

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 763 224**

21 Número de solicitud: 202030330

51 Int. Cl.:

A01N 37/06 (2006.01)

A01N 25/18 (2006.01)

C07C 69/003 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

21.04.2020

43 Fecha de publicación de la solicitud:

27.05.2020

71 Solicitantes:

**UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA
(25.5%)**

**Servicio de Promoción y Apoyo a Investigación,
Innovación y Transferencia - i2T Camí de Vera,
s/n - Edificio 8G - Acceso A Planta 3
46022 Valencia ES;**

**INSTITUTO VALENCIANO DE INVESTIGACIONES
AGRARIAS (IVIA) (69.0%) y
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (CSIC) (5.5%)**

72 Inventor/es:

**PÉREZ HEDO, Meritxel;
URBANEJA GARCÍA, Alberto;
ALONSO VALIENTE, Miquel;
NAVARRO LLOPIS, Vicente;
VACAS GONZÁLEZ, Sandra;
RAMBLA NEBOT, José Luis y
GRANELL RICHART, Antonio**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **Uso de ésteres de (Z)-3-hexenilo y método para proteger plantas frente a plagas**

57 Resumen:

Uso de ésteres de (Z)-3-hexenilo y método para proteger plantas frente a plagas.

La presente invención se refiere al uso de los ésteres acetato, propionato y butirato de (Z)-3-hexenilo, o de una composición que comprende dichos compuestos, para proteger plantas, en particular de cultivos agrícolas, frente a plagas, mediante la estimulación de los mecanismos de defensa que tienen las propias plantas. La invención también se refiere a un método para proteger plantas frente a plagas poniendo los mencionados ésteres en contacto con las plantas.

ES 2 763 224 A1

DESCRIPCIÓN

Uso de ésteres de (Z)-3-hexenilo y método para proteger plantas frente a plagas

- 5 La presente invención se refiere al uso de los ésteres (acetato, propanoato o butanoato) de (Z)-3-hexenilo, o de una composición que comprende dichos compuestos, para proteger plantas, en particular de cultivos agrícolas, frente a plagas, mediante la estimulación de los mecanismos de defensa que tienen las propias plantas. La invención también se refiere a un método para proteger plantas frente a plagas aplicando los
- 10 mencionados ésteres a las plantas.

Por tanto, la presente invención se encuadra en el sector técnico del control de plagas en plantas.

15 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- Garantizar la seguridad alimentaria es uno de los desafíos más acuciantes con los que se encuentra la población mundial en la actualidad. La producción agrícola mundial se enfrenta con el reto de cubrir las demandas crecientes de alimentos para una población
- 20 que de acuerdo con la FAO alcanzará 9.000 millones de habitantes en 2050. Esta necesidad deberá poder abordarse a pesar de las adversidades que pueden suponer los cambios en los patrones de consumo, los impactos del cambio climático y la creciente escasez de agua y tierra cultivable. Además, a estas adversidades hay que añadir las ya importantes pérdidas de rendimiento en los cultivos que provocan los
- 25 distintos estreses tanto abióticos como bióticos.

- En el caso particular de plagas, patógenos y malas hierbas, las pérdidas en los cultivos varían con cada cultivo concreto, pero en general, se admite que las plagas y enfermedades participan de forma parecida, con un 15 % cada grupo, mientras que las
- 30 malas hierbas lo hacen con otro 13 %. A estas cantidades habría que sumar entre un 9 y un 20 % de pérdidas adicionales en postcosecha.

- Desgraciadamente estas cifras se acentuarán en los próximos años como consecuencia de las nuevas condiciones derivadas del cambio climático, tales como la introducción de
- 35 nuevas plagas o enfermedades exóticas en nuestra agricultura. A modo de ejemplo, en

la Comunidad Valencia el número de plagas agrícolas exóticas introducidas durante los últimos 20 años llega a casi una por año. En algunas ocasiones son introducciones que pueden pasar desapercibidas, pero desafortunadamente algunas de ellas irrumpen con fuerza en nuestros cultivos al no venir acompañadas de sus enemigos naturales, convirtiéndose rápidamente en plagas clave. Un caso conocido por la repercusión mediática que supuso, y que puede servir de ejemplo paradigmático de plaga exótica en dicha Comunidad, es la polilla del tomate, *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelichiidae), que se detectó a finales del 2006 en la provincia de Castellón y que rápidamente pasó a convertirse en una plaga clave de este cultivo en todo el mundo.

10

Desde el nacimiento de la agricultura como tal hace unos 10.000 años hasta hace tan sólo 65 años, la agricultura fue una actividad holística, basada en un enfoque sistémico. Las sociedades agrícolas diseñaron programas de protección de cultivos basados principalmente en la prevención de plagas. Esta forma verdadera de gestión agroecológica incluía, entre otras, rotación de cultivos, planificación de distintas combinaciones de cultivos, uso de cultivares resistentes o tolerantes, elección de períodos correctos de siembra y cosecha, control biológico, mecánico y físico, etc.

15

Sin embargo, a medida que la genética vegetal, los fertilizantes sintéticos y los plaguicidas se fueron desarrollando, la investigación agrícola cambió de un enfoque holístico a una ciencia extremadamente reduccionista donde las plagas eran combatidas principalmente a base de calendario de tratamientos o tratamientos curativos. El uso cada vez mayor de plaguicidas sintéticos dio lugar a una grave pérdida de biodiversidad, y ésta a su vez a una reducción del funcionamiento de las infraestructuras ecológicas que permiten la regulación de plagas, la polinización y la purificación de agua. Además, ha supuesto también un aporte exorbitante de recursos y consecuencias financieras de miles de millones de euros.

20

25

Llegados a este punto, en los últimos años y desde diversos gobiernos y organizaciones del todo el mundo, se ha hecho un llamamiento para volver a un enfoque de protección de cultivos más cercano a la ecología. En toda la Unión Europea se ha establecido un marco de actuación comunitaria para conseguir un uso sostenible de los plaguicidas (Directiva 2009/128/CE) que ha dado lugar a la obligatoriedad que toda producción hortofrutícola producida en la unión europea sea bajo los preceptos de Gestión Integrada de Plagas (GIP) (o en su caso agricultura ecológica).

30

35

A pesar de todos estos esfuerzos, en la actualidad tanto en GIP como en agricultura ecológica, desgraciadamente en la mayor parte de los casos el control de plagas reside todavía en los tratamientos curativos con plaguicidas, ya que en ambos tipos de agricultura existen productos autorizados para ello. En el contexto en que se presenta esta invención se entiende que, independientemente del tipo de manejo de plagas que se esté utilizando (GIP o ecológica), la primera línea de protección de los cultivos debería ser la implementación de métodos preventivos de control como son los métodos culturales, utilización de plantas resistentes/tolerantes, la aplicación de estrictos reglamentos de cuarentena, y el fomento del control natural de las plagas. En este contexto anterior es donde se encuadraría la utilización de la presente invención. Cuando a pesar de estos esfuerzos las plagas excedan o se prevea que vayan a exceder los niveles aceptables de población (umbral económico de daño), el control biológico de plagas debería ser la primera opción a utilizar, si es necesario en combinación con otras tácticas de GIP (donde en último lugar estarían los plaguicidas).

Este concepto, que últimamente se ha acuñado como "agricultura consciente", respetaría el medio ambiente y la disponibilidad de recursos para las generaciones futuras.

20

En los últimos años el uso de enemigos naturales omnívoros en cultivos hortícolas, y en particular los depredadores zoofitófagos que pueden alimentarse tanto de la planta como de presas, ha dado lugar a alguno de los éxitos más rotundos del control biológico en nuestro país. Así, por ejemplo, en pimiento la liberación y conservación del ácaro depredador *Amblyseius swirskii* (Athias-Henriot) (Acari: Phytoseiidae) junto con el antocórido *Orius laevigatus* (Fieber) (Hemiptera: Anthocoridae) permite manejar con éxito las poblaciones de las plagas clave de este cultivo: la mosca blanca *Bemisia tabaci* Gennadius y el trips *Frankliniella occidentalis* (Pergande) (Thysanoptera: Thripidae). De manera similar en tomate, el mírido cosmopolita *Nesidiocoris tenuis* (Reuter) (Hemiptera: Miridae) permite el control eficaz de *B. tabaci* y la polilla del tomate *T. absoluta*.

Recientemente, se ha demostrado cómo algunos de estos depredadores zoofitófagos debido a su fitofagia, activan los mismos mecanismos de defensa que provocan los artrópodos herbívoros obligados. Es ampliamente conocido, que las plantas responden

a ataques de fitófagos (defensas inducidas) a través de varias vías de respuesta.

Estas defensas pueden entre otros fenómenos, provocar la producción de metabolitos secundarios y proteínas que tienen efectos tóxicos, repelentes y/o antialimenticios sobre los herbívoros (defensas directas). También desencadenar la producción y liberación de volátiles (Volátiles de las plantas inducidos por los herbívoros: HIPVs, del *inglés* *Herbivore-induced plant volatiles*) por parte de la planta que pueden modificar el comportamiento tanto de las plagas fitófagas como de sus enemigos naturales (defensas indirectas). Trabajos anteriores citados más adelante han demostrado que varias especies de depredadores zoofitófagos que vienen utilizándose en estrategias biológicas de control de plagas son capaces de inducir defensas en varios cultivos hortícolas como son el pimiento y el tomate. Estas defensas inducibles son sin duda un valor añadido que poseen estos agentes de control biológico y gestionadas adecuadamente, podrían ofrecer una excelente herramienta para aumentar la resiliencia de los cultivos.

En una primera etapa se pudo verificar cómo la fitofagia del depredador *N. tenuis* activó la ruta metabólica del ácido abscísico y ácido jasmónico (JA) en plantas de tomate, lo que las hizo menos atractivas para la mosca blanca *B. tabaci*, y más atractivas para el parasitoide de mosca blanca *Encarsia formosa* (Gahan) (Hymenoptera: Aphelinidae). Además, se observó cómo los volátiles emitidos por plantas picadas por *N. tenuis* podían inducir defensas en plantas vecinas intactas al activarles la ruta del JA, lo que también resultaba en la atracción de parasitoides por estas plantas intactas que no habían sido expuestas a *N. tenuis*. Posteriormente se confirmó que todos los estados de desarrollo de *N. tenuis* (desde ninfas jóvenes hasta adultos) son capaces de desencadenar estas respuestas defensivas. Sin embargo, no todos los depredadores zoofitófagos tienen la misma capacidad de inducir dichas respuestas en plantas de tomate. Las plantas de tomate pueden tener distintos grados de atracción para plagas y enemigos naturales dependiendo de si la fitofagia es producida, por ejemplo, por *N. tenuis*, *Macrolophus pygmaeus* (Rambur) o *Dicyphus maroccanus* Wagner (Hemiptera: Miridae). Así, mientras que las plantas dañadas por *N. tenuis* rechazan *B. tabaci* y *T. absoluta*, la fitofagia de *M. pygmaeus* y *D. maroccanus* no tiene efecto sobre la repelencia en *B. tabaci* y atrae a *T. absoluta*. Contrariamente la actividad de los tres míridos resulta en la atracción de *E. formosa*.

Recientemente se han identificado los volátiles (HIPVs) implicados en las respuestas

defensivas de las plantas de tomate inducidas por *M. pygmaeus* y *N. tenuis*: seis volátiles de hojas verdes (GLVs), el metil salicilato y el acetato de octilo ((Pérez-Hedo, M. *et al. Biocontrol*, 63: 203-213 (2018)). En general, las plantas expuestas a *N. tenuis* emitieron más volátiles que las plantas expuestas a *M. pygmaeus*, y estas últimas
5 emitieron más volátiles que las plantas intactas. Los seis GLVs y el metil salicilato resultaron ser repelentes para *B. tabaci* y atractivos para *E. formosa*, mientras que no mostraron efecto sobre *T. absoluta*. Estos resultados muestran claramente como la herbivoría de los míridos puede modular la preferencia de una plaga o en un enemigo natural en función de la exposición a un determinado volátil y abre las puertas a posibles
10 aplicaciones prácticas de dichos compuestos.

En pimiento se ha comprobado cómo también la fitofagia del antocórdo *O. laevigatus* desencadena respuestas defensivas en la planta (Bouagga *et al. Journal of Pest Science*, 91: 55-64 (2018)). En concreto plantas de pimiento expuestas a *O. laevigatus*
15 inducen repelencia frente a la mosca blanca *B. tabaci* y al trips *F. occidentalis*. Contrariamente, el parasitoide de la mosca blanca *E. formosa* se siente atraído a las plantas expuestas a *O. laevigatus*. La fitofagia de *O. laevigatus* desencadena la liberación de una mezcla de volátiles (5 terpenos, 2 GLVs, metil salicilato y uno por identificar) y la activación de las rutas metabólicas del ácido jasmónico y del ácido
20 salicílico. De manera similar, la fitofagia de los míridos *N. tenuis* y *M. pygmaeus* en pimiento también provocó repelencia para *B. tabaci* y *F. occidentalis* y atracción para *E. formosa* y desencadenó volátiles de naturaleza similar a los desencadenos por *O. laevigatus*.

