.

5

Tabla 3: Número de adultos de *A. obtectus* muertos sembrados en placas Petri con medio de cultivo Rosa de Bengala-Cloranfenicol-Agar que mostraron crecimiento de *T. harzianum* T019 y *T. citrinoviride* T008 con semillas de alubias tratadas y no tratadas.

		<i>T. citrinoviride</i> T008	<i>T. harzianum</i> T019
Alubias Tratadas	Adultos muertos	14	22
	Presencia de <i>Trichoderma</i> en adultos muertos (%)	75,00±16,36	83,33±12,59
Alubias No Tratadas	Adultos muertos	25	17
	Presencia de <i>Trichoderma</i> en adultos muertos (%)	0,00±0,00	0,00±0,00

10

En la tabla 3, se puede ver los adultos que fueron recogidos de los experimentos y se sembraron en placas Petri con medio de cultivo Rosa de Bengala-Cloranfenicol-Agar. En el caso de aquellos que habían estado en contacto con alubias tratadas con *T. harzianum* T019 o *T. citrinoviride* T008 en un porcentaje muy alto se desarrollaron estas cepas y en las que no

15

estaban tratadas no hubo presencia de *Trichoderma*.

REIVINDICACIONES

1. Composición fitosanitaria que comprende:
 - a) una cepa de *Trichoderma citrinoviride* T-008 depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con el número de depósito 21098 o una cepa de *Trichoderma harzianum* T-019 depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con el número de depósito 21099; o
 - b) productos del metabolismo de las cepas de (a);
o una combinación de (a) y (b).
2. Composición según la reivindicación 1, caracterizada por que cualquiera de las cepas de *Trichoderma* se encuentran en estado esporulado.
3. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, caracterizada porque incluye un aditivo, un emulsionante, un nutriente para las plantas, un agente de humectación, un micronutriente para las plantas o un sustrato.
4. Composición según la reivindicación 3, caracterizada por que el sustrato se selecciona del grupo que comprende un medio de cultivo nutritivo un abono, un vegetal o una parte del mismo, turba u otro sustrato, madera o un trozo de la misma, arcilla o cortezas.
5. Uso de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para la prevención y/o tratamiento de infecciones provocadas por insectos plaga de almacén.
6. Uso de la composición según la reivindicación 5, donde el insecto plaga pertenece al género *Acanthoscelides*.
7. Uso de la composición según la reivindicación 6, donde el insecto plaga es *Acanthoscelides obtectus*.
8. Uso de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 6 o 7, donde la planta afectada por insectos plaga de almacén es la alubia (*Phaseolus vulgaris*).
9. Uso de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para la estimulación de las raíces, germinación, crecimiento y/o producción de cultivos hortícolas o plantas.
10. Uso de la composición según la reivindicación 9, donde la planta es la alubia (*Phaseolus vulgaris*).

