

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 830 475**

21 Número de solicitud: 201931071

51 Int. Cl.:

**A01N 63/30** (2010.01)  
**A01N 25/04** (2006.01)  
**A01N 27/00** (2006.01)  
**A01P 7/00** (2006.01)  
**A01P 3/00** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**03.12.2019**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**03.06.2021**

71 Solicitantes:

**UNIVERSITAT D'ALACANT / UNIVERSIDAD DE  
ALICANTE (100.0%)  
CARRETERA SAN VICENTE DEL RASPEIG, S/N  
03690 SAN VICENTE DEL RASPEIG (Alicante) ES**

72 Inventor/es:

**SUÁREZ FERNÁNDEZ, Marta y  
LÓPEZ LLORCA, Luis Vicente**

54 Título: **COMPOSICIONES SINÉRGICAS PARA EL CONTROL DE PLAGAS**

57 Resumen:

Una composición sinérgica que comprende aceite parafínico y una suspensión acuosa de esporas de hongos entomopatógenos en la que el hongo entomopatógeno se selecciona entre la cepa *Beauveria bassiana* Bb15, *Metarhizium anisopliae*, *Paecilomyces fumosoroseus* o *Akanthomyces lecanii* VI51, preferentemente *Beauveria bassiana* Bb15 o *Akanthomyces lecanii* VI51, su procedimiento de elaboración y su empleo para el tratamiento fitosanitario de plagas de cultivos agrícolas provocadas por artrópodos y/o hongos.



FIG. 3

## DESCRIPCIÓN

### COMPOSICIONES SINÉRGICAS PARA EL CONTROL DE PLAGAS

#### 5 **Campo de la invención**

La presente invención se encuadra en el campo general de la agricultura y en particular, se refiere a composiciones sinérgicas de suspensiones acuosas de esporas de hongos entomopatógenos con aceites parafínicos para el control de plagas de artrópodos y hongos.

10

#### **Estado de la técnica**

La mayoría de países del mundo están atravesando un periodo de cambios demográficos difícilmente predecibles, los estudios estiman que la población del planeta tierra superará los 2.9 billones de habitantes en 2050. Si además se tiene en cuenta que el cambio climático va a favorecer la propagación de plagas en las plantas debido a la “tropicalización” de las zonas agrícolas de clima templado en un futuro próximo, se pone de manifiesto la gran importancia que supone garantizar la seguridad alimentaria de la población humana en estos momentos, así como la mejora de la eficiencia de la producción alimentaria, lo que pasa por controlar dichas plagas de la forma más eficaz posible. Siguiendo esta línea también resulta interesante mantener la seguridad de los alimentos lo más preservada posible entre el proceso de recogida y entrega a las personas.

El tratamiento postcosecha es de suma importancia, ya que muchos microorganismos causan enfermedades en plantas y vegetales una vez recogidos. Los hongos fitopatógenos son los agentes causales del mayor número de enfermedades tanto en el campo como en la etapa de almacenaje y conservación de los cítricos, entre los que destaca el mayor hongo patógeno de los limones, que es *Penicillium digitatum*, también conocido como moho verde. Este hongo únicamente tiene incidencia sobre cítricos pero genera unas pérdidas económicas enormes a nivel mundial, ya que tiene una enorme repercusión en el procesado, obtención y almacenaje de los cítricos. Se ha visto que hongos como *Akanthomyces lecanii* pueden frenar la incidencia de hongos fitopatógenos sobre los cítricos (Benhamou, Phytopathology, 2004).

Un método común para controlar las plagas y enfermedades de cultivos en campo es la aplicación de productos fumigantes y otros fitosanitarios. Sin embargo, estos productos tienen un impacto negativo en el medio ambiente y pueden dejar residuos tóxicos en los cultivos. Además, la aparición de resistencias de plagas y patógenos a este tipo de productos cada vez es mayor y supone un grave problema fitosanitario en algunas áreas del mundo. La necesidad de reducir el uso de fitosanitarios de síntesis química implica el desarrollo de nuevas estrategias de manejo sostenible de plagas y enfermedades. Una de dichas estrategias es el control biológico, que puede definirse como el estudio y uso de un organismo parásito o patógeno para la regulación de plagas.

*Tetranychus urticae* Koch (ácaro: Tetranychidae), conocida como la araña roja, es uno de los artrópodos herbívoros más polípagos, se alimenta de más de 1.100 especies vegetales pertenecientes a más de 140 familias. El uso de plaguicidas químicos es la táctica más utilizada para el control de *T. urticae*, pero esta especie rápidamente desarrolla resistencia a dichos compuestos (Van Leeuwen et al., Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2010). Otras especies tales como el ácaro rojo (*Panonychus citri*), ácaro oriental (*Euttetranychus orientalis*), piojo rojo (*Aonidiella aurantii*) y piojo blanco (*Aspidiotus nerii*) causan plagas en cultivos. Para llevar a cabo el control biológico de estas plagas, se usan hongos entomopatógenos como *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* o *Paecilomyces fumosoroseus* (Ullah y Lim, Journal of Economic Entomology, 2015; Shi y Feng, Biological control, 2004). Estos agentes de control biológico se utilizan en el campo en estrategias inundativas. La multiplicación del antagonista en el campo tras múltiples aplicaciones asegura el control de las poblaciones de insectos.

El uso de aceites parafínicos junto a esporas de hongos entomopatógenos proporciona un medio en el que los conidios se dispersan de mejor manera y colabora en que permanezcan en el fruto, planta o patógeno, para que el hongo se pueda desarrollar de forma correcta y llevar a cabo su función.

La solicitud de patente WO9500020 divulga un método de producción de una composición de aceites parafínicos con conidios de hongos entomopatógenos, sin embargo, el procedimiento descrito en esta patente supone un problema por la rotura de esporas que se produce al añadir sobre ellas el aceite.

En Samish et al, Veterinary Parasitology 2014, se describen varias composiciones

realizadas a partir de distintos tipos de aceites con esporas de *Metarhizium brunneum* para controlar garrapatas *Rhipicephalus annulatus*. Sin embargo, estas composiciones no son aplicables para el control de plagas de ácaros y hongos, para evitar la aparición de enfermedades postcosecha.

5

Siguiendo estas consideraciones, se hace necesario el desarrollo de composiciones para aplicar sobre distintos tipos de cultivos de forma preventiva cuando la enfermedad aún no se ha manifestado pero el organismo que produce esas enfermedades se encuentra ya en el árbol.

10

### Descripción de la invención

En la presente memoria los términos esporas y conidios se emplean indistintamente.

15

En la presente memoria el término “tratamiento postcosecha” se refiere al tratamiento del cultivo con la composición sinérgica divulgada de forma que se controle el organismo responsable de la lesión y así la enfermedad no se manifieste al recogerse el fruto y almacenarse.

La presente invención se refiere a una composición sinérgica que comprende aceite parafínico y una suspensión acuosa de esporas de hongos entomopatógenos.

20

El aceite parafínico puede ser de una concentración comprendida entre 40% y 90% peso/volumen (p/v) en agua, preferentemente, entre un 50% y 80% p/v y aún más preferentemente entre un 60% y 72% antes de mezclarse con la suspensión acuosa de esporas de hongos entomopatógenos.