Quizás uno de los resultados más interesantes hasta la fecha haya sido el comprobar como en ensayos de invernadero en plantas tanto de tomate como de pimiento que previamente habían sido activadas (expuestas) durante 24 horas por *N. tenuis*, la infestación de la araña roja, *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) y de *B. tabaci* era significativamente menor en comparación a plantas de pimiento no expuestas
30 al depredador. Desde que se vienen utilizando depredadores zoofitofagos en cultivos hortícolas se ha observado una menor incidencia de determinadas virosis. Recientemente se ha comprobado como las defensas inducidas por míridos depredadores disminuyen la multiplicación de virus fitopatógenos, en concreto el virus del bronceado del tomate en pimiento (TSWV) (Bouagga *et al. Pest Management Science*, 76: 561-567 (2020)). Tal como se ha comentado con anterioridad se han
35

identificado compuestos volátiles que son responsables de la repelencia y atracción a plagas y a enemigos naturales.

En los últimos años, el número de proyectos de investigación que intentan utilizar estos volátiles para inducir defensas vegetales ha aumentado considerablemente (Turlings, T.C.J., Erb, M. *Annu. Rev. Entomol.* 63, 433–452 (2018)). Por ejemplo, en maíz, la exposición a (Z)-3-hexenal, (Z)-3-hexen-1-ol y el (Z)-3-hexenil acetato consiguió sobreexpresar la ruta del ácido jasmónico (Engelberth, J., H. T. Alborn, E. A. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101, 1781–1785 (2004). Sin embargo, ninguno de ellos ha conseguido obtener resultados en que se vea respuesta defensiva de las plantas en condiciones reales de campo. En cambio, la aplicación del propionato (Z)-3-hexenilo mediante difusores ha provocado una respuesta defensiva en cultivos comerciales tal y como se presenta en esta invención.

En esta invención se muestra que los esteres de (Z)-3-hexenilo, son elicitores de la inducción de defensas directas e indirectas en cultivos, como el cultivo de tomate. En concreto se ha podido activar defensivamente las plantas simplemente exponiéndolas a estos volátiles de origen sintético. La exposición de los esteres de (Z)-3-hexenilo se han descrito como repelentes de fitófagos plaga la mosca blanca, *Bemisia tabaci* y atrayente de enemigos naturales como es el parasitoide de moscas blancas, *Encarsia formosa* (Pérez-Hedo, M. *et al. Biocontrol*, 63: 203-213 (2018)). La atracción a parasitoides es un efecto indirecto que puede beneficiar el control biológico de una plaga.

La presente invención es una herramienta sostenible y bioracional de control de plagas basada en la comunicación entre plantas para la protección cultivos. Las plantas utilizan la emisión de estos volátiles para comunicar a sus “vecinas” determinadas agresiones. Las plantas receptoras de estas señales entran en un estado de alerta en el cual se preparan para un futuro ataque. A esto se le conoce como *priming*.

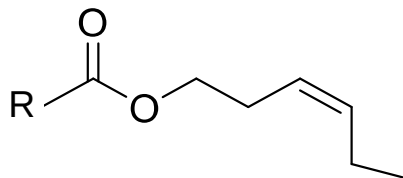
30

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Los inventores de la presente invención han encontrado que los compuestos según la Fórmula I, donde $R=CH_3$, CH_2-CH_3 o $CH_2-CH_2-CH_3$, son capaces de alertar plantas expuestas a los mismos e inducir mecanismos de defensa en ellas que reducen el

35

impacto de plagas, de manera que induce o elicit las defensas naturales de las plantas.



Formula I

5

Mediante la utilización de estos compuestos volátiles la planta se activa defensivamente a través de las rutas hormonales del ácido jasmónico y del ácido salicílico, ambas fitohormonas involucradas en mecanismos de defensas en planta.

- 10 La activación defensiva que se consigue con estos compuestos hace a las plantas activadas más resistente al ataque de plagas.

- 15 Luego, en un primer aspecto, la presente invención se refiere al uso de al menos un compuesto de fórmula I definida anteriormente, o de una composición que lo comprende, para la protección de plantas frente a plagas mediante la estimulación de los mecanismos naturales de defensa de dichas plantas.

- 20 Estos mecanismos hacen que las plantas repelan a las plagas y/o atraigan parasitoides de dichas plagas. Estos parasitoides son enemigos naturales de las plagas, por lo que, en consecuencia, la atracción de los mismos hace que las plantas queden protegidas frente a las mencionadas plagas.

- 25 Los compuestos usados en la presente invención son acetato, propanoato o butanoato de (Z)-3-hexenilo. En una realización preferida, la invención se refiere al uso de propanoato de (Z)-3-hexenilo, o de una composición que los comprende, para la protección de plantas frente a plagas mediante la estimulación de los mecanismos naturales de defensa de dichas plantas.

- 30 En una realización preferida, los mecanismos de defensa de las plantas provocan la repelencia de al menos una plaga seleccionada de la lista que comprende: *Bemisia tabaci* (Gennadius) y *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood), *Aleurothrixus floccosus* (Maskell), *Dialeurodes citri* (Ashmead) y *Paraleyrodes minei* Iaccarino (Hemiptera:

Aleyroididae), los trips *Frankliniella occidentalis* Pergande, *Pezothrips kellyanus* Bagnall, *Chaetanaphothrips orchidii* (Moulton) y *Thrips tabaci* Lindeman (Thysanoptera: Thripidae), las arañas rojas *Tetranychus urticae*, *Eutetranychus orientalis* (Klein), *Eutetranychus banksi* (McGregor), *T. urticae*, *Panonychus citri* (McGregor) Koch y

5 *Tetranychus evansi* Baker & Pritchard (Acari: Tetranychidae), los lepidópteros *Tuta absoluta* (Meyrick), *Phyllocnistis citrella* Stainton (Lepidoptera: Gracillariidae), *Spodoptera exigua* Hübner y *Helicoverpa armígera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) en cultivos hortícolas; y los psílidos *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) y *Trioza erytrae* (Del Guercio) (Hemiptera: Psyllidae), en cítricos.

10

En una realización aún más preferida, la plaga es seleccionada de la lista que comprende: la mosca blanca *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae), el trips *Frankliniella occidentalis* Pergande (Thysanoptera: Thripidae), la araña roja *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae), el lepidóptero *Tuta absoluta* (Meyrick)

15 (Lepidoptera: Gelechiidae) y el psílido *Diaphorina citri*.

15

En una realización preferida, los mecanismos de defensa de las plantas provocan la atracción de al menos un parasitoide seleccionado de la lista que comprende: especies de los géneros *Encarsia* spp., *Aphytis* spp. *Cales* spp., *Eretmocerus* spp., *Aphelinus*

20 spp., (Hymenoptera: Aphelinidae), *Aphidius* spp. *Lysiphlebus* spp. (Hymenoptera: Braconidae) *Metaphycus* spp., *Anagyrus* spp. (Hymenoptera: Encyrtidae), *Tamarixia* spp. *Citrostichus* spp., *Cirrospilus* spp., *Diglyphus* spp. (Hymenoptera: Eulophidae), *Trissolcus* spp., *Telenomus* spp. (Hymenoptera: Scelionidae) y *Trichogramma* spp. (Hymenoptera. Trichogrammatidae).

25

El mencionado compuesto ha demostrado repeler a plagas de cultivos hortícolas de órdenes de Insecta distintos (Hemiptera, Thysanoptera y Lepidoptera), lo cual no era de esperar precisamente por tratarse de especies muy separadas filogenéticamente. En el caso de los cítricos se ha observado cómo la activación con este mismo volátil disminuye

30 la puesta del psílido *Diaphorina citri*.

30

En una realización preferida las plantas protegidas son plantas hortícolas o plantas de cítricos. Las plantas hortícolas son seleccionadas preferiblemente de la lista que comprende: tomates, pimientos, berenjenas, cebollas, puerros, calabazas, calabacines,

35 pepinos, acelgas, lechugas y leguminosas. Más preferiblemente, las plantas hortícolas

35

son plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) o pimiento (*Capsicum annuum*). Los cítricos son seleccionados preferiblemente de la lista que comprende limones, limas, naranjas, pomelos y mandarinas.

- 5 En una realización más particular, la planta es una planta de tomate y la plaga es la mosca blanca *B. tabaci*, el trips *Frankliniella occidentalis* o el lepidóptero *Tuta absoluta*.

En otra realización más particular, la planta es un cítrico y la plaga es el psílido *Diaphorina citri*.

10

- En una realización preferida, el uso comprende la aplicación de los compuestos según la Formula I mediante difusores, lo que permite utilizar de forma eficaz dichos compuestos vía exposición en condiciones de campo como inductor/elicitador de las defensas de las plantas. Este sistema de emisión mediante difusores consigue que se obtenga, en la atmósfera que rodea a las plantas a proteger, una concentración mantenida en el tiempo y suficiente del inductor, que no se obtendría con una aplicación puntual del mismo.
- 15

- De acuerdo con la presente invención, se entiende por “difusor” (también denominado “emisor”) un dispositivo o vehículo (formulación) que distribuye a velocidad controlada al menos uno de los compuestos de la invención (Formula I) vía exposición de los mismos a las plantas en condiciones de campo. Los dispositivos son contenedores de los compuestos según la Formula I que permiten que dichas sustancias se liberen a la atmósfera de forma controlada a través de una membrana, una válvula o incluso a través de la propia pared del contenedor. Los vehículos son formulaciones de sustancias líquidas, gelificadas o pastosas que contienen los compuestos según la Fórmula I y que se aplican en forma de gotas o gránulos de forma que los volátiles se van emitiendo conforme el vehículo se va degradando o deshidratando. Estas formulaciones o vehículos se pueden aplicar sobre alguna parte de la planta, sobre el sustrato, sobre estructuras en el cultivo o en cualquier sitio desde el que se pueda emitir cercano a las plantas. Dentro de los vehículos se encuentran sustancias como las parafinas, las siliconas, pectinas, aceites pesados, polisacáridos, proteínas, etc. Entre ellas se puede nombrar a modo de ejemplo las siguientes: agar-agar, alginina, carragenato, colágeno, almidón de maíz, gelatina, goma guar, goma de algarrobo, pectina, goma xantana, aceite mineral, aceite de silicona, parafinas, olefinas o aceites minerales o vegetales.
- 20
- 25
- 30
- 35

Los difusores son preferiblemente dispositivos de dos tipos:

- (1) emisores pasivos que consisten en un contenedor de los compuestos según la Fórmula I configurado para permitir la difusión de dichas sustancias, por lo que el contenedor debe ser permeable a los compuestos de fórmula I, bien a través de su propio cerramiento de un material polimérico o bien a través de una membrana colocada en parte de su cerramiento para regular la emisión;
- (2) emisores activos en los que los compuestos según la Fórmula I se envasan en un recipiente a presión que contiene una válvula configurada para accionarse de forma programada, como es el caso de los nebulizadores que producen un aerosol.

En una realización más preferida, los compuestos según la Fórmula I se aplican mediante difusores consistentes en viales de polietileno de baja densidad (LDPE, por sus siglas en inglés, *Low Density Polyethylene*).

En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a un método para la protección de plantas frente a plagas mediante la estimulación de los mecanismos naturales de defensa de dichas plantas, dicho método está caracterizado porque comprende poner en contacto al menos un compuesto de Fórmula I, o una composición que lo comprende, con las plantas. El contacto puede ser directo, mediante la aplicación directa del compuesto a la planta o indirecto, mediante la exposición de la planta a un ambiente que contenga dicho compuesto.

Estos mecanismos naturales de defensa de las plantas permiten repeler las plagas o atraer a parasitoides naturales de las mismas.

En una realización preferida del método se caracteriza porque comprende la aplicación del propanoato de (Z)-3-hexenilo o de una composición que le comprende.

En una realización preferida del método, la plaga es seleccionada de la lista que comprende: *Bemisia tabaci* (Gennadius) y *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood), *Aleurothrixus floccosus* (Maskell), *Dialeurodes citri* (Ashmead) y *Paraleyrodes minei* Iaccarino (Hemiptera: Aleyroididae), los trips *Frankliniella occidentalis* Pergande, *Pezothrips kellyanus* Bagnall, *Chaetanaphothrips orchidii* (Moulton) y *Thrips tabaci* Lindeman (Thysanoptera: Thripidae), las arañas rojas *Tetranychus urticae*,

Eutetranychus orientalis (Klein), *Eutetranychus banksi* (McGregor), *T. urticae*, *Panonychus citri* (McGregor) Koch y *Tetranychus evansi* Baker & Pritchard (Acari: Tetranychidae), los lepidópteros *Tuta absoluta* (Meyrick), *Phyllocnistis citrella* Stainton (Lepidoptera: Gracillariidae), *Spodoptera exigua* Hübner y *Helicoverpa armígera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) en cultivos hortícolas; y los psílicos *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) y *Trioza erytreae* (Del Guercio) (Hemiptera: Psyllidae), en cítricos.