30

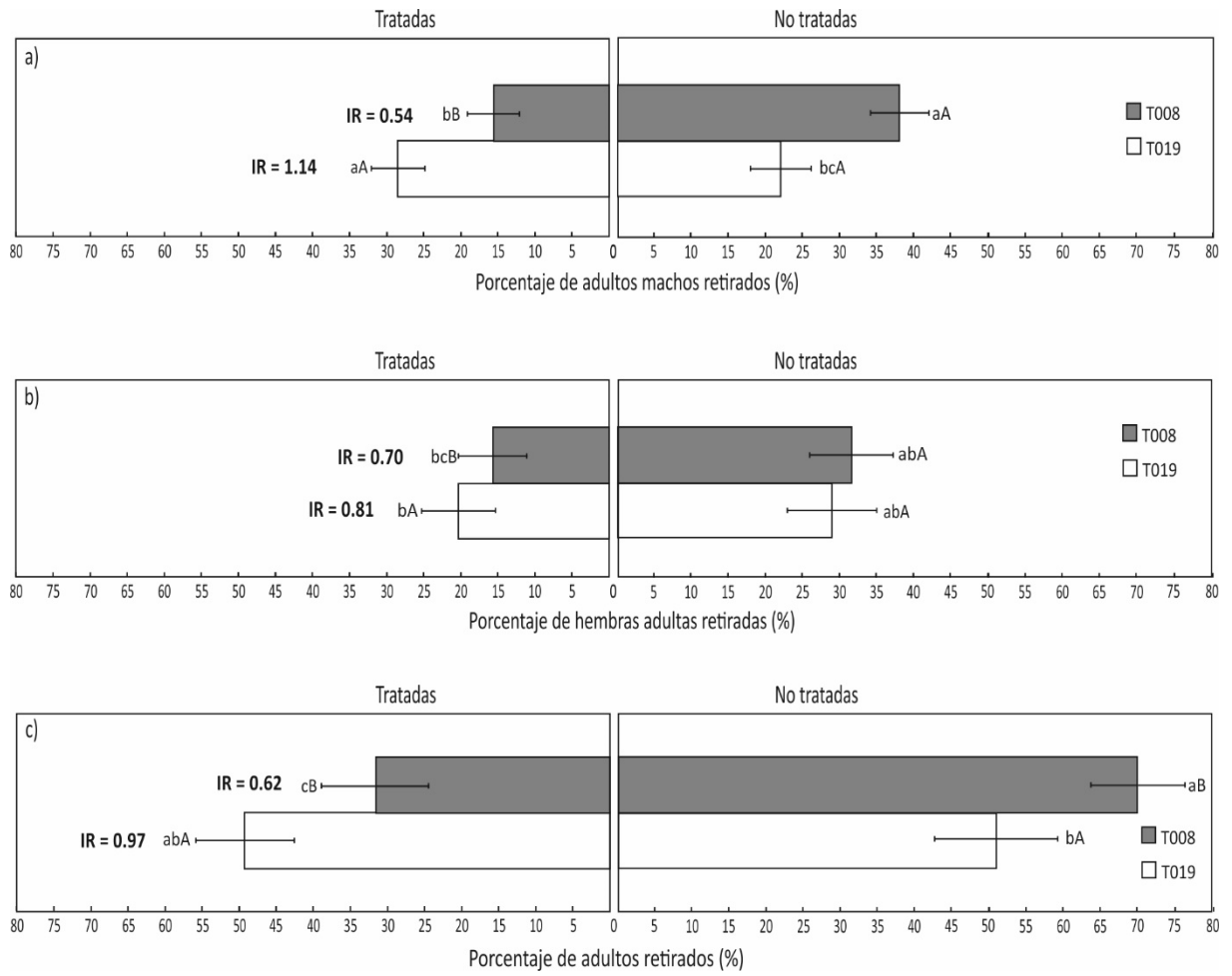


Figura 1



21 N.º solicitud: 201830269

22 Fecha de presentación de la solicitud: 20.03.2018

32 Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

51 Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	56 Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	RODRIGUEZ-GONZALEZ A. et al. Inhibitory activity of <i>Beauveria bassiana</i> and <i>Trichoderma spp.</i> on the insect pests <i>Xylotrechus arvicola</i> (Coleoptera: Cerambycidae) and <i>Acanthoscelides obtectus</i> (Coleoptera: Chrisomelidae: Bruchinae). Environmental Monitoring and Assessment, 2017, vol. 189, páginas 1-12. ISSN 0167-6369 (print) ISSN 1573-2959 (electronic), DOI:10.1007/s10661-016-5719-z tabla 1, apartados: design of experiments, inhibitory action against <i>A. obtectus</i> , figura 2.	1-10
A	DAL BELLO, G. et al. Biocontrol of <i>Acanthoscelides obtectus</i> and <i>Sitophilus oryzae</i> with diatomaceous earth and <i>Beauveria bassiana</i> on stored grains. Biocontrol Science and Technology, 2006, vol. 16 (1/2), páginas 215-220.	1-10
A	MAYO, S. et al. Influence of <i>Rhizoctonia solani</i> and <i>Trichoderma spp.</i> in growth of bean (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) and in the induction of plant defense-related genes. Frontiers in Plant Science, 2015, vol. 6, N° artículo 685, páginas 65-71.	1-10
A	DIGVIJAY S. et al. Entomopathogenic fungi: an effective biocontrol agent for management of insect populations naturally. Journal of Pharmaceutical Science and Research, 2017, vol. 9 (6), Páginas 830-839.	1-10
A	CASTRILLO L.A. et al. Granulate ambrosia beetle, <i>Xylosandrus crassiusculus</i> (Coleoptera: Curculionidae), survival and brood production following exposure to entomopathogenic and mycoparasitic fungi. Biological Control, 2013, vol. 67 (2), ISSN 1049-9644, DOI: 10.1016/j.biocontrol.2013.07.015 páginas 220 – 226.	1-10
A	ALAHMADI S. et al. Possible control of date palm stag beetle, <i>Lucanus cervus</i> (L.) (Coleoptera:Lucanidae) using gut protease of od different bio-control agents. Egyptian Journal of Biological Pest Control, 2012, Vol. 22 (2) Páginas 93-101.	1-10
A	US 6251390 B1 (HARMAN GARY E et al.) 26/06/2001, Columna 6, líneas 44-67, ejemplo 3.	1-10

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
31.08.2018

Examinador
A. I. Polo Diez

Página
1/2

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A01N63/04 (2006.01)

C12N1/14 (2006.01)

C12R1/885 (2006.01)

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

A01N, C12N, C12R

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, BD-TXTE, BIOSIS, MEDLINE, CAPLUS, EMBASE, NPL, INTERNET