25

El hongo entomopatógeno, cuyas esporas se emplean en la composición sinérgica se puede seleccionar entre las especies pertenecientes a las familias Cordycipitaceae y/o Clavicipitaceae: *Beauveria bassiana* Bb15, *Metarhizium anisopliae*, *Paecilomyces fumosoroseus* o *Akanthomyces lecanii* VI51, preferentemente *Beauveria bassiana* Bb15 o *Akanthomyces lecanii* VI51.

30

El aceite parafínico se mezcla con la suspensión acuosa de esporas del hongo en una proporción 1:1 y/o las esporas de hongos entomopatógenos se encuentran en una concentración de entre  $5 \cdot 10^6$  y  $10^9$  conidios/ml, preferentemente  $5 \cdot 10^7$  a  $2,5 \cdot 10^9$  con/ml aún más preferentemente  $5 \cdot 10^8$  conidios de hongo entomopatógeno por cada ml de aceite parafínico y agua.

35

Opcionalmente la composición sinérgica puede además comprender al menos una sustancia inerte como, por ejemplo: emulsionantes, disolventes, compuestos vehículos de los conidios, propulsores en aerosol, fragancias y colorantes. Pueden estar

presentes en una proporción, por ejemplo, de entre 0 y 10 % en volumen respecto al volumen total de la composición. Todas estas sustancias son convencionales y conocidas en el estado de la técnica para este tipo de composiciones (Shinoda y Saito, Journal of Colloid and Interface Science, 1969).

- 5 Un objeto adicional de la presente invención se refiere a un procedimiento de obtención de la composición sinérgica. Dicho procedimiento comprende: emplear un sustrato para el crecimiento de hongos entomopatógenos, dicho sustrato puede ser un cereal, preferentemente arroz.

El procedimiento de elaboración de la composición sinérgica comprende:

- 10 - filtrar un hongo entomopatógeno crecido sobre un sustrato a través de una malla de tamaño de poro de entre 0,1 mm a 0,5 mm, preferentemente 0,2mm y  
- añadir el filtrado anterior sobre un aceite parafínico.

Se emplea una cantidad entre 200 y 1000 gramos, preferentemente 500 gramos de sustrato. A continuación, se añaden a una bolsa comercial para el crecimiento de hongos. A dicha bolsa se añade suficiente cantidad de agua destilada para que al agitarla el sustrato quede suficientemente humedecido, preferentemente se añade un 20% de agua destilada sobre el total del peso del sustrato.

A continuación, se sella la bolsa con una selladora de calor y se realizan al menos 2 ciclos de autoclave a una temperatura en el rango comprendido entre 90°C y 140°C, preferentemente 100°C y 130°C y más preferentemente 121°C durante un periodo de tiempo comprendido entre 10 y 40 min, preferentemente 15 y 30 minutos y más preferentemente 20 minutos para obtener un sustrato estéril sobre el que crecer únicamente la cepa de hongo deseada.

Previamente, la especie de hongo seleccionada se ha cultivado axénicamente en placas de "*Corn Meal Agar*" (CMA) y se extraen los conidios tras un periodo de crecimiento de 10- 30 días, preferentemente 21 días y se preparan concentraciones en agua destilada de entre  $10^5$  y  $10^7$  conidios/ml, preferentemente  $10^6$  conidios/ml.

En condiciones de esterilidad, se corta una esquina de la bolsa con sustrato autoclavada, se inocula un volumen de la suspensión de conidios del hongo deseado de entre 0,1 y 10 ml preferentemente, 0,5 y 5 ml de la suspensión de conidios del hongo y aún más preferentemente 1 ml de dicha suspensión cuya concentración es de entre  $10^5$  y  $10^7$  conidios/ml, preferentemente  $10^6$  conidios/ml y se vuelve a sellar la bolsa. Se agita bien para que los conidios inoculados se repartan por el sustrato y se mantiene creciendo en una sala en condiciones de oscuridad, baja humedad (por

ejemplo, utilizando un deshumidificador comercial) y temperatura constante de entre 15°C y 28°C, preferentemente 22°C durante un periodo de tiempo comprendido entre siete días y 3 meses, preferentemente 15 días y mes, y más preferentemente un mes. Las bolsas son agitadas puntualmente durante dicho periodo para promover el desarrollo del hongo.

A continuación, se vuelca el contenido de la bolsa en recipientes con agua, en una proporción de 500 gramos de sustrato inicial por litro de agua y se agita bien para desprender las esporas del sustrato y que se mantengan en una suspensión acuosa. La concentración de esporas obtenidas tras este proceso puede estar entre  $10^7$  y  $10^{10}$  conidios/ml, preferentemente  $10^8$  a  $5 \cdot 10^9$  con/ml aún más preferentemente  $10^9$  conidios/ml. Se filtra a través de una malla de tamaño de poro de entre 0,1 mm a 0,5 mm, preferentemente 0,2mm para separar el sustrato de la suspensión acuosa de conidios.

El filtrado de la etapa anterior se añade a un recipiente con aceites parafínicos para proceder a su aplicación en el campo en una proporción 1:1 de aceite parafínico y suspensión acuosa de esporas. La concentración final de esporas es de entre  $5 \cdot 10^6$  y  $10^9$  conidios/ml, preferentemente  $5 \cdot 10^7$  a  $2,5 \cdot 10^8$  con/ml aún más preferentemente  $5 \cdot 10^8$  conidios/ml de aceite parafínico y agua.

Según una realización adicional, en la composición sinérgica según la invención, la(s) sustancia(s) inerte(s) puede(n) estar presentes en una proporción, por ejemplo, de entre 0 y 10 % en volumen respecto al volumen total de la composición.

Las sustancias inertes se pueden seleccionar entre: emulsionantes, disolventes, compuestos vehículos de los conidios, propulsores en aerosol, fragancias, colorantes y combinaciones de las mismas, y se añadirían al recipiente con los aceites parafínicos y la suspensión acuosa de esporas fúngicas previamente mezcladas en una proporción 1:1.

Un objeto adicional de la presente invención es el uso de la composición sinérgica para el tratamiento fitosanitario de plagas y enfermedades de cultivos agrícolas, con el objetivo de disminuir la presencia de plagas y enfermedades que causan graves pérdidas en cultivos de enorme importancia económica.

La plaga puede ser un hongo, preferentemente *Fusarium spp.*, *Penicillium italicum*, *Penicillium digitatum* y *Colletotrichum spp.*

La plaga puede ser un artrópodo, preferentemente un ácaro, más preferentemente un acariforme, aún más preferentemente: araña roja (*Tetranychus urticae* Koch), ácaro

rojo (*Panonychus citri*), ácaro oriental (*Euttetranychus orientalis*), piojo rojo (*Aonidiella aurantii*) y piojo blanco (*Aspidiotus nerii*), aún más preferentemente piojo rojo (*Aonidiella aurantii*).

5 Los cultivos agrícolas se pueden seleccionar entre: cultivos herbáceos y arbóreos, dentro de éstos se seleccionan cítricos, preferentemente limones.

Una realización particular de la invención se refiere al uso de la composición en el que el cultivo es arbóreo y consiste en aplicar la composición en un volumen de entre 1 y 3 litros por árbol, preferentemente 2L de la composición sinérgica por árbol.