En una realización aún más preferida, la plaga es seleccionada de la lista que comprende: la mosca blanca *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae), el trips *Frankliniella occidentalis* Pergande (Thysanoptera: Thripidae), la araña roja *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae), el lepidóptero *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) y el psílido *Diaphorina citri*.

En una realización preferida del método, la protección de las plantas se produce por la atracción de parasitoides seleccionados de la lista que comprende: especies de los géneros *Encarsia* spp., *Aphytis* spp., *Cales* spp., *Eretmocerus* spp., *Aphelinus* spp., (Hymenoptera: Aphelinidae), *Aphidius* spp., *Lysiphlebus* spp. (Hymenoptera: Braconidae) *Metaphycus* spp., *Anagyrus* spp. (Hymenoptera: Encyrtidae), *Tamarixia* spp., *Citrostichus* spp., *Cirrospilus* spp., *Diglyphus* spp. (Hymenoptera: Eulophidae), *Trissolcus* spp., *Telenomus* spp. (Hymenoptera: Scelionidae) y *Trichogramma* spp. (Hymenoptera: Trichogrammatidae).

En una realización preferida del método, las plantas protegidas son plantas hortícolas o plantas de cítricos. Las plantas hortícolas son seleccionadas preferiblemente de la lista que comprende: tomates, pimientos, berenjenas, cebollas, puerros, calabazas, calabacines, pepinos, acelgas, lechugas y leguminosas. Más preferiblemente, las plantas hortícolas son plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) o pimiento (*Capsicum annuum*). Los cítricos son seleccionados preferiblemente de la lista que comprende limones, limas, naranjas, pomelos y mandarinas.

En una realización más particular, la planta es una planta de tomate y la plaga es la mosca blanca *B. tabaci*, el trips *Frankliniella occidentalis* o el lepidóptero *Tuta absoluta*.

En otra realización más particular, la planta es un cítrico y la plaga es el psílido

Diaphorina citri.

En una realización preferida del método, los compuestos según la Fórmula I, o de una composición que los comprende, son aplicados mediante el uso de difusores. Los difusores y las realizaciones preferidas de los mismos de acuerdo con la presente invención se han definido en el primer aspecto de la invención. En una realización más preferida, los compuestos según la Fórmula I se aplican mediante difusores consistentes en viales de polietileno de baja densidad.

En una realización preferida, la aplicación se realiza a razón de un difusor por cada 20 m² de superficie plantada. De esta manera el difusor distribuye el compuesto al ambiente que rodea a las plantas y éstas lo detectan.

En una realización preferida del método, los compuestos según la Fórmula I son aplicados al ambiente del cultivo en una dosis entre 25 mg/ha/día y 25 g/ha/día, y más preferiblemente entre 200 mg/ha/día y 10 g/ha/día.

Durante el desarrollo de esta invención se ha observado, mediante el uso de distintos difusores, como la planta se activa defensivamente cuando las fuentes emisoras del volátil lo hacen a partir de 25 mg/ha/día de los compuestos según la Fórmula I. Se ha comprobado como el uso de un difusor polimérico pasivo es capaz de liberar en función de las condiciones ambientales una dosis del volátil en el rango suficiente para activar plantas tanto de tomate, pimiento o cítricos en condiciones de campo.

El desarrollo de esta invención permite por primera vez activar defensivamente plantas como el tomate, pimiento y cítricos y hacerlas más resilientes frente a plagas mediante la exposición de las plantas a los volátiles según la Fórmula I.

La metodología descrita en la presente solicitud mediante la exposición a los compuestos según la Fórmula I, activa una respuesta en la planta anteriormente no descrita relacionada con la sobreexpresión de las rutas del ácido salicílico y la del ácido jasmónico. Esta activación provoca en las plantas activadas la emisión de volátiles que atraen y repelen enemigos naturales y plagas, respectivamente. En el caso del tomate se ha observado como plantas expuestas al propanoato de (Z)-3-hexenilo repelen plagas clave de este cultivo como la mosca blanca, *B. tabaci*, el trips *F. occidentalis* y al

lepidóptero *T. absoluta*. Esta activación permite repeler por tanto tres plagas clave, lo cual no era de esperar por pertenecer estas tres especies a tres órdenes de insectos distintos (Hemiptera, Thysanoptera y Lepidoptera). En el caso de los cítricos se ha observado cómo la activación con este mismo volátil repele al psílido *D. citri*. Se ha demostrado en el caso de los cítricos que la puesta de *D. citri* se reduce también a más de la mitad cuando la planta de cítrico ha estado expuesto a este volátil. También las plantas activadas por exposición al propanoato de (Z)-3-hexenilo son más atrayentes a enemigos naturales de las plagas como son los parasitoides *Encarsia formosa* en tomate y *Tamarixia radiata* en cítricos.

10

En el desarrollo de la presente invención, también se ha observado como la activación de la planta defensivamente no afecta al establecimiento ni desarrollo de depredadores zoofitófagos que puedan colonizar dicho cultivo.

15

Por lo contrario a lo que se cabría esperar, la sobreexpresión de las rutas defensivas en planta provocada por la exposición del volátil propanoato de (Z)-3-hexenilo, no reduce el crecimiento ni la producción de la planta, obteniendo como resultado final unas plantas igual de productivas pero más resistentes al ataque de plagas.

20

La presente invención es un nuevo método de gestión de plagas no utilizada hasta la fecha en ningún cultivo.

25

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. 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 figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

30

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

35

Fig. 1.: Respuesta transcripcional de los genes defensivos PR1 (un gen marcador para la vía de señalización de ácido salicílico, SA) (**fig. 1A**) y SI-PI-I y SI-PI-II (dos marcadores para inhibidores de proteinasas de plantas) (**fig. 1B y 1C** respectivamente) en plantas de tomate expuestas a acetato de (Z)-3-hexenilo (HA), butanoato de (Z)-3-hexenilo (HB) y propanoato de (Z)-3-hexenilo (HP) y al control. Los datos se presentan como la media

de ocho análisis independientes de expresiones de transcripción en relación con un gen de limpieza $\pm$ error estándar ($n = 8$). Las diferencias significativas basadas en la prueba ANOVA están marcadas con distintas letras ($P < 0.05$). Respuesta ($\% \pm$ SE (Error estándar)) de las hembras *Encarsia formosa* (E.f.), *Tuta absoluta* (T.a.), *Tetranychus* 5 *urticae* (T.u.), *Bemisia tabaci* (B.t.) y *Frankliniella occidentalis* (F.o.) en un olfatómetro de tubo en Y cuando se exponen al control (1: 10,000 metanol: agua) y a propanoato de (Z)-3-hexenilo ((Z) -3-HP) (1: 10,000 con el volátil para probar). Los asteriscos indican diferencias significativas en la distribución de las elecciones de brazo lateral (pruebas χ^2 ; $P < 0.05$) (**fig. 1D**). Número (media $\pm$ error estándar) de hembras de *Tetranychus* 10 *urticae* por planta de tomate al comparar el desarrollo de ácaros en plantas de tomate expuestas a propanoato de (Z)-3-hexenilo [(Z) -3-HP]] en comparación con plantas de tomate no expuesto (Control). La exposición a (Z)-3-HP se probó en dos tipos de bioensayos, (24 h) y (Per): en el primer tipo, las plantas solo estuvieron expuestas durante 24 horas al volátil antes de la liberación de *T. urticae* (24 h); En el otro tipo de 15 prueba, las plantas estuvieron permanentemente expuestas al volátil durante todo el experimento (Per). Las barras con letras diferentes son significativamente diferentes (GLMM, medidas repetidas $\alpha < 0.05$) (**fig. 1E**). Número de huevos (media $\pm$ error estándar) puestos por 2 hembras *Tuta absoluta* durante 72 horas en plantas expuestas a propanoato de (Z)-3-hexenilo [(Z) -3-HP]] en comparación con las plantas de tomate 20 no expuestas (Control). Las barras con letras diferentes son significativamente diferentes (ANOVA, Tukey $\alpha < 0.05$) (**fig. 1F**). Porcentaje de mortalidad (media $\pm$ error estándar) de *T. absoluta* desde huevo a adulto cuando se desarrolló en plantas de tomate expuestas a a propanoato de (Z)-3-hexenilo [(Z)-3-HP]] en comparación con las plantas de tomate no tratadas (Control). Las barras con letras diferentes son 25 significativamente diferentes (ANOVA, Tukey $\alpha < 0.05$) (**fig. 1G**).

Fig. 2. Respuesta transcripcional del gen PIN2 (un gen marcador para la vía de señalización del ácido jasmónico (JA) en plantas de tomate expuestas en condiciones de semicampo al propanoato de (Z)-3-hexenilo [(Z) -3-HP] con distintos niveles de emisión del volátil: 5 mg/día/difusor en el emisor de polietileno de baja densidad (LD) y 30 0,01 mg/día/difusor en el emisor de polietileno de alta densidad (HD). El tratamiento control consiste en plantas no expuestas al volátil. Las diferencias significativas basadas en la prueba ANOVA están marcadas con distintas letras ($P < 0.05$).

Fig. 3: Respuesta transcripcional de los genes defensivos PR1 (un gen marcador para la vía de señalización de SA) (**fig. 3A**) y PIN2 (un gen marcador para la vía de 35 señalización del ácido jasmónico) (**fig. 3B**) en plantas de tomate expuestas en

condiciones de campo a propanoato de (Z)-3-hexenilo [(Z) -3-HP] liberado en un dispensador polimérico (LD) vial de polietileno de baja densidad de 4 ml (Kartell) un día antes, 4 y 8 semanas tras la colocación del difusor. Las diferencias significativas entre tratamientos para cada una de las fechas están marcadas con un asterisco (t -test; $P < 0.05$). Número de *Nesidicoris tenuis* por planta (media $\pm$ error estándar) (**fig. 3C**) y número de folíolos infestados por planta (media $\pm$ error estándar) (**fig. 3D**) en el invernadero comercial (GLMM, $P < 0.05$). Perfil de liberación del dispensador empleado ajustado del modelo de regresión lineal (**fig. 3E**).

Fig. 4: Respuesta transcripcional de los genes defensivos LOX2 (precursor del ácido jasmónico JA) (**fig 4A**) y PAL y NPR1 dos genes relacionados con la ruta del ácido salicílico (**fig. 4B y C**, respectivamente) en plantas de citrange Carrizo expuestas a propanoato de (Z)-3-hexenilo y al control. Los datos se presentan como la media de seis análisis independientes de expresiones de transcripción en relación con un gen de limpieza $\pm$ Error estándar ($n = 6$). Las diferencias significativas basadas en la prueba t están marcadas con (*) ($P < 0.05$). Respuesta (% $\pm$ SE) de las hembras *Diaphorina citri* y *Tamarixia radiata* en un olfatómetro de tubo en Y cuando se exponen al control (1: 10,000 metanol: agua) y a propanoato de (Z)-3-hexenilo ((Z) -3-HP) (1: 10,000 con el volátil para probar). Los asteriscos indican diferencias significativas en la distribución de las elecciones de brazo lateral (pruebas χ^2 ; $P < 0.05$) (**fig. 4D**).

Fig. 5: Número de brotes receptivos (media $\pm$ SE) y puesta (media $\pm$ SE) de *Diaphorina citri* en los plantones de *Murraya paniculata* utilizados como plantas centinela con y sin difusor cargado con HP. Letras distintas sobre las barras muestran diferencias significativas (t -test $P < 0,05$).

25 EJEMPLOS

A continuación, se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores.

30 Ejemplo 1: Ensayos de activación defensiva en tomate vía exposición en condiciones de laboratorio

Metodología

Para demostrar que la exposición de los volátiles propanoato de (Z)-3-hexenilo, acetato de (Z)-3-hexenilo de y butanoato de (Z)-3-hexenilo activa defensas en plantas se

utilizaron plantas de tomate *Solanum lycopersicum* cv. Moneymaker. Dos semanas tras la germinación de las semillas, las plántulas se trasplantaron individualmente en macetas (8 × 8 × 8 cm). Las plantas se mantuvieron a 25 ± 2 °C, con una humedad relativa constante del 65% ± 5% y un fotoperiodo de 14:10 h (luz: oscuridad). Se utilizaron plantas de tomate que no habían recibido ningún tratamiento plaguicida a las cuatro semanas de edad (aproximadamente 20 cm de altura). Todos los volátiles utilizados se consiguieron a través de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Cada volátil se expuso mediante la utilización de una porción de papel de filtro de 2 x 2 cm sobre el cual se impregnó 10 µl de una disolución que contenía el volátil correspondiente a una concentración de 1:10.000 [éster de (Z)-3-hexenilo:metanol] como fuente emisora del volátil correspondiente (Pérez-Hedo, M. *et al. Biocontrol*, 63: 203-213 (2018)).

Para activar una planta se colocaron dos porciones de papel de filtro impregnadas con el volátil en la parte inferior de una jaula de plástico de 30 × 30 × 30 cm (BugDorm-1 Insect Tents; MegaView Science Co., Ltd, Taichung, Taiwan) en la cual se introdujo la planta. Se realizó un tratamiento control en el cual las dos porciones de papel de filtro se impregnaron con 10 µl de metanol. Se realizaron ocho repeticiones por tratamiento. Las plantas de los tratamientos se mantuvieron expuestas al volátil sin perturbar durante 24 horas en cámaras climáticas separadas y aisladas para evitar cualquier interferencia de los volátiles y se mantuvieron a 25 ± 2°C, 65 ± 10% HR y un fotoperíodo de 14:10 h (L: D). Transcurridas las 24 horas se estudió la expresión de 3 genes relacionados con la activación defensiva en planta en ambos tratamientos: se estudiaron el precursor de la proteína relacionada con la patogénesis básica (PR-1), un gen marcador de la vía de señalización del SA y dos marcadores de los inhibidores de la proteinasa de la planta (SI-PI-I y SI-PI-II).

Para la extracción y cuantificación de la expresión génica se siguió la metodología descrita por Pérez-Hedo *et al. Journal of Pest Science* 3: 543-554 (2015). Los cebadores empleados fueron directo (*forward*): 5'- CTCATATGAGACGTCGAGAAG-3' (SEQ ID NO: 1) e inverso (*reverse*): 5'-GGAAACAAGAAGATGCAGTACTTAA -3' (SEQ ID NO: 2) para la cuantificación del PR1, *forward*: 5'-TGAAACTCTCATGGCACGAA-3' (SEQ ID NO: 3) y *reverse*: 5'- TTTTGACATATTGTGGCTGCTT-3' (SEQ ID NO: 4) para SI-PI-I, y *forward*: 5'-GGCCAAATGCTTGACCTTT-3' (SEQ ID NO: 5) y *reverse*: 5'-CAACACGTGGTACATCCGGT-3' (SEQ ID NO: 6) para el gen SI-PI-II. Los nucleótidos del gen constitutivo EF1 fueron *forward*: 5'-GATTGGTGGTATTGGAAGTGC-3' (SEQ

ID NO: 7) y reverse: 50-AGCTTCGTGGTGCATCTC-30 (SEQ ID NO: 8).

Tras comprobar que la exposición a los tres volátiles activaba genes relacionados con las defensas de las plantas, se seleccionó de entre los tres volátiles el propanoato de (Z)-3-hexenilo como modelo de los ésteres de (Z)-3-hexenilo.

Se estudió si la activación defensiva conseguida por la exposición a propanoato de (Z)-3-hexenilo podía tener un efecto de repelencia y/o atracción en herbívoros que atacan al tomate, la mosca blanca *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae), el trips *Frankliniella occidentalis* Pergande (Thysanoptera: Thripidae), la araña roja *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) y el barrenador del tomate, *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae), y en un enemigo natural que se ha venido utilizando como organismo modelo en este cultivo, el parasitoide *Encarsia formosa* Gahan (Hymenoptera: Aphelinidae).

Las ninfas de último estadio de *B. tabaci* y las pupas de *E. formosa* fueron proporcionadas por Koppert Biological Systems, S.L. (Águilas, Murcia, España). Los adultos de *B. tabaci* recién emergidos (de menos de 2 días de edad) se liberaron en plantas de tomate en el interior de jaulas de plástico (BugDorm-2) de 60 x 60 x 60 cm y se colocaron en una cámara climática a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, $65 \pm 10\%$ HR y un 14:10 h (L: D) fotoperíodo en IVIA. Se usaron *B. tabaci* adultos de cinco días en todos los experimentos. En el caso de *E. formosa*, las pupas se depositaron en una placa de Petri de 9 cm de diámetro y se dejaron emerger en condiciones ambientales de laboratorio ($25 \pm 2^\circ\text{C}$), con una pequeña gota de miel como alimento. Se usaron hembras de *E. formosa* de menos de dos días de edad en todos los experimentos. Los adultos de *F. occidentalis* procedían de una cría mantenida en cautividad establecida en el Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA) en 2010, procedente originalmente del Campo de Cartagena (Murcia, España). La cría de trips se mantuvo en vainas de judía (*Phaseolus vulgaris* L.; Fabales: Fabaceae) en las mismas condiciones descritas anteriormente. Todas las hembras de *F. occidentalis* utilizadas para la experimentación tenían menos de cinco días. Los adultos de *T. urticae* se obtuvieron de una colonia establecida en el IVIA en 2011 cuya procedencia original eran clementinos localizados en La Plana (Castelló, España). Los ácaros se mantenían en plantas de tomate en una cámara climática en las mismas condiciones descritas anteriormente. Las hembras de *T. absoluta* se obtuvieron de colonias sobre tomate mantenidas en un invernadero del

IVIA a $25 \pm 4^{\circ}\text{C}$, $60 \pm 15\%$ HR y bajo fotoperiodo natural. Se utilizaron hembras adultas recién emergidas de menos de 5 días en todos los ensayos.

Para evaluar la preferencia de *F. occidentalis*, *B. tabaci*, *T. urticae*, *T. absoluta* y *E. formosa* a plantas de tomate que estuvieron expuestas previamente durante 24 h a (Z)-3-HP en relación con las plantas intactas se utilizó un olfactómetro en forma de Y. Las plantas se expusieron a ambos volátiles como se describió anteriormente con el uso de las porciones de papel de filtro. El olfactómetro (Analytical Research Systems, Gainesville, FL) consistía en un tubo de vidrio en forma de Y de 2,4 cm de diámetro con una base de 13,5 cm de largo y dos brazos cada uno de 5,75 cm de largo. Ambos brazos laterales se conectaron a través de tubos de polietileno de alta densidad (HDPE) a dos frascos de vidrio idénticos (volumen de 5 litros), cada uno de los cuales se conectó a una bomba de aire que produjo un flujo de aire humidificado unidireccional a 150 ml / min (Pérez-Hedo et al. Journal o Pest Science 3: 543-554 (2015)).

Para cada especie se introdujo una hembra individualmente en el tubo de entrada del olfactómetro y se observó hasta que había caminado al menos 3 cm por uno de los brazos de elección o hasta que habían transcurrido 15 minutos. Se registraron un total de 40 réplicas válidas para cada especie para cada par de fuentes de olor. Cada individuo fue probado solo una vez. Las hembras que no eligieron un brazo lateral en 15 minutos se registraron como "no respuesta" y se excluyeron del análisis de datos. Después de registrar cinco respuestas, el tubo Y se enjuagó con agua jabonosa y luego se limpió con acetona y se dejó secar durante 5 minutos. Las fuentes de olor se cambiaron posteriormente entre los brazos laterales izquierdo y derecho para minimizar cualquier efecto espacial en la elección. Los dos tipos de plantas (intactas e inducidas) se usaron solo una vez para evaluar la respuesta de 10 hembras y luego se reemplazaron con plantas nuevas. El experimento con el tubo en Y se realizó en las siguientes condiciones ambientales: $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y $60 \pm 10\%$ de HR.

También se estudió si la activación defensiva inducida por la exposición a propanoato de (Z)-3-hexenilo podía influenciar el desarrollo de dos fitófagos de gran importancia en el cultivo del tomate, la araña roja, *T. urticae* y el lepidóptero *T. absoluta*. Los individuos utilizados en estos experimentos procedían de las crías en cautividad de estas especies que se mantienen en el IVIA descritas anteriormente. Sobre ambos fitófagos se probó de dos maneras distintas el tiempo de exposición de la planta al volátil, una donde la

planta tan solo estuvo 24 horas expuesta al volátil y a continuación se liberó inmediatamente el herbívoro a ensayar y el otro donde el volátil estuvo expuesto de forma permanente a lo largo de todo el experimento.

- 5 Para ello se utilizaron 2 cámaras climáticas bajo las mismas condiciones ambientales [25 ± 2 °C, $65 \pm 5\%$ HR y 14:10 h (L: D) de fotoperiodo], donde, para evitar interferencias entre los volátiles, una se asignó a los tratamientos de propanoato de (Z)-3-hexenilo y otra al tratamiento de control. En la cámara climática donde se ensayó la exposición al propanoato de (Z)-3-hexenilo se colocaron 12 jaulas de plástico (60 cm × 60 cm × 60
10 cm) (BugDorm-2. MegaView Science Co., Ltd., Taichung, Taiwán), seis por cada tratamiento probado (24 h de exposición y exposición permanente) mientras que en la cámara climática donde se ensayó el tratamiento de control se colocaron seis jaulas. Las jaulas se distribuyeron equitativamente a una distancia de un metro y medio entre ellas. Cada jaula representaba una réplica. En cada jaula se colocaron en la parte
15 inferior dos porciones de papel de filtro impregnadas tal como se explicó anteriormente tanto para el tratamiento con propanoato de (Z)-3-hexenilo como para el control. En el tratamiento donde los volátiles se expusieron durante todo el experimento, las porciones de papel de filtro impregnado se reemplazaron cada dos días.
- 20 En cada jaula se introdujeron ocho plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* cv. *Moneymaker*). En el experimento con *T. urticae*, para evitar el movimiento de los ácaros de una planta a otra, las plantas se aislaron individualmente, sin tocarse entre sí ni con las paredes de la jaula. Además, las plantas se colocaron sobre un pequeño ladrillo dentro de una bandeja de plástico llena de agua, y todas las macetas se pintaron con
25 una banda de pegamento. Las plantas se infestaron artificialmente con *T. urticae* de la población de laboratorio mencionada anteriormente. Veinte hembras de *T. urticae* se liberaron por planta, distribuidas equitativamente en todas las hojas con la ayuda de un pincel fino. Se realizaron muestreos a ojo desnudo, siete, 14 y 21 días después de la liberación de *T. urticae*, donde se contó el número total de hembras de *T. urticae* en
30 cada planta.

Para evaluar el efecto de la exposición a ambos volátiles sobre *T. absoluta*, se realizaron dos experimentos consecutivos. En el primero, se estudió el efecto sobre la puesta de *T. absoluta*. Los huevos seleccionados puestos en el primer experimento se usaron
35 posteriormente en el segundo para estudiar la mortalidad de los inmaduros de *T.*

absoluta desarrollados en plantas expuestas al propanoato de (Z)-3-hexenilo. Los mismos tres tratamientos descritos anteriormente para *T. urticae* se ensayaron también para *T. absoluta*. La puesta de *T. absoluta* se evaluó en 8 plantas de tomate (cv. Moneymaker) por tratamiento. Cada una de las plantas se aisló dentro de una jaula de plástico (60 x 60 x 60 cm) (BugDorm-2) y se mantuvieron en una cámara climática a 25 ± 2 °C, $65 \pm 5\%$ HR, 14:10 (L: D) h fotoperiodo siguiendo la misma distribución de ensayo descrita para *T. urticae*. Dentro de cada jaula (réplica), se liberaron 2 parejas adultas de *T. absoluta* (machos y hembras) y se dejaron sin perturbar durante 72 horas. Después de este tiempo, se eliminaron los adultos de *T. absoluta* y se contó el número de huevos.

Para estudiar la mortalidad de *T. absoluta* en las plantas expuestas a los 3 tratamientos descritos anteriormente, 6 huevos de *T. absoluta* por planta se distribuyeron por igual en todas las hojas con la ayuda de un pincel fino. Los huevos utilizados en cada tratamiento provinieron del tratamiento correspondiente del primer experimento. Se evaluó la mortalidad de *T. absoluta* en 8 plantas de tomate (cv. Moneymaker) por tratamiento. Cada una de las plantas se aisló dentro de una jaula de plástico (60 x 60 x 60 cm) (carpas de insectos BugDorm-2) mantenidas en una cámara climática a 25 ± 2 °C, $65 \pm 5\%$ HR, 14:10 (L: D) h fotoperiodo siguiendo la misma distribución de tratamiento descrita anteriormente. Las plantas se dejaron intactas hasta que emergieron los adultos de *T. absoluta*. Tan pronto como los adultos comenzaron a emerger, se contaron y se retiraron diariamente de las jaulas.

Resultado

La exposición a los tres volátiles propanoato de (Z)-3-hexenilo, acetato de (Z)-3-hexenilo de y butanoato de (Z)-3-hexenilo de plantas intactas de tomate sobreexpresó significativamente los tres marcadores estudiados respecto al control, sin encontrar diferencias entre ellos (Figura 1 A,B,C). PR-1: $F_{1-19} = 14,09$; $P < 0,0001$ SPI-1: $F_{1-19} = 21,91$; $P < 0,0001$ y SPI-2: $F_{1-19} = 16,28$; $P < 0,0001$.