10 Dado que la concentración a la que se obtiene el hongo tras el crecimiento en el sustrato inicial es de entre  $10^7$  y  $10^{10}$  conidios/ml, preferentemente  $10^8$  a  $5 \cdot 10^9$  con/ml aún más preferentemente  $10^9$  conidios/ml. y se mezcla con aceites parafínicos en proporción 1:1, la concentración final de hongo aplicada en el cultivo es de entre  $5 \cdot 10^6$  y  $10^9$  conidios/ml, preferentemente  $5 \cdot 10^7$  a  $2,5 \cdot 10^9$  con/ml aún más preferentemente  $5 \cdot 10^8$  conidios de hongo entomopatógeno por cada ml de aceite  
15 parafínico y agua en cada árbol.

La composición sinérgica puede además llevar al menos una sustancia inerte en una proporción, por ejemplo, de entre 0 y 10 % en volumen respecto al volumen total de la composición.

20 Para reducir la plaga en el cultivo la aplicación de la composición sinérgica se realiza cada 2-5 meses, preferentemente cada 4 meses.

La composición sinérgica se puede aplicar en forma líquida o en spray sobre las hojas del cultivo.

25 La composición sinérgica descrita en la presente invención, supone una mejora respecto a las composiciones divulgadas, ya que, al añadirlas esporas suspendidas en agua sobre el aceite parafínico, se reduce la posibilidad de rotura de esporas. Además, la presente solicitud se refiere al uso en agricultura de la composición sinérgica descrita para el control de plagas de ácaros y hongos, evitando así la aparición de enfermedades postcosecha.

### 30 **Breve descripción de las figuras**

La **Figura 1** muestra la ubicación de los campos de cultivo en los que se realizan los experimentos para desarrollar la presente tecnología. El campo está situado en la finca "Hacienda el Pino", en la Carretera El Algar-Los Urrutias s/n 30368, en Cartagena,

Murcia. Las coordenadas del campo en el que se aplica son Latitud 37° 40' 13,61" N Longitud 0° 50' 54,42" O. a) Parcela en la que se encuentra la cepa Bb15 (sección 15), b) parcelas en las que se aplican los tratamientos (en el círculo).

5 La **Figura 2** muestra la capacidad infectiva de hongos entomopatógenos sobre muestras de piojo rojo tomadas en campo a los 30 días de la aplicación de sus esporas pulverizadas en aceite parafínico. a) huevo infectado por Bb15 b) y c) hembras infectadas por Bb15 y VI51 respectivamente.

La **Figura 3** muestra la patogenicidad de las esporas hongos entomopatógenos utilizados en campo sobre larvas de *Galleria mellonella*.

10 La **Figura 4** muestra la compatibilidad del aceite parafínico con las esporas de hongos entomopatógenos utilizados en ensayos de campo. El crecimiento de los hongos entomopatógenos en medios de cultivo con aceites parafínicos adicionados a 1ppm (partes por millón), 10ppm y 100ppm no muestra diferencias significativas (Análisis multivariante ANOVA con  $p=0,05$ ) con el testigo (medio sin aceite parafínico). UFC,  
15 Unidades Formadoras de Colonias.

La **Figura 5** muestra que el aceite parafínico no afecta a la germinación de las esporas de hongos entomopatógenos utilizados. La germinación de las esporas de hongos entomopatógenos en suspensiones de aceite parafínico a concentraciones de 1ppm, 10ppm y 100ppm de aceite parafínico en medio de cultivo CMA no muestra diferencias  
20 significativas (ANOVA,  $p<0,05$ ) con el testigo (medio acuoso sin aceite parafínico).

La **Figura 6** muestra que la aplicación de la composición sinérgica en el campo no afecta al peso (gramos) de los frutos (limones) recogidos a lo largo del año. "A" indica el momento de aplicación de la composición.

La **Figura 7** muestra que la aplicación de la composición sinérgica en el campo no  
25 afecta al tamaño (milímetros) de los frutos (limones) recogidos a lo largo del año. "A" indica el momento de aplicación de la composición.

La **Figura 8** muestra la infestación media de piojo rojo por cada limón de las parcelas con los tratamientos (testigo y composición sinérgica de esporas de hongos entomopatógenos Bb15 y VI51) a lo largo del año. "A" indica el momento de aplicación  
30 de la composición.

La **Figura 9** muestra la evolución anual de la infección de piojos por hongos entomopatógenos procedentes de parcelas tratadas con las composiciones sinérgicas y el control. "A" indica el momento de aplicación de la composición.

La **Figura 10** muestra la incidencia de enfermedades postcosecha en limones tratados

en campo las composiciones sinérgicas (y testigos) un mes después de su recogida. “A” indica el momento de aplicación de la composición.

### **Ejemplos de realización**

#### **5 Hongos entomopatógenos**

Se selecciona una cepa de *Beauveria bassiana* (CECT 21157) aislada del suelo de la finca “El Pino” (Figura 1a, punto número 15 de la parcela), en la que se cultivan limones a la que llamamos Bb15, y una cepa de *Akanthomyces lecanii* VI51 (CECT 21156) (Asensio et al., Spanish Journal of Agricultural Research 2003), un hongo  
10 filamentoso que infecta en condiciones naturales a cochinillas (grupo al que pertenece el piojo rojo). El campo tratado con los hongos entomopatógenos para realizar los ensayos que dan lugar al presente documento es el mostrado en la Figura 1b.

Los hongos entomopatógenos utilizados son capaces de infectar muestras de piojo  
15 rojo de campos tratados con suspensiones en aceite parafínico de dichos hongos (Figura 2, fotos tomadas con microscopio óptico). Estos hongos, sobre todo Bb15, poseen una elevada virulencia sobre larvas de *G. mellonella* (Figura 3). Los ensayos de patogenicidad se realizan siguiendo los protocolos de Ricaño *et al.*, 2013 en la revista Florida Entomologist.

20

#### **Estudio de toxicidad del aceite parafínico sobre las cepas de hongos entomopatógenos seleccionadas**

En condiciones de laboratorio se preparan axénicamente placas de medio de cultivo CMA “*Corn Meal Agar*” con aceites parafínicos a 1ppm, 10ppm y 100ppm. Para  
25 comprobar su efecto sobre los hongos entomopatógenos Bb15 y VI51 se inocula el medio con dichos hongos añadiendo un cilindro de agar de 5mm que contiene el hongo en el centro de la placa y midiendo su radio de crecimiento. A los 14 días se comprueba el crecimiento de cada cepa a partir del cilindro de agar y a los 5 días su germinación en placa (previamente se habían sembrado conidios del hongo en una  
30 placa y al cabo de 5 días se cuenta cuántos han germinado y se comparan los tratamientos con el control). En las Figuras 4 y 5 se observa que su interacción es completamente viable, teniendo unos valores similares al control. Por ello, el uso de aceites parafínicos es compatible con la aplicación de hongos entomopatógenos en el campo.

**Ejemplo de preparación de la composición**

El crecimiento de los hongos entomopatógenos VI51y Bb15 se realiza utilizando arroz como sustrato. Se pesan 500g de arroz y se añaden a una bolsa de crecimiento de hongos (Unicorn Bag), se añaden 100ml de agua destilada y se agita de modo que todo el arroz se quede humedecido. Tras esto, se sella la bolsa con una selladora de calor y se le realizan dos ciclos de autoclave a 121°C durante 20 minutos para obtener un sustrato estéril sobre el que crecer únicamente la cepa de hongo deseada.