Las plantas activadas expuestas 24 horas a propanoato de (Z)-3-hexenilo resultaron ser repelentes frente a plagas de gran importancia en el tomate como son el lepidóptero *T. absoluta* ($\chi^2 = 9.80$; $P = 0.0017$), la mosca blanca *B. tabaci* ($\chi^2 = 12.80$; $P = 0.0003$) y el trips *F. occidentalis* ($\chi^2 = 5.00$; $P = 0.0253$) (Figura 1D). Además, las plantas expuestas a este volátil fueron más atrayentes para el parasitoide *E. formosa* ($\chi^2 = 5.00$; $P =$

0.0253). La araña roja *T. urticae* fue la única especie que no mostró preferencia ($\chi^2 = 1.80$; $P = 0.1797$) (Figure 1D).

En el caso de la araña roja, a los 21 días tras su liberación, se obtuvo una reducción del
 5 número de ácaros por planta del $50,3 \pm 6,3$ % y del $83,9 \pm 5,0$ % respecto al control, en
 los tratamientos donde se mantuvo la planta expuesta 24 h y durante todo el
 experimento al propionato de (Z)-3-hexenilo, respectivamente ($F_{4,85} = 4,437$; $P = 0.003$)
 (Figura 1E). En el caso de *T. absoluta*, en el tratamiento de exposición permanente a
 (Z)-3-HP se obtuvo una reducción de la puesta de $67,2 \pm 15,0$ % respecto al control
 10 ($F_{2,23} = 3.746$; $P = 0.0406$) (Figura 1F). Además, la mortalidad desde huevo a adulto de
T. absoluta en plantas expuestas permanentemente a (Z)-3-HP se situó en torno al 80%,
 lo cual fue significativamente mayor que el tratamiento control ($F_{2,23} = 6.944$; $P = 0.0048$)
 (Figura 1G). la puesta ($F_{2,23} = 1.147$; $P = 0.3367$) ni en la mortalidad ($F_{2,23} = 0.5881$; $P =$
 0.5643) de *T. absoluta*.

15

Ejemplo 2: Ensayos de liberación en semicampo con distintas dosis de aplicación del propionato de (Z)-3-hexenilo desde emisores pasivos de tipo polimérico.

Metodología

20 Para comprobar el nivel de activación que pueden proporcionar diferentes niveles de
 emisión del propionato de (Z)-3-hexenilo se utilizaron dos tipos diferentes de emisores
 poliméricos: (LD) vial de polietileno de baja densidad de 4-ml y (HD) vial de polietileno
 de alta densidad de 4-ml. Mediante estudios previos en laboratorio, el nivel más alto de
 emisión (5 mg/día) se consiguió con emisores LD cargados con 20 mg de la sustancia
 25 pura. El nivel de emisión más bajo (0,01 mg/día) lo proporcionaron los viales HD
 cargados con una mezcla 1:100 de propionato de (Z)-3-hexenilo y aceite parafínico
 (0,02:2; g:g). Durante los experimentos se controló la cinética de emisión de los
 emisores utilizados mediante el estudio de la pérdida de peso (método gravimétrico). Se
 colocaron emisores adicionales en las mismas condiciones ambientales, midiendo
 30 semanalmente su peso con una balanza de precisión (0.0001 g). La diferencia de peso
 registrada en cada periodo será la cantidad emitida de la sustancia para cada tipo de
 emisor. Para obtener el nivel de emisión medio de cada emisor, los pesos registrados
 (y) se relacionan con el tiempo de envejecimiento (x) por medio de un análisis de
 regresión múltiple.

35 Una vez establecidos los niveles de emisión mencionados, 5 y 0,01 mg/día/difusor, se

expusieron las plantas de tomate a los distintos niveles de emisión mediante un experimento en condiciones de semicampo, en invernadero de cristal. Para ello, se contó con tres cabinas de 24 m² para los distintos tratamientos: (CONTROL) sin emisores del volátil, (HD) con 1 emisor de 0,01 mg/día, y (LD) con 1 emisor de 5 mg/día.

5 La humedad relativa fue del 65% ± 10% y el fotoperíodo fue natural (aproximadamente 14:10 h L: D) en los tres cubículos. Las condiciones ambientales se controlaron y registraron utilizando un registrador de datos Mithra clima (ver. 1.01.03, Priva nutricontrol Ibérica S.L). En cada uno de los tres cubículos se transplantaron 30 plantas de tomate en macetas individuales de polietileno de 20 litros llenas con una mezcla de

10 arena y turba (1: 2 w: w, respectivamente). Las macetas se distribuyeron en cada cabina en cuatro filas de cinco plantas cada una (2 plantas / m²). Se siguieron las técnicas de cultivo típicas del cultivo de tomate en invernadero en España: entutorado a una guía para cada planta, poda semanal de brotes secundarios, aplicación de una solución nutritiva estándar para tomate mediante un sistema de riego automatizado con una

15 frecuencia de riego ajustada a las condiciones ambientales y un tiempo de riego de 15 min. Los difusores se colocaron a 50 cm por encima del ápice de las plantas de tomate y se adaptaron en altura según el crecimiento de las plantas.

Los emisores se mantuvieron dentro de las cabinas correspondientes durante todo el

20 ensayo y se tomaron muestras de las plantas de cada cabina a las 4 semanas tras la instalación del tratamiento. De dichas muestras se estudió la respuesta transcripcional del gen defensivo PIN2 (un gen marcador para la vía de señalización de ácido jasmónico, JA). Se realizaron cinco repeticiones por tratamiento. Para la extracción y cuantificación de la expresión génica se siguió la metodología descrita por Pérez-Hedo

25 et al. Journal of Pest Science 3: 543-554 (2015). Las secuencias del cebador empleado para la cuantificación del gen PIN2 fue directa (*forward*): 5'-GAAAATCGTTAATTTATCCCAC-3' (SEQ ID NO: 9) y inversa (*reverse*): 5'-ACATACAAACTTTCCATCTTTA-3' (SEQ ID NO: 10), mientras que el gen constitutivo EF1 las secuencias fueron *forward*: 5'-GATTGGTGGTATTGGAAGTGC-3' (SEQ ID

30 NO: 7) y *reverse*: 50-AGCTTCGTGGTGCATCTC-30 (SEQ ID NO: 8).

Resultados

Los estudios de expresión mostraron que el nivel más bajo de emisión de propionato de (Z)-3-hexenilo (0,01 mg/día) no tuvo ningún efecto sobre las plantas expuestas. Sin

35 embargo, una emisión de 5 mg/día consiguió una activación significativa de la ruta

metabólica del ácido jasmónico (Figura 2).

Ejemplo 3. Ensayos de activación defensiva en tomate vía exposición en condiciones de campo

5

Metodología

Para conocer el comportamiento de los difusores cargados con propionato de (Z)-3-hexenilo bajo condiciones reales de cultivo se seleccionaron cuatro invernaderos comerciales de tomate cv Raf localizados en Xilxes (provincia de Castellón) con un
 10 histórico de problemas de *T. absoluta* a la salida del invierno. Se realizó un diseño experimental de bloques al azar donde cada invernadero se consideró un bloque con dos tratamientos por bloque y 4 repeticiones por tratamiento. En dichos invernaderos de tomate se viene utilizando al depredador zoofitófago *Nesidiocoris tenuis* Reuter (Hemiptera: Miridae) el cual se libera desde el semillero a finales de agosto y mantiene
 15 las poblaciones de fitófagos plaga bajo control tras su trasplante en invernadero a final de agosto hasta la llegada del invierno. Sin embargo, las poblaciones de este depredador descienden bruscamente bajo las condiciones ambientales que se dan en invierno. A la salida del invierno sus poblaciones empiezan a recuperarse lentamente de tal forma que las poblaciones de *T. absoluta* lo hacen más rápido y es común recurrir
 20 a insecticidas selectivos durante la primavera para mantener a raya a *T. absoluta*. Por tanto, se consideró estos invernaderos un marco idóneo donde confirmar el efecto sobre *T. absoluta* encontrado en condiciones de laboratorio.

El cultivo se inició el 4 de septiembre de 2018 con el trasplante con un marco de
 25 plantación de 0,4 x 1 m lo cual resultó en 1,2 plantas por metro cuadrado (25.450 plantas en 21.200 m²). Se siguieron las técnicas de cultivo comunes en la zona: el tallo principal se llevó a dos brazos, se podaron semanalmente brotes secundarios y hojas senescentes y se aplicó semanalmente una solución nutritiva estándar para tomate mediante un sistema de riego por goteo automatizado. Las plantas trasplantadas se
 30 inocularon en semillero con el depredador *N. tenuis*. Se liberó una dosis de 1 *N. tenuis* por planta en el vivero y se usaron huevos de *E. kuehniella* como presa alternativa (Urbaneja-Bernat *et al.* Journal of Applied Entomology 139: 61-167 (2015)). Desde la fecha de siembra hasta el día en que se colgaron los difusores, ninguno de los invernaderos recibió tratamiento químico alguno y el control de plagas residió solo en el
 35 depredador *N. tenuis*.

Tal como se ha comentado anteriormente, se seleccionaron 2 zonas en cada uno de los invernaderos en las cuales en una de ellas el 22 de febrero 2019 se colgó un difusor ((LD) vial de polietileno de baja densidad de 4-ml) cargado de 4 ml de propanoato de (Z)-3-hexenilo cada 20 m² y la otra de igual superficie se utilizó como tratamiento control. En las cuatro zonas con volátil, se colocaron un total de 260 difusores en una superficie total de 5,200 m² (equivalente a una densidad de 500 difusores/ha). Tal y como se describe en el ejemplo 2, se estudió la cinética de emisión de los difusores por medio del método gravimétrico.

Se muestrearon semanalmente durante 11 semanas, veinte plantas elegidas al azar por repetición, comenzando el 30 de enero de 2019. En primer lugar, se contó el número de foliolos infestados por *T. absoluta* por planta. Luego se contó el número de *N. tenuis* (adultos y ninfas) en todo el tercio apical de cada planta (hojas, flores y brotes). Siguiendo la metodología descrita anteriormente, se tomaron 6 muestras de la parte apical de cada planta por repetición que se introdujeron inmediatamente en nitrógeno líquido para cuantificar la expresión de los genes PR1 y del PIN2 (descritos en el ejemplo 1 y ejemplo 2). La expresión de estos genes se cuantificó un día antes, 4 y 8 semanas después de colgar los difusores en los invernaderos.

Resultado

Al iniciar el ensayo la expresión de ambos genes marcadores de rutas de defensa era igual, pero a los 30 y a los 60 días la expresión de ambos genes fue significativamente mayor en las plantas expuestas al volátil en comparación a las plantas de la zona control (Figure 3 A,B) (Tabla 1).

Tabla 1. Valores de la probabilidad para la comparación por pares de la respuesta transcripcional de los genes defensivos PR1 (un gen marcador para la ruta de señalización SA) y PIN2 (un gen marcador para la ruta de señalización JA) en plantas de tomate expuestas a propanoato de (Z)-3-hexenilo [(Z) -3-HP] liberado en un difusor polimérico (LD) vial de polietileno de baja densidad de 4 ml (Kartell) y en plantas de tomate del control 24 horas antes y 4 y 8 semanas después de establecimiento de los difusores en los invernaderos de tomate. Los valores en negrita corresponden a valores estadísticamente significativos. Prueba *t* (*P* <0.05).

	Control vs (Z)-3-HP	PR1		PIN2	
		t_{14}	P	t_{14}	P
5	1 día antes	0.2464	0.8089	0.4412	0.6658
	4 semanas	2.379	0.0321	3.037	0.0089
	8 semanas	3.490	0.0040	2.263	0.0400

La población del mío, *N. tenuis* se mantuvo igual en ambos tratamientos ($F_{1, 86} =$
 10 2,112; $P = 0,150$) (Figura 3C), pero no así la infestación de *T. absoluta*, la cual fue
 significativamente menor (aprox. el 58%) en el tratamiento con volátil ($F_{1, 86} = 11,375$; P
 $< 0,0001$) (Figura 3D). El volátil propanoato de (Z)-3-hexenilo volátil se emitió de manera
 sustancialmente constante durante el período de estudio a una tasa media de 12,2 mg
 / día, según la pendiente del modelo ajustado (Figura 3E), lo que supone una dosis de
 15 aplicación aproximada de 6 g/ha/día.

Ejemplo 4. Ensayos de activación defensiva en cítricos vía exposición en condiciones de laboratorio

Para demostrar que la exposición al volátil propanoato de (Z)-3-hexenilo activa defensas
 20 en plantas de cítricos se utilizaron plántulas del patrón citrange Carrizo (*Citrus sinensis*
 Osb. $\times$ *Poncirus trifoliata* L. Raf.). Dos semanas tras la germinación de las semillas, las
 plántulas se trasplantaron individualmente en macetas (8 $\times$ 8 $\times$ 8 cm). Las plantas se
 mantuvieron en un invernadero con cubierta plástica a unas condiciones climáticas
 aproximadas de 25 ± 5 °C, una humedad relativa del $65\% \pm 5\%$ y un fotoperiodo de luz
 25 natural, aproximadamente 14:10 h (luz: oscuridad). Se utilizaron plantas de citrange
 Carrizo que no habían recibido ningún tratamiento plaguicida a las 8 semanas de edad
 (aproximadamente 20 cm de altura). El volátil propanoato de (Z)-3-hexenilo se consiguió
 a través de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). El volátil se expuso mediante la
 utilización de una porción de papel de filtro de 2 $\times$ 2 cm sobre el cual se impregnó 10 μ l
 30 de una disolución que contenía el volátil correspondiente a una concentración de
 1:10.000 [propanoato de (Z)-3-hexenilo:metanol] como fuente emisora del volátil
 correspondiente (Pérez-Hedo, M. et al. Biocontrol, 63: 203-213 (2018)).

Para activar una planta se colocaron dos porciones de papel de filtro impregnadas con
 35 el volátil en la parte inferior de una jaula de plástico de 30 $\times$ 30 $\times$ 30 cm (BugDorm-1
 Insect Tents; MegaView Science Co., Ltd, Taichung, Taiwan) en la cual se introdujo la
 planta. Se realizó un tratamiento control en el cual las dos porciones de papel de filtro

se impregnaron con 10.000 µl de metanol. Se realizaron seis repeticiones por tratamiento. Las plantas de ambos tratamientos se mantuvieron expuestas al volátil sin perturbar durante 24 horas en cámaras climáticas separadas y aisladas para evitar cualquier interferencia del volátil y se mantuvieron a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, $65 \pm 10\%$ HR y un fotoperíodo de 14:10 h (L: D). Transcurridas las 24 horas se estudió la expresión de 3 genes relacionados con la activación defensiva en planta en ambos tratamientos: se estudiaron un precursor de ácido jasmónico JA (LOX2) y dos relacionados con la ruta del ácido salicílico un downstream (PAL), y un precursor (NPR1).

Para la extracción y cuantificación de la expresión génica se siguió la metodología descrita por Pérez-Hedo et al. Journal of Pest Science 3: 543-554 (2015). Los cebadores empleados fueron directa (forward): 5'- GAACCATATTGCCACTTTTCG -3' (SEQ ID NO: 11) e inversa (reverse): 5'- CGTCATCAATGACTTGACCA -3' (SEQ ID NO: 12) para la cuantificación del LOX2, forward: 5'- CACATTCTTGGTAGCGCTTTG-3' (SEQ ID NO: 13) y reverse: 5'- AGCTACTTGGCTGACAGTATTC-3' (SEQ ID NO: 14) para PAL y forward: 5'- TACCTCCACCTCTCTCATTCTT-3' (SEQ ID NO: 15) y reverse: 5'- GTGCGAGAGAAGGTTAGCTATG-3' (SEQ ID NO: 16) para el gen NPR5. Los nucleótidos del gen constitutivo gene glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) fueron forward: 5'-GGAAGGTCAAGATCGGAATCAA-3' (SEQ ID NO: 17) y reverse: 5'-CGTCCCTCTGCAAGATGACTCT-3' (SEQ ID NO: 18).

Para evaluar la preferencia de hembras de *D. citri* y del parasitoide *T. radiata* a plantas de citrange Carrizo que estuvieron expuestas previamente durante 24 h a (Z)-3-HP en relación con las plantas intactas se utilizó un olfactómetro en forma de Y de igual forma al descrito en el ejemplo 1 y las plantas se expusieron a ambos volátiles como se describió anteriormente con el uso de las porciones de papel de filtro. Se registraron un total de 40 réplicas válidas para cada especie para cada par de fuentes de olor. Cada individuo fue probado solo una vez. Las hembras que no eligieron un brazo lateral en 15 minutos se registraron como "no respuesta" y se excluyeron del análisis de datos.

Después de registrar cinco respuestas, el tubo Y se enjuagó con agua jabonosa y luego se limpió con acetona y se dejó secar durante 5 minutos. Las fuentes de olor se cambiaron posteriormente entre los brazos laterales izquierdo y derecho para minimizar cualquier efecto espacial en la elección. Los dos tipos de plantas (intactas e inducidas) se usaron solo una vez para evaluar la respuesta de 10 hembras y luego se reemplazaron con plantas nuevas. El experimento con el tubo en Y se realizó en las

siguientes condiciones ambientales: 25 ± 1 ° C y $60 \pm 10\%$ de HR.

Los adultos de *D. citri* se obtuvieron de una colonia establecida en el SWFREC (University of Florida) cuya procedencia original eran cítricos localizados en sus parcelas experimentales. Los parasitoides se colectaron en dichos campos experimentales. Se utilizaron hembras adultas recién emergidas de menos de 5 días en todos los ensayos.

Resultado

La exposición al volátil propanoato de (Z)-3-hexenilo a plantas intactas de citrange Carrizo sobreexpresó significativamente los tres marcadores estudiados (fig. 4A, B y C). Las plantas activadas expuestas 24 horas a propanoato de (Z)-3-hexenilo resultaron ser altamente atractivas al parasitoide *Tamarixia radiata* ($\chi^2 = 6,914$; $P = 0.0043$) y se mostraron indiferentes frente a *Diaphorina citri* ($\chi^2 = 1,429$; $P = 0.1160$) (fig. 4D).

15 Ejemplo 5. Respuesta a la activación defensiva en cítricos en condiciones de campo

Metodología

Eficacia del uso de difusores cargados con HP en campo.

20

Se seleccionó un campo de naranjas Valencia con alta presencia de brotes receptivos y una población de adultos de *D. citri* localizado en los campos experimentales de SWFREC (University of Florida). El campo tenía una extensión aproximada de 0,3 ha. Se utilizaron plantas centinela que se colgaron en el interior de la copa del árbol. Las plantas centinelas eran plántones de *Murraya paniculata* con brotes receptivos a la puesta de *D. citri*. Se utilizaron 7 plántones con difusor (difusor polimérico que se cargó con 1,5 ml de propanoato de (Z)-3-hexenilo y 7 plántones sin difusor. Cada plantón se distribuyó en el campo siguiendo un diseño de bloques al azar (utilizando fila de árboles como bloque) y en cada bloque se colocó un plantón con difusor y otro sin. Los plántones se localizaron a una distancia mínima entre ellos de 50 metros para evitar cualquier efecto borde.

Tras 4 días de la colocación de los plántones, éstos se recogieron del campo y se llevaron al laboratorio donde bajo lupa binocular se contó el número de huevos por brote en cada uno de los plántones.

35

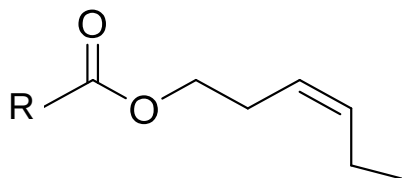
Resultado

No se encontraron diferencias entre el número de brotes receptivos entre ambos tratamientos. Al igual que lo observado anteriormente en laboratorio y en invernadero,
5 la colocación de los difusores del volátil consiguió reducir la puesta de *D. citri* en más de un 70% (**Figura 5**).

Aunque se han descrito experimentos específicos llevados a cabo con plantas de tomate y cítricos, el experto en la técnica entenderá que el compuesto descrito en la presente
10 invención (propanoato de (Z)-3-hexenilo) será igualmente útil para su uso en la protección de otro tipo de plantas mediante el estímulo o inducción de mecanismos de defensa. Asimismo, aunque se han descrito experimentos en los que se han sometido plantas de tomate a ciertas plagas, el experto en la técnica entenderá que el compuesto
15 descrito en la presente invención será igualmente útil para su uso en la protección de plantas frente a otras plagas.

REIVINDICACIONES

1. Uso de al menos un compuesto de fórmula I



5

fórmula I

donde R=-CH₃, -CH₂-CH₃ o -CH₂-CH₂-CH₃, o de una composición que lo comprende, para la protección de plantas frente a plagas mediante la estimulación de los mecanismos naturales de defensa de dichas plantas.

10

2. Uso, según la reivindicación 1, donde el compuesto de fórmula I es propanoato de (Z)-3-hexenilo.

15

3. Uso, según la reivindicación 1 ó 2, donde la protección de las plantas se produce mediante la repelencia de las plagas y/o la atracción de parasitoides de las plagas.

20

4. Uso, según la reivindicación cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde los mecanismos de defensa de las plantas provocan la repelencia de las plagas que se seleccionan de la lista que comprende: las moscas blancas *Bemisia tabaci* (Gennadius) y *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood), *Aleurothrixus floccosus* (Maskell), *Dialeurodes citri* (Ashmead) y *Paraleyrodes minei* Iaccarino (Hemiptera: Aleyroididae), los trips *Frankliniella occidentalis* Pergande, *Pezothrips kellyanus* Bagnall, *Chaetanaphothrips orchidii* (Moulton) y *Thrips tabaci* Lindeman (Thysanoptera: Thripidae), las arañas rojas *Tetranychus urticae*, *Eutetranychus orientalis* (Klein), *Eutetranychus banksi* (McGregor), *T. urticae*, *Panonychus citri* (McGregor) Koch y *Tetranychus evansi* Baker & Pritchard (Acari: Tetranychidae), los lepidópteros *Tuta absoluta* (Meyrick), *Phyllocnistis citrella* Stainton (Lepidoptera: Gracillariidae), *Spodoptera exigua* Hübner y *Helicoverpa armígera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) y los psílidos *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) y *Trioza erytreae* (Del Guercio) (Hemiptera: Psyllidae).

25

30

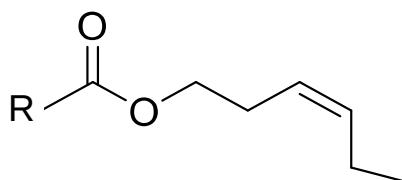
5. Uso, según la reivindicación cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 donde los

mecanismos de defensa de las plantas provocan la atracción de los parasitoides seleccionados de la lista que comprende especies de los géneros: *Encarsia* spp., *Aphytis* spp. *Cales* spp., *Eretmocerus* spp., *Aphelinus* spp., (Hymenoptera: Aphelinidae), *Aphidius* spp. *Lysiphlebus* spp. (Hymenoptera: Braconidae) *Metaphycus* spp., *Anagyrus* spp. (Hymenoptera: Encyrtidae), *Tamarixia* spp. *Citrostichus* spp., *Cirrospilus* spp., *Diglyphus* spp. (Hymenoptera: Eulophidae), *Trissolcus* spp., *Telenomus* spp. (Hymenoptera: Scelionidae) y *Trichogramma* spp. (Hymenoptera: Trichogrammatidae).

6. Uso, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde las plantas protegidas son plantas hortícolas o de cítrico.

7. Uso, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde al menos un compuesto de la fórmula I, o de una composición que lo comprende, es aplicado a las plantas mediante difusores.

8. Método para protección de plantas frente a plagas mediante la estimulación de los mecanismos naturales de defensa de dichas plantas caracterizado porque comprende poner en contacto al menos un compuesto de fórmula I, o de una composición que los comprende, con las plantas:



formula I

siendo R=-CH₃, -CH₂-CH₃ o -CH₂-CH₂-CH₃,

9. Método, según la reivindicación 8, caracterizado por que el compuesto de fórmula I es propanoato de (Z)-3-hexenilo.

10. Método, según la reivindicación 8 ó 9, caracterizado por que el compuesto de fórmula I, o de una composición que lo comprende, es puesto en contacto con la planta mediante difusores.