Se extraen conidios de los hongos Bb15 y VI51de placas de CMA de 21 días y se preparan concentraciones de  $10^6$  conidios/ml en agua destilada estéril.

En condiciones de esterilidad, se corta una esquina de la bolsa con arroz autoclavada, se inocula con 1ml de la suspensión de conidios del hongo deseado y se vuelve a sellar para mantener la esterilidad dentro de la misma. Se agita bien para que los conidios inoculados se repartan por el arroz y se mantiene creciendo en una sala en condiciones de oscuridad, baja humedad (por ejemplo, utilizando un deshumidificador comercial) y temperatura constante de 22°C durante un mes, siendo las bolsas agitadas puntualmente cada semana para promover el desarrollo del hongo.

Al cabo de un mes, se transportan las bolsas al lugar de la aplicación, se abren y se vuelca el contenido en recipientes con agua (se añade el contenido de una bolsa por cada litro de agua, en este momento la concentración de conidios es de  $10^9$  conidios/ml), y se agita bien para desprender las esporas de los granos de arroz y que se mantengan en una suspensión acuosa. Se filtra a través de una malla de tamaño de poro 0,2 mm para separar los granos de arroz de la suspensión acuosa de conidios. Se añade a una cuba con aceites parafínicos (Volck verano, Agrodan S.A., concentrado emulsionable 72%, N° registro 12033) en una proporción 1:1 obteniendo una concentración de  $5 \cdot 10^8$  conidios por ml de aceite parafínico y agua para proceder a su aplicación en el campo.

**Efecto de los tratamientos sobre el desarrollo de los limones**

En las Figuras 6 y 7 se observa que la aplicación de las composiciones sinérgicas de esporas de hongos entomopatógenos con aceites parafínicos no muestra diferencias significativas con los testigos (tratados con aceite parafínico) en el desarrollo del fruto en el árbol a lo largo del año (Tablas 1 y 2).

La Tabla 1 muestra los datos estadísticos (Media, SD = Desviación Estándar y N =

Tamaño muestra de limones recogidos cada mes) para los datos de peso (en gramos) de los limones a lo largo de un año (de enero de 2018 a enero de 2019) en las dos parcelas tratadas con la composición sinérgica formada a partir de esporas de hongos entomopatógenos (Bb15 y VI51 respectivamente) y aceite parafínico y la parcela tratada con aceite parafínico (Control). Se marcan en negrita los datos que presentan diferencias significativas con respecto al tratamiento control (Análisis estadístico multivariante ANOVA con  $p=0,05$ ).

La Tabla 2 muestra los datos estadísticos (Media, SD = Desviación Estándar y N = Tamaño muestra) para los datos de longitud (en mm) de los limones a lo largo de un año (de enero de 2018 a enero de 2019) en las dos parcelas tratadas con la composición sinérgica formada a partir de esporas de hongos entomopatógenos (Bb15 y VI51,  $10^9$  con/ml de concentración final) y aceite parafínico y la parcela tratada con aceite parafínico (Control). Se marcan en negrita los datos que presentan diferencias significativas con respecto al tratamiento control (Análisis estadístico multivariante ANOVA con  $p=0,05$ ).

Por ello, los tratamientos con la composición sinérgica que comprende aceite parafínico con esporas de hongos entomopatógenos no perjudican la cosecha.

TABLA 1 Variación en el peso de los limones a lo largo de un año.

	Control			Bb15			VI51		
	Media	SD	N	Media	SD	N	Media	SD	N
enero	87,7	22,45	50	85,22	18,43	50	88,53	21,6	50
febrero	97,29	25,22	51	<b>85,98</b>	<b>21,33</b>	<b>49</b>	98,36	27,42	49
marzo	94,6	25	52	94	23	50	97	27	52
abril	111,7	33,97	12	<b>59,78</b>	<b>17,83</b>	<b>13</b>	<b>79,98</b>	<b>6,862</b>	<b>13</b>
mayo	94,23	22,37	50	93,44	23,08	50	96,89	27,17	52
junio	99,65	25,77	51	<b>81,83</b>	<b>18,6</b>	<b>54</b>	94,45	26,85	52
julio (limones verdes)	50,14	23,29	36	<b>30,63</b>	<b>12,16</b>	<b>30</b>	54,12	27,64	29
julio (limones amarillos)	105,4	43,38	20	88,21	23,6	20	103,7	31,7	21
agosto	52,54	17,15	54	60,28	21,54	50	61,18	22,06	51
septiembre	63,51	19,41	52	61,78	21,15	47	67,45	16,12	49
octubre	59,08	7,351	50	61,46	20,37	50	54,95	13,03	50
noviembre	64,45	17,98	75	65,09	14,91	75	65,29	11,91	75
diciembre	83,03	19,01	72	85,53	20,23	72	84,56	21,99	72
enero 2019	101,5	24,18	74	98,02	22,13	74	101,5	23,77	74

TABLA 2 Variación en el tamaño de los limones a lo largo de un año.

	Control			Bb15			VI51		
	<u>Media</u>	<u>SD</u>	<u>N</u>	<u>Media</u>	<u>SD</u>	<u>N</u>	<u>Media</u>	<u>SD</u>	<u>N</u>
enero	643,9	82,79	50	649,4	59,06	50	644,2	67,52	50
febrero	669,1	92,41	51	633,6	71,04	44	669,8	87,48	49
marzo	653	110	53	642	105	51	653	112	53
abril	677,9	53,66	12	<b>572,1</b>	<b>61,85</b>	<b>13</b>	<b>620,4</b>	<b>30,38</b>	<b>13</b>
mayo	659,8	68,98	50	653,3	66,7	50	664,2	77,47	52
junio	664,5	69,69	51	<b>616,2</b>	<b>60,36</b>	<b>54</b>	647,8	72,74	52
julio (limones verdes)	543,8	86,12	36	<b>487,9</b>	<b>53,31</b>	<b>30</b>	551,7	68,37	29
julio (limones amarillos)	649,3	173,7	20	636,3	76,87	20	677,6	96,2	21
agosto	563,5	66,66	54	559,9	94,93	50	576,8	58,95	51
septiembre	579,3	63,59	52	573	69,93	47	588,6	53,87	49
octubre	556,8	43,88	50	579,5	88,42	50	561,9	55,99	50
noviembre	586,7	70,55	75	574,4	82,59	75	573,5	78,95	75
diciembre	655,1	53,08	72	650,2	59,74	72	654,7	71,06	72
enero 2019	686,1	75,63	74	678,5	78,82	74	677,9	75,77	74

### **Efecto de los tratamientos con la composición sinérgica sobre la infestación de limones por piojo rojo**

A razón de lo observado en la Figura 8 se puede ver que, pasado un ciclo de cosecha del árbol, el tratamiento con hongos entomopatógenos y aceites parafínicos reduce significativamente la cantidad de infestación por piojo rojo en el fruto (Tabla 3, observar preferentemente de septiembre 2018 a enero 2019).