11. Método, según la reivindicación 10, caracterizado por que el difusor es un emisor pasivo que consisten en un contenedor del compuesto de fórmula I configurado para permitir la difusión de dicho compuesto al ambiente que rodea a la planta.
- 5 12. Método, según la reivindicación 10, caracterizado por que el difusor consiste en un nebulizador que produce un aerosol.
13. Método, según la reivindicación 10, caracterizado por que el difusor es una composición líquida o en gel que contiene el compuesto de la fórmula I y que está
10 formulada para permitir la difusión de dicho compuesto al ambiente.
14. Método según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, caracterizado por que la dosis de compuesto aplicada al ambiente que rodea a las plantas por el difusor está entre 25 mg/ha/día y 25 g/ha/día.
- 15 15. Método, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores 8 a 14, caracterizado porque los mecanismos naturales de defensa estimulados en las plantas provocan la repelencia de plagas seleccionadas de la lista que comprende: las moscas blancas *Bemisia tabaci* (Gennadius) y *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood),
20 *Aleurothrixus floccosus* (Maskell), *Dialeurodes citri* (Ashmead) y *Paraleyrodes minei* Iaccarino (Hemiptera: Aleyroididae), los trips *Frankliniella occidentalis* Pergande, *Pezothrips kellyanus* Bagnall, *Chaetanaphothrips orchidii* (Moulton) y *Thrips tabaci* Lindeman (Thysanoptera: Thripidae), las arañas rojas *Tetranychus urticae*, *Eutetranychus orientalis* (Klein), *Eutetranychus banksi* (McGregor), *T. urticae*,
25 *Panonychus citri* (McGregor) Koch y *Tetranychus evansi* Baker & Pritchard (Acari: Tetranychidae), los lepidópteros *Tuta absoluta* (Meyrick), *Phyllocnistis citrella* Stainton (Lepidoptera: Gracillariidae), *Spodoptera exigua* Hübner y *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae); y los psílidos *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) y *Trioza erytreae* (Del Guercio) (Hemiptera: Psyllidae).
- 30 16. Método, según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 15, caracterizado porque los mecanismos naturales de defensa estimulados en las plantas provocan la atracción de parasitoides seleccionados de la lista que comprende especies de los géneros: *Encarsia* spp., *Aphytis* spp., *Cales* spp., *Eretmocerus* spp., *Aphelinus* spp.,
35 (Hymenoptera: Aphelinidae), *Aphidius* spp. *Lysiphlebus* spp. (Hymenoptera:

Braconidae) *Metaphycus* spp., *Anagyrus* spp. (Hymenoptera: Encyrtidae), *Tamarixia* spp. *Citrostichus* spp., *Cirrospilus* spp., *Diglyphus* spp. (Hymenoptera: Eulophidae), *Trissolcus* spp., *Telenomus* spp. (Hymenoptera: Scelionidae) y *Trichogramma* spp. (Hymenoptera. Trichogrammatidae).

5

17. Método, según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 16, caracterizado porque la planta es una planta hortícola o un cítrico.

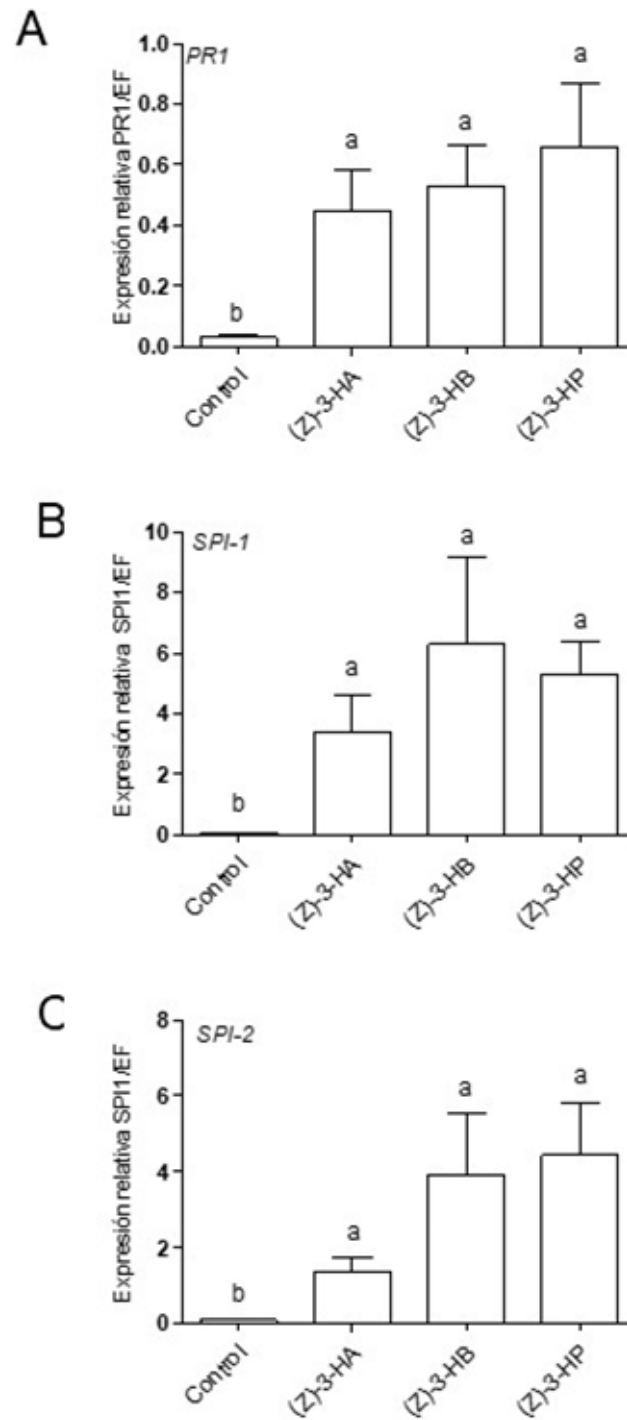


Fig. 1

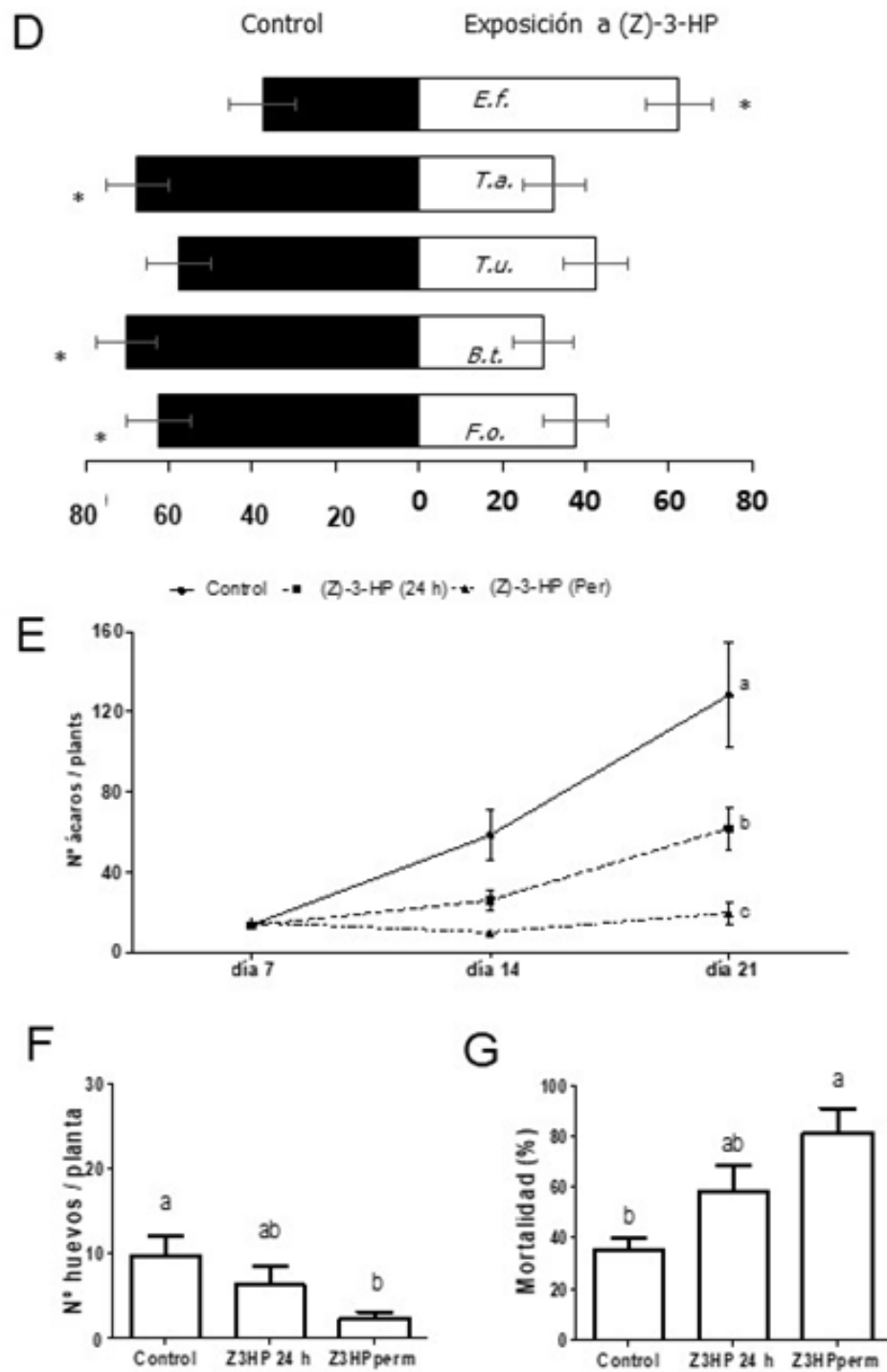


Fig 1. Cont.

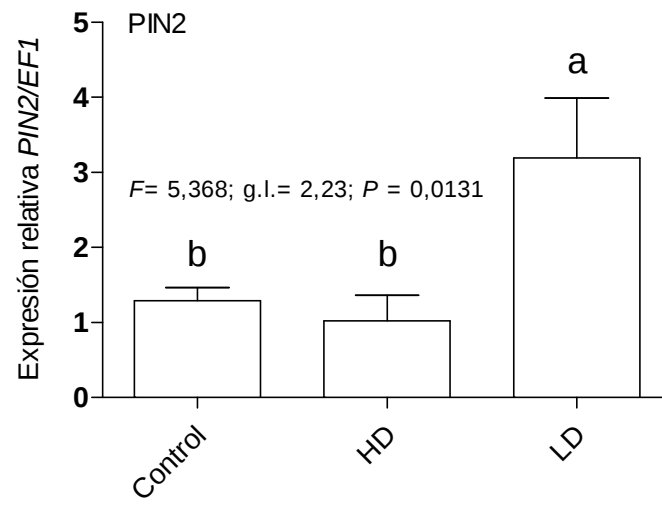


Fig. 2

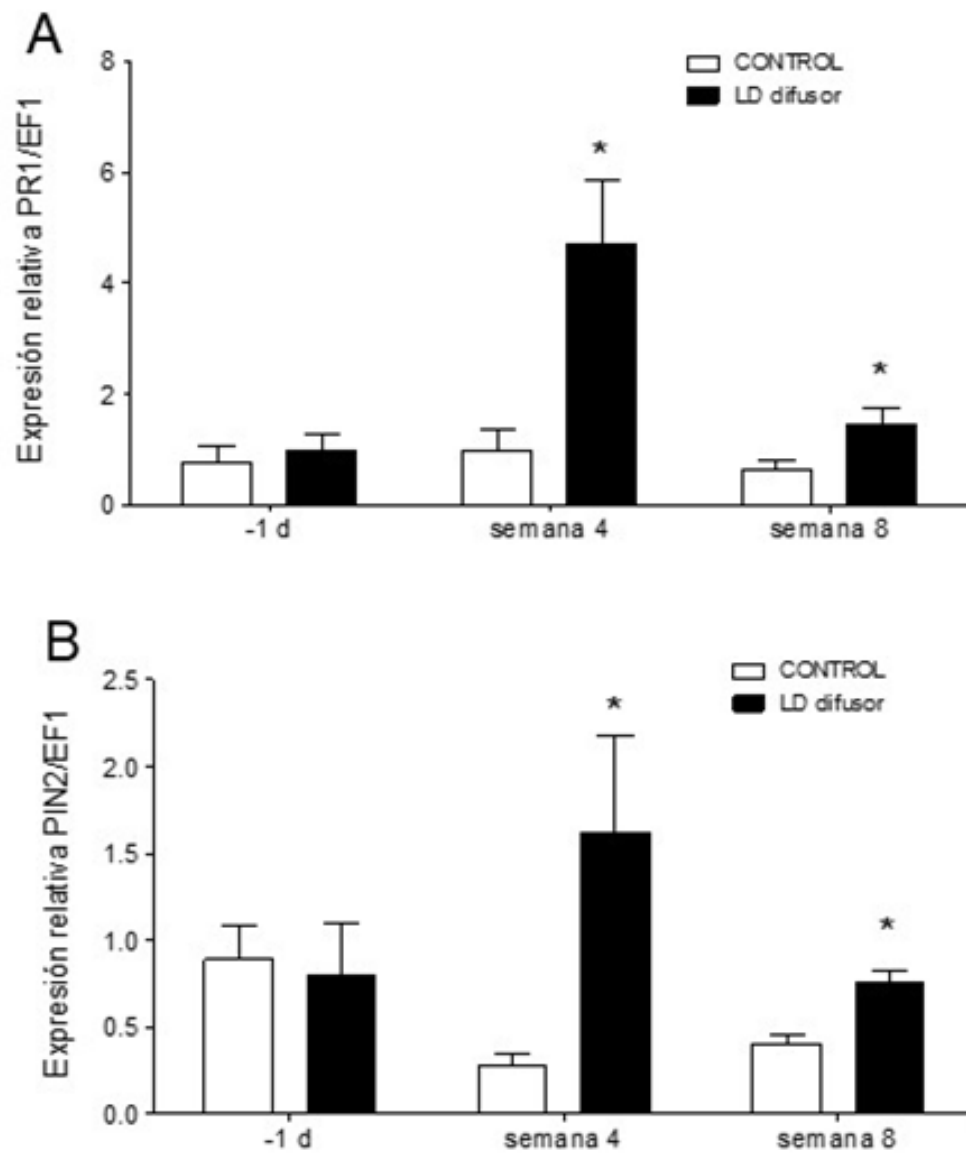


Fig. 3

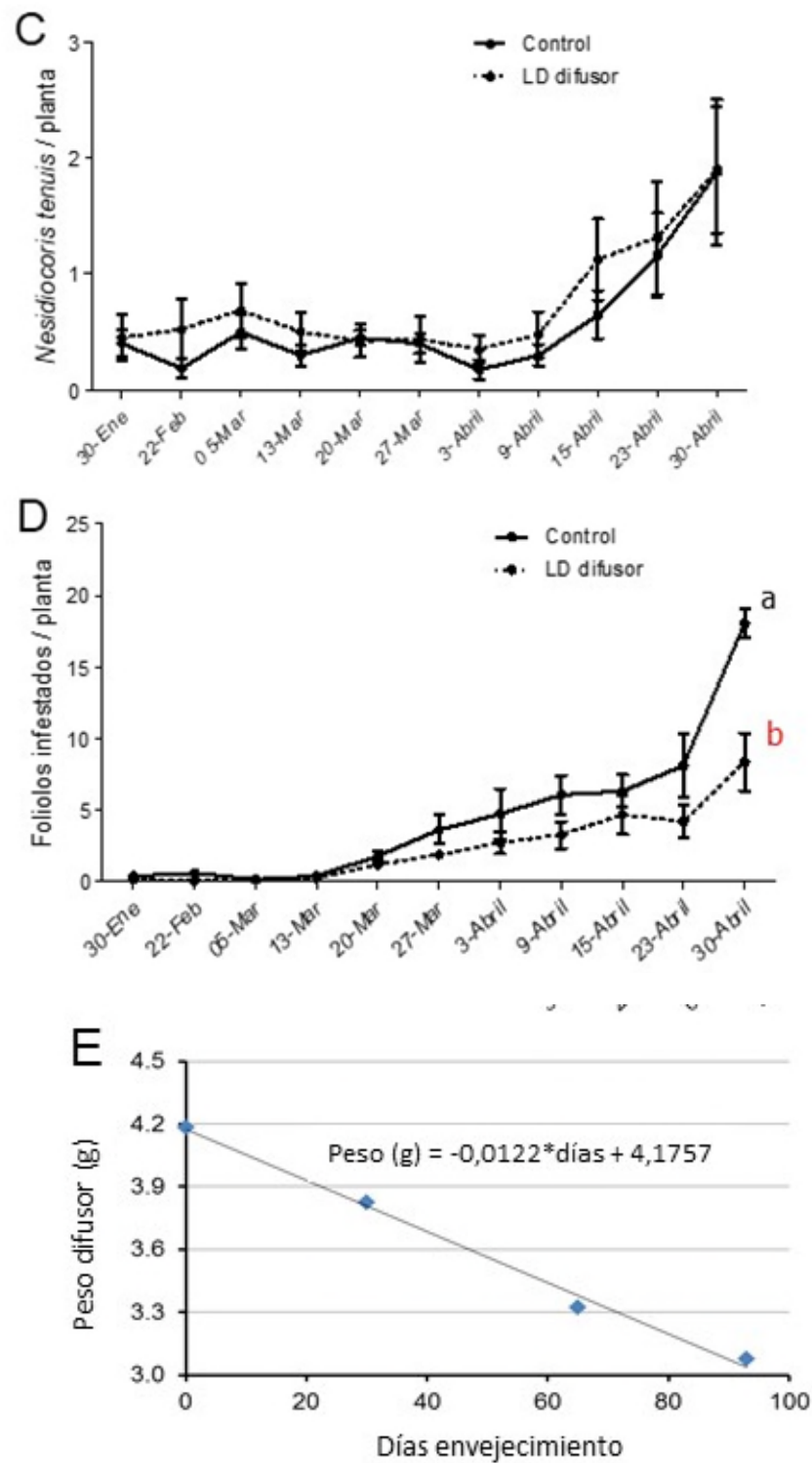


Fig. 3 cont.

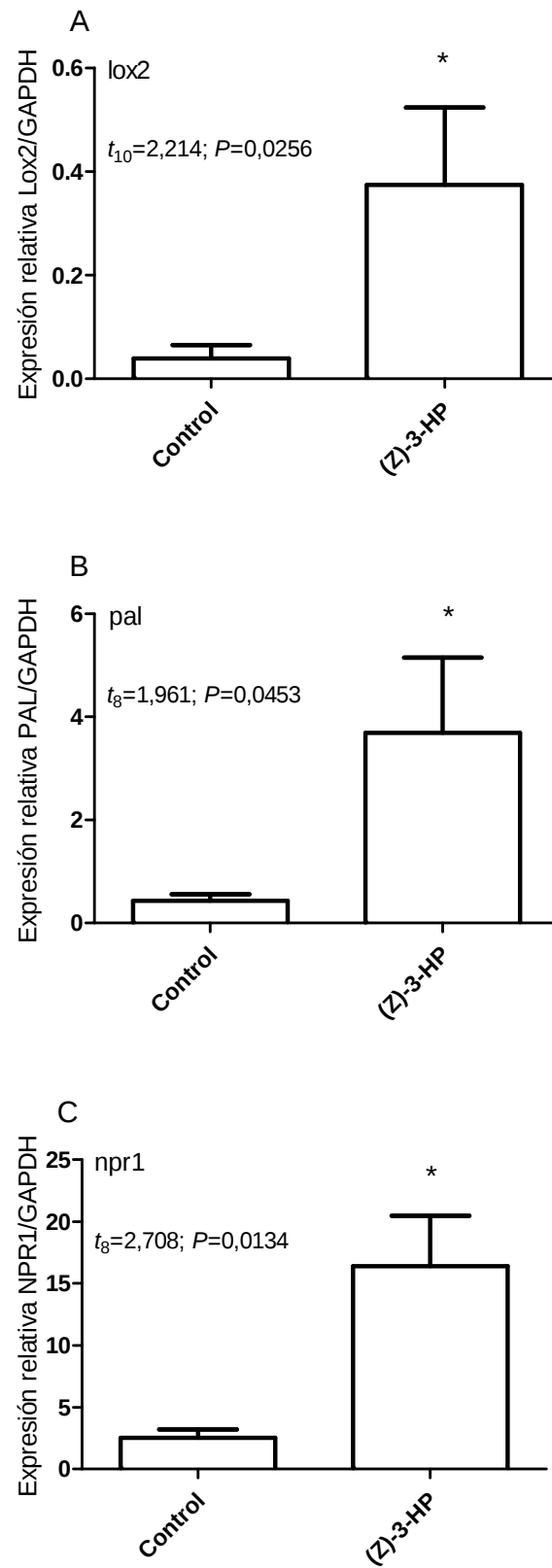


Fig. 4

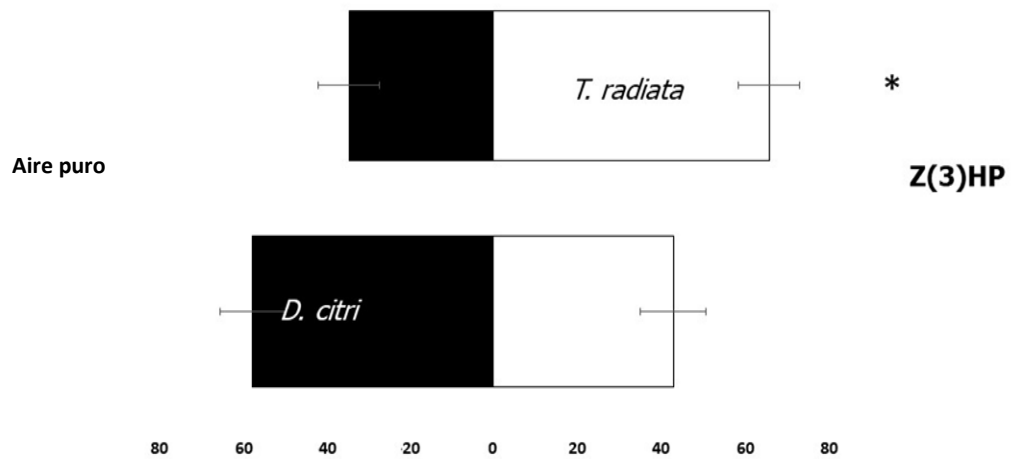


Fig. 4 cont.

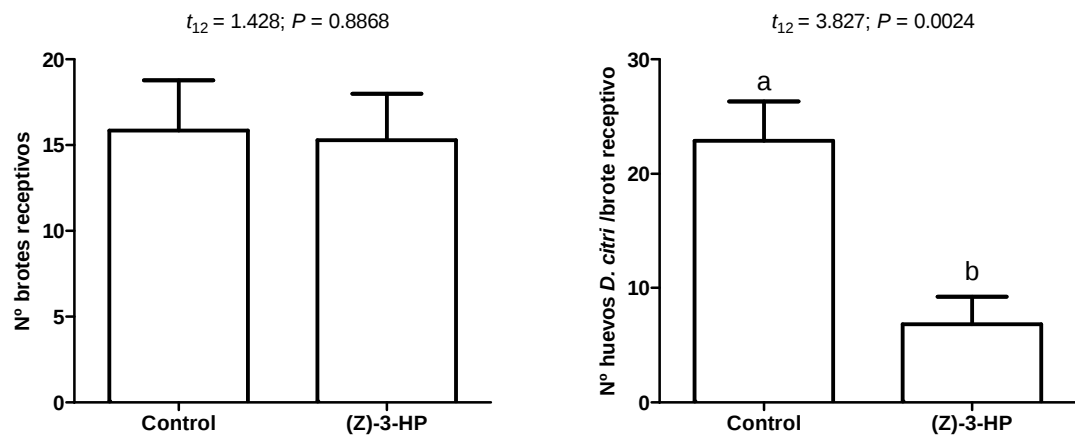


Fig. 5



- ②① N.º solicitud: 202030330
②② Fecha de presentación de la solicitud: 21.04.2020
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	GEORG VON MREY et al. Dispensing synthetic green leaf volatiles in maize fields increases the release of sesquiterpenes by the plants, but has little effect on the attraction of pest and beneficial insects. Phytochemistry ELSEVIER, AMSTERDAM, NL. 30/11/0002, Vol. 72, Páginas 1838 - 1847, ISSN 0031-9422, <DOI: doi:10.1016/j.phytochem.2011.04.022>. Ver resumen; apartados 2 y 5; figuras 4 y 6.	1, 3-8, 10-17
X	CN 106614583 A (JIANGSU ACAD AGRICULTURAL SCI) 10/05/2017, (Resumen) World Patent Index [en línea]. Londres (Reino Unido) Thomson Publications, LTD. [Recuperado el 14/05/2020] DW 201735, N° de acceso 2017-31619E.	1, 3, 6, 8, 17
X	CN 110074143 A (JINHUA ACAD OF AGRICULTURAL SCIENCES et al.) 02/08/2019, Ejemplos 1-6.	1, 3, 6, 8, 17
A	PEREZ-HEDO MERITXELL et al. Biological activity and specificity of Miridae-induced plant volatiles. BioControl (Dordrecht) APR 2018., 31/03/2018, Vol. 63, Páginas 203-213, ISSN 1386-6141(print) ISSN 1573-8248(electronic), <DOI: doi:10.1007/s10526-017-9854-4>. Ver resumen; páginas 6 y 7; figura 4.	1-17
A	GASMI, L. et al. Can Herbivore-Induced Volatiles Protect Plants by Increasing the Herbivores Susceptibility to Natural Pathogens?. INVERTEBRATE MICROBIOLOGY, 2019, Vol. 85, Páginas 1-10, <DOI: 10.1128/AEM.01468-18.>. Ver resumen.	1-17
A	GIRON-CALVA PATRICIA SARAI et al. Volatile-Mediated Interactions between Cabbage Plants in the Field and the Impact of Ozone Pollution. JOURNAL OF CHEMICAL ECOLOGY, 20170329 Springer, NL. Baker Tom; Millar Jocelyn; Zhu Junwei, 29/03/2017, Vol. 43, Páginas 339 - 350, ISSN 0098-0331, <DOI: doi:10.1007/s10886-017-0836-x>. Ver resumen; resultados.	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
18.05.2020

Examinador
N. Martín Laso

Página
1/2

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A01N37/06 (2006.01)**A01N25/18** (2006.01)**C07C69/003** (2006.01)

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

A01N, C07C

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, TXTE, NPL, XPESP, BIOSIS, MEDLINE, CAS