La Figura 9 muestra los piojos rojos infectados por hongos entomopatógenos recogidos de limones del árbol en cada uno de los meses. Se observa que, tras cada aplicación de 2L de suspensión de esporas en medio líquido con aceites parafínicos por árbol ( $5 \cdot 10^8$  conidios/ml), realizando las aplicaciones por spray (aplicaciones realizadas en febrero, junio y octubre), el número de piojos rojos infectados por dichos hongos aumenta. La infección por VI51 aumenta cuando las temperaturas son más bajas y el ambiente es más húmedo, y más favorable a Bb15 conforme se van haciendo más aplicaciones en el tiempo, a pesar de que en los meses de verano la temperatura es mas alta (media de 26,1°C en el mes de Julio de 2018 comparación con los 11,8°C de Enero de 2018) o el ambiente es más seco (media de 56% de humedad relativa en el mes de Julio de 2018 en comparación con una humedad relativa del 64% en Enero de 2018) (Fuente: Agencia Estatal de Meteorología. Centro Meteorológico Territorial de Murcia. Webs: [www.econet.carm.es](http://www.econet.carm.es) y [www.meteomurcia.es](http://www.meteomurcia.es), visitadas en octubre 2019).

La Tabla 3 muestra los datos estadísticos (Media, SD = Desviación Estándar y N = Tamaño muestral de limones recogidos cada mes) para los datos de infestación por piojo rojo de los limones a lo largo de un año (de enero de 2018 a enero de 2019) en las dos parcelas tratadas con la composición sinérgica formada a partir de esporas de hongos entomopatógenos (Bb15 y VI51) y aceite parafínico y la parcela tratada con aceite parafínico (Control). Se marcan en negrita los datos que presentan diferencias significativas con respecto al tratamiento control.

TABLA 3 Infestación media de los limones por piojo rojo a lo largo de un año.

	Control			Bb15			VI51		
	Media <u>piojos rojos</u>	SD	N	Media <u>piojos rojos</u>	SD	N	Media <u>piojos rojos</u>	SD	N
<b>enero</b>	9,72	12,97	50	<b>24,84</b>	<b>33,96</b>	<b>50</b>	11,96	18,27	50
<b>febrero</b>	14,59	20,74	51	19,25	24,1	44	15,69	16,8	49
<b>marzo</b>	13,6	13,8	52	10,74	12,96	50	<b>5,96</b>	<b>9,703</b>	<b>52</b>
<b>abril</b>	3,3	3,181	20	3,2	1,881	20	2,1	1,774	20
<b>mayo</b>	13,36	24,4	50	10,74	12,96	50	5,962	9,703	52
<b>junio</b>	10,76	22,62	51	5,759	9,693	54	9,231	17,91	52
<b>julio (limones verdes)</b>	0,6389	1,222	36	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>30</b>	<b>0,03448</b>	<b>0,1857</b>	<b>29</b>
<b>julio (limones amarillos)</b>	15,4	29,52	20	4,7	7,435	20	3,619	6,103	21
<b>agosto</b>	0,3889	0,9599	54	0,9	2,908	50	0,1765	0,6544	51
<b>septiembre</b>	29,13	55,03	52	<b>12,64</b>	<b>49,91</b>	<b>47</b>	<b>6,49</b>	<b>22,45</b>	<b>49</b>
<b>octubre</b>	18,3	15,67	50	<b>7,36</b>	<b>12,23</b>	<b>50</b>	<b>6,74</b>	<b>10,25</b>	<b>50</b>
<b>noviembre</b>	27,33	35,93	75	<b>8,747</b>	<b>20</b>	<b>75</b>	<b>2,08</b>	<b>3,841</b>	<b>75</b>
<b>diciembre</b>	18,86	34,31	72	<b>10,94</b>	<b>22,9</b>	<b>72</b>	<b>12,21</b>	<b>33,23</b>	<b>72</b>
<b>enero 2019</b>	27,42	54,15	74	<b>8,676</b>	<b>19,99</b>	<b>74</b>	<b>11,72</b>	<b>39,62</b>	<b>74</b>

El tratamiento control comienza, en enero de 2018, con un valor medio de 9,7 piojos rojos por limón. En el mes de abril el número de piojos por fruto disminuye a más de la mitad, pero en los meses posteriores vuelve a los valores iniciales. En agosto se recogen únicamente limones verdes, por lo que el valor de los piojos en el tratamiento control en este mes es cercano a 0, dado que los piojos suelen infectar preferiblemente limones amarillos, y la época del año idónea para el desarrollo del piojo coincide con la maduración del fruto. A partir de agosto, el control presenta un incremento en la cantidad de piojos rojos encontrados por limón, hasta situarse en enero de 2019 con un valor medio de 27,4 piojos rojos por fruto, por lo que en un año el número medio de piojos por limón en este tratamiento habrá aumentado en 2,5 veces en comparación con los valores iniciales de enero de 2018.

El campo tratado con Bb15 presentaba una mayor infestación por piojo rojo en enero de 2018 que el resto de tratamientos (24,8 piojos de media por limón). Se observa un descenso progresivo de insectos en el campo en los meses de enero a abril, mes en el que se realiza el cosechado de los frutos de la parcela. En mayo, el valor medio de piojos por fruto aumenta con respecto al mes anterior. En este mes se realiza una aplicación del hongo, por lo que los meses posteriores hasta agosto se vuelve a observar una reducción progresiva del número medio de insectos por fruto, hasta ser prácticamente cero en el mes de agosto. En el mes de septiembre la infestación se incrementa y en los meses posteriores disminuye y, posteriormente, se mantiene estable, con valores de 8 a 10 piojos por fruto. Se consigue una reducción en el número de piojos rojos de aproximadamente el 70% en comparación con el grupo control en enero de 2019: 8,7 vs 27.4, ver tabla 3.

El campo tratado con VI51 comenzó en enero de 2018 con una media de 11,9 piojos rojos por fruto. Como en los otros tratamientos, se observa una reducción de la infestación por piojos en los meses de febrero a abril. En mayo, al igual que en el tratamiento con Bb15, el número de insectos en la parcela aumenta, pero, tras la aplicación del hongo, se produce una disminución progresiva hasta el mes de agosto. De septiembre a noviembre hay un leve descenso en la aparición de piojos por fruto. Consiguiendo una reducción en el número de piojos rojos de aproximadamente el 60% en comparación con el grupo control en enero de 2019: 11,7 vs 27.4, ver tabla 3.

Finalmente, comparando los datos de los últimos meses del año en el número de piojos rojos por fruto entre el control y los tratados se observa que los tratamientos presentan diferencias significativas con respecto al control. Por tanto, se confirma que los tratamientos con composiciones de aceites parafínicos y esporas de hongos

entomopatógenos en el campo reducen la infestación de plagas y la aparición de enfermedades.

### **Efecto de los hongos entomopatógenos sobre la infección por hongos postcosecha**

5 En los limones recogidos en la parcela control, la presencia de hongos postcosecha (fundamentalmente *Penicillium digitatum*) disminuye ligeramente desde enero hasta abril de un 14% a un 8%, Figura 10, después aumenta teniendo dos máximos en los meses de mayo (40% de limones infectados) y julio (65% de limones infectados), en agosto disminuye el porcentaje de infección a un 16%, pero después aumenta  
10 progresivamente hasta enero, finalizando el año con un 45% de limones infectados. Al cabo de un año la infección de los limones por *P. digitatum* en el grupo control ha pasado de ser un 14% a un 45%, se ha triplicado.

Los limones tratados con la composición sinérgica de esporas de Bb15 y aceites parafínicos muestran una incidencia de infección por hongos postcosecha más baja  
15 que el resto de tratamientos. El porcentaje de infección fluctúa ligeramente en los meses de enero a septiembre, manteniéndose en valores entre 10% y 30%. En octubre se sitúa el máximo de limones infectados en un 38%, pero la infección disminuye en los meses posteriores hasta situarse en un 17% en enero de 2019. Al cabo de un año la infección ha pasado de ser un 10% en enero de 2018 a un 17% en  
20 enero de 2019.

En los limones correspondientes a los campos en los que se aplica el tratamiento con VI se observa una reducción de infección de limones en los meses de enero a marzo. En abril la infección de los limones aumenta a un 20% y se mantiene estable hasta el mes de septiembre. En octubre se produce un nuevo aumento de la infección  
25 alrededor del 35% que, finalmente, disminuye hasta un 25% en enero de 2019. En un año la infección de los limones de este campo se ha reducido a la mitad, de un 50% a un 25%.

Estos datos confirman que los tratamientos con Bb y, sobre todo, VI protegen a los limones del campo de infecciones postcosecha por *P. digitatum*. Toda esta información  
30 está contenida en la Figura 10.

**REIVINDICACIONES**

1. Una composición sinérgica que comprende aceite parafínico y una suspensión acuosa de esporas de hongos entomopatógenos.

5

2. Una composición sinérgica según la reivindicación anterior, en la que el aceite parafínico tiene una concentración comprendida entre 40% y 90% p/v en agua, preferentemente, entre un 50% y 80% p/v y aún más preferentemente entre un 60% y 72% antes de mezclarse con la suspensión acuosa de esporas de hongos entomopatógenos.

10

3. Una composición sinérgica según la reivindicación anterior, en la que el hongo entomopatógeno, cuyas esporas se emplean en la composición sinérgica se puede seleccionar entre las especies pertenecientes a las familias Cordycipitaceae y/o Clavicipitaceae: *Beauveria bassiana* Bb15, *Metarhizium anisopliae*, *Paecilomyces fumosoroseus* o *Akanthomyces lecanii* VI51, preferentemente *Beauveria bassiana* Bb15 o *Akanthomyces lecanii* VI51.

15

4. Una composición sinérgica según la reivindicación anterior, en la que el aceite parafínico está mezclado con las esporas del hongo en una proporción 1:1 y/o las esporas de hongos entomopatógenos se encuentran en una concentración de entre  $5 \cdot 10^6$  y  $10^9$  conidios/ml, preferentemente  $5 \cdot 10^7$  a  $2,5 \cdot 10^9$  con/ml aún más preferentemente  $5 \cdot 10^8$  conidios de hongo entomopatógeno por cada ml de aceite parafínico y agua.

20

25

5. Una composición sinérgica según la reivindicación anterior, que comprende al menos una sustancia inerte seleccionada entre emulsionantes, disolventes, compuestos vehículos de los conidios, propulsores en aerosol, fragancias y colorantes y combinaciones de las mismas.

30

6. Una composición sinérgica según la reivindicación anterior, en la que la sustancia inerte está presente en una proporción de entre 0 y 10 % en volumen respecto al volumen total de la composición.

7. Procedimiento de elaboración de una composición sinérgica según la reivindicación anterior, que comprende:

- filtrar un hongo entomopatógeno crecido sobre un sustrato a través de una malla de tamaño de poro de entre 0,1 mm a 0,5 mm, preferentemente 0,2mm y
- añadir el filtrado anterior sobre un aceite parafínico.

8. Procedimiento de elaboración de una composición sinérgica según la reivindicación anterior, que comprende la adición de una sustancia inerte en una proporción comprendida entre 0 y 10 % en volumen respecto al volumen total de la composición.

9. Procedimiento de elaboración de una composición sinérgica según la reivindicación anterior, que comprende previamente:

- preparar el sustrato para el crecimiento del hongo, dicho sustrato es un cereal, preferentemente arroz, mediante la adición de agua destilada y al menos 2 ciclos de autoclavado y
- añadir al sustrato un inóculo del hongo y crecer durante un periodo de tiempo entre 15 días y un mes.

10. Uso de una composición sinérgica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, para el tratamiento fitosanitario de plagas y enfermedades de cultivos agrícolas.

11. Uso de una composición sinérgica según la reivindicación anterior, en la que la plaga es un hongo, preferentemente *Fusarium spp.*, *Penicillium italicum*, *Penicillium digitatum* y *Colletotrichum spp.*

12. Uso de una composición sinérgica según la reivindicación 10, en la que la plaga puede ser un artrópodo, preferentemente un ácaro, más preferentemente un acariforme, aún más preferentemente: araña roja (*Tetranychus urticae* Koch), ácaro rojo (*Panonychus citri*), ácaro oriental (*Euttetranychus orientalis*), piojo rojo (*Aonidiella aurantii*) y piojo blanco (*Aspidiotus nerii*), aún más preferentemente piojo rojo (*Aonidiella aurantii*).

13. Uso de la composición sinérgica según una de las reivindicaciones 10 a 12 en el que la aplicación de la composición sinérgica sobre el cultivo se realiza cada 2-5 meses, preferentemente cada 4 meses.

5 14. Uso de la composición sinérgica según una de las reivindicaciones 10 a 13, en el que la composición sinérgica se aplica en forma líquida o en spray sobre el cultivo.

10 15. Uso de una composición sinérgica según una de las reivindicaciones 10 a 14, en el que el cultivo es arbóreo y la composición es aplicada en un volumen de entre 1 y 3 litros por árbol, preferentemente 2L.

15 16. Uso de una composición sinérgica según una de las reivindicaciones 10 a 15, en el que la composición aplicada tiene una concentración de entre  $5 \cdot 10^6$  y  $10^9$  conidios/ml, preferentemente  $5 \cdot 10^7$  a  $2,5 \cdot 10^9$  con/ml aún más preferentemente  $5 \cdot 10^8$  conidios de hongo entomopatógeno por cada ml de aceite parafínico y agua.

20 17. Uso de una composición sinérgica según una de las reivindicaciones 10 a 16, en la que la composición aplicada comprende al menos una sustancia inerte en una proporción comprendida entre 0 y 10 % en volumen respecto al volumen total de la composición.

18. Uso de una composición sinérgica según una de las reivindicaciones 10 a 17, en la que los cultivos agrícolas se seleccionan entre: cultivos herbáceos y arbóreos, dentro de éstos se seleccionan cítricos, preferentemente limoneros.

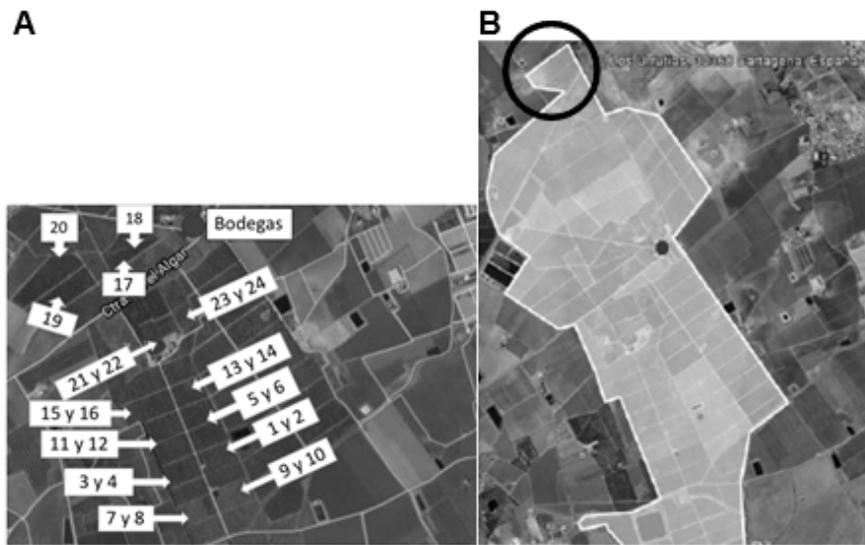


FIG. 1

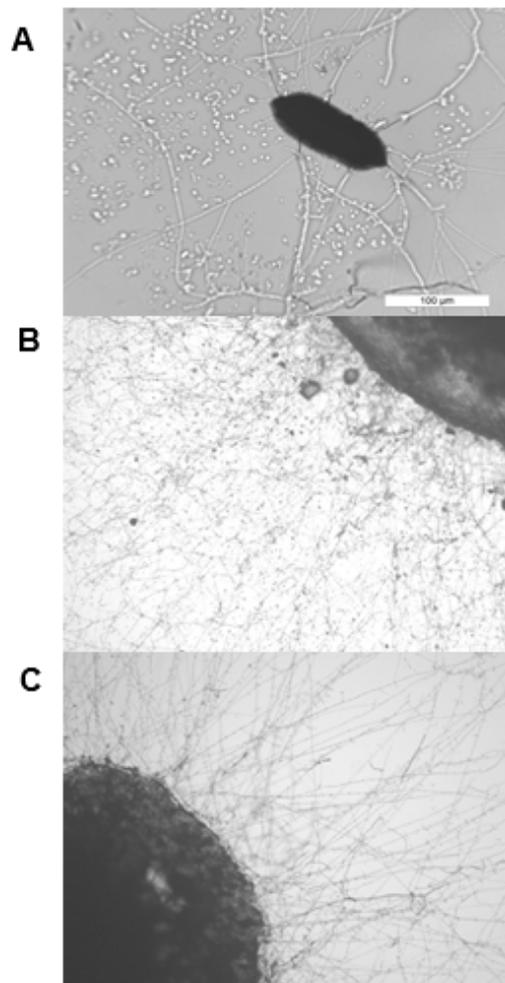
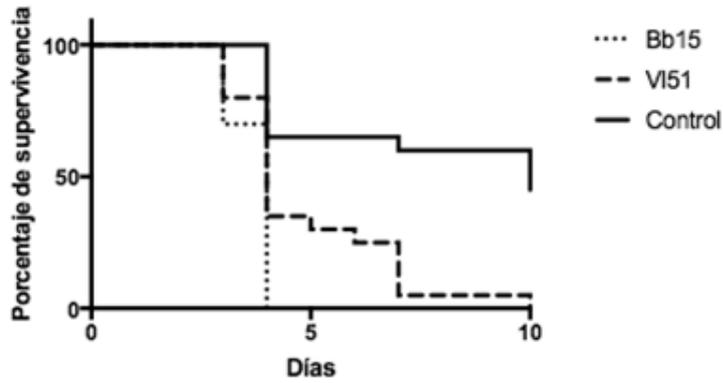
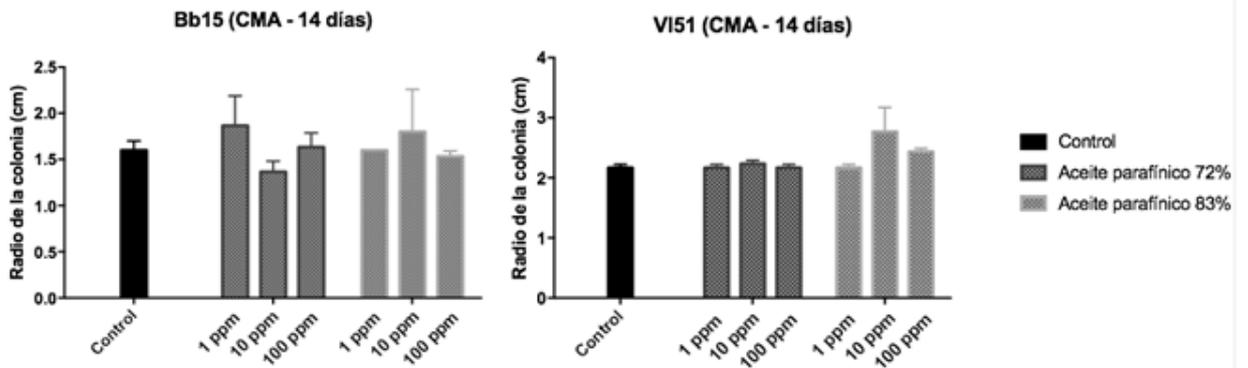


FIG. 2

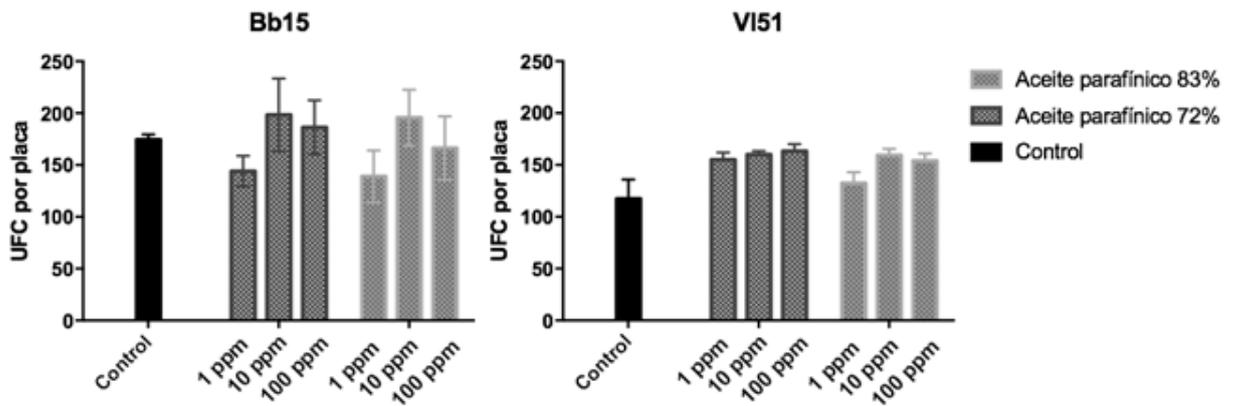
**Patogenicidad sobre larvas de *G. mellonella***



**FIG. 3**



**FIG. 4**



**FIG. 5**

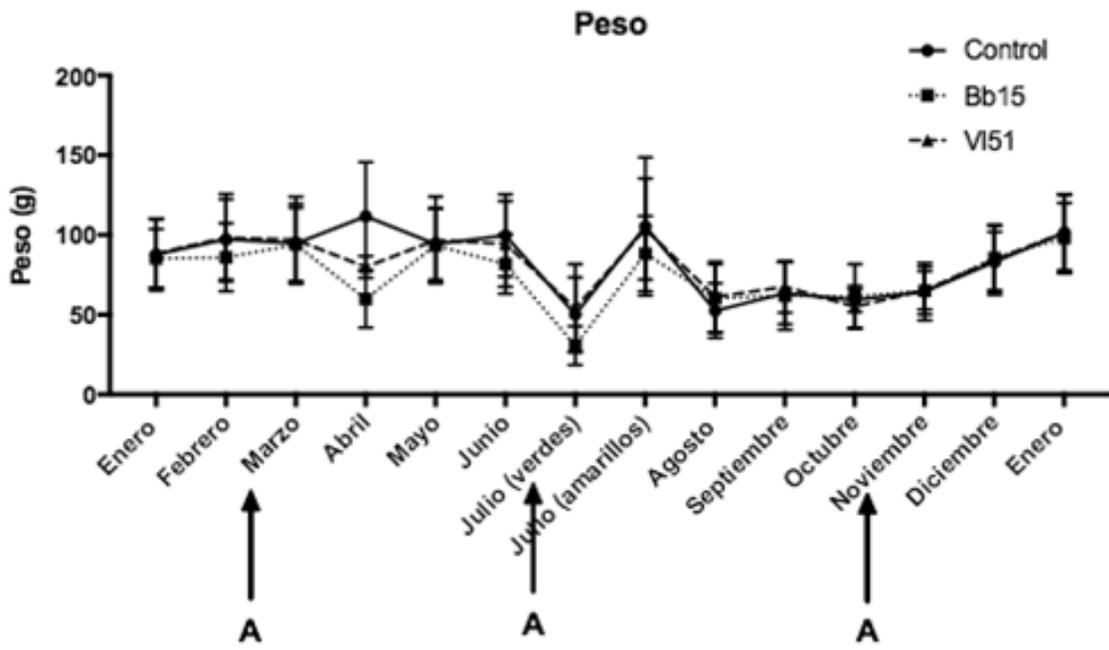


FIG. 6

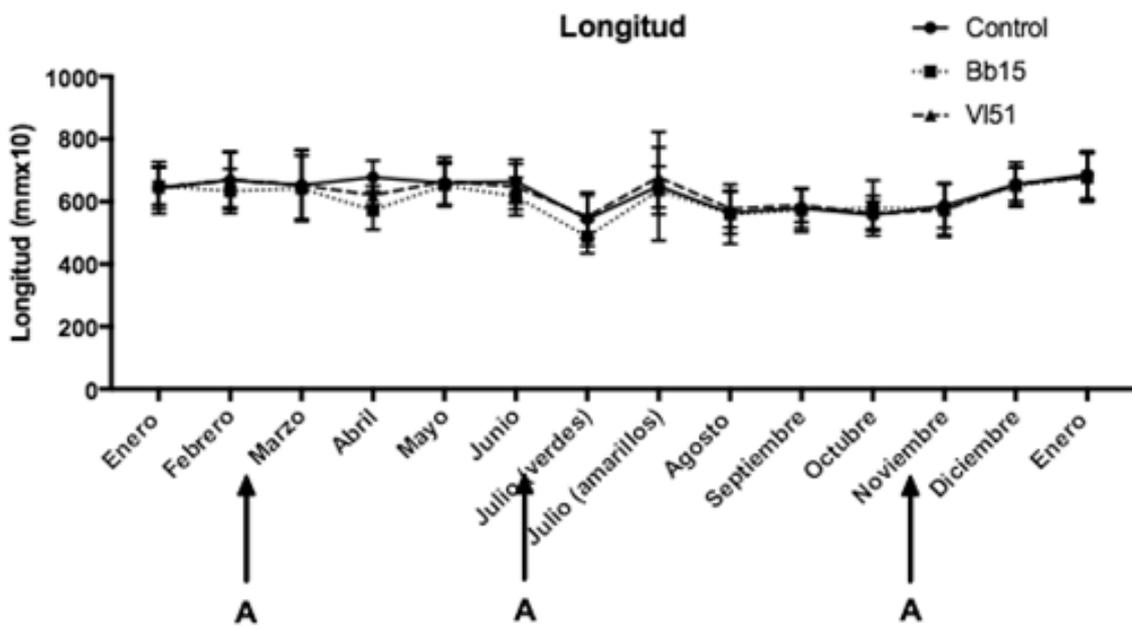


FIG. 7

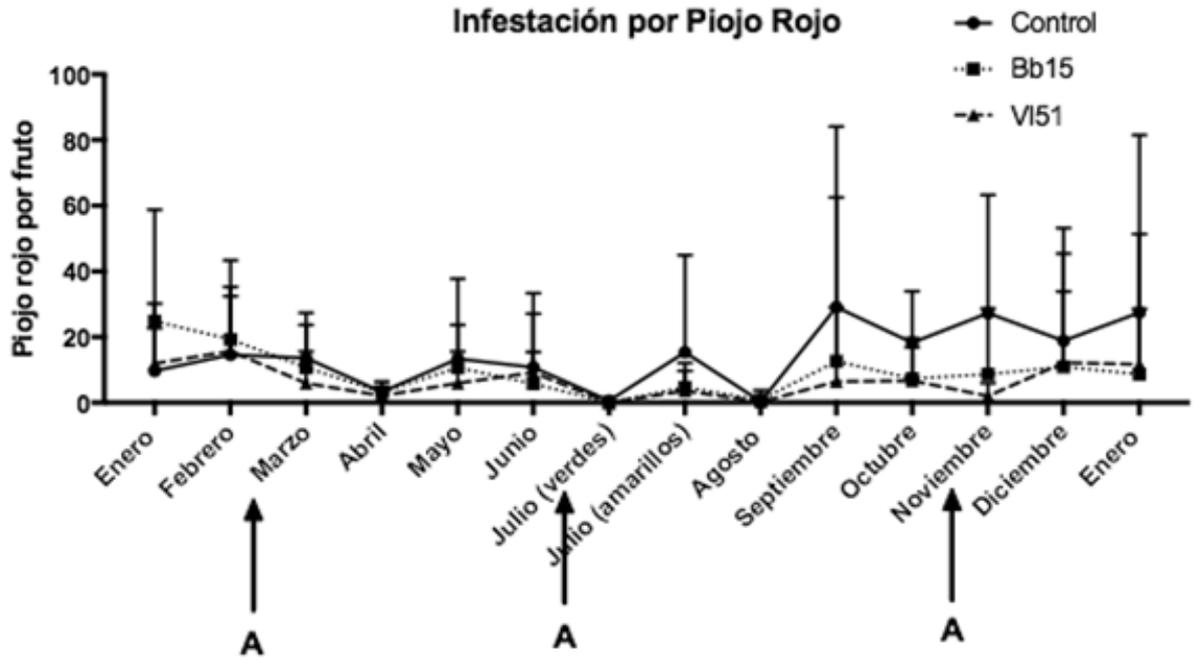


FIG. 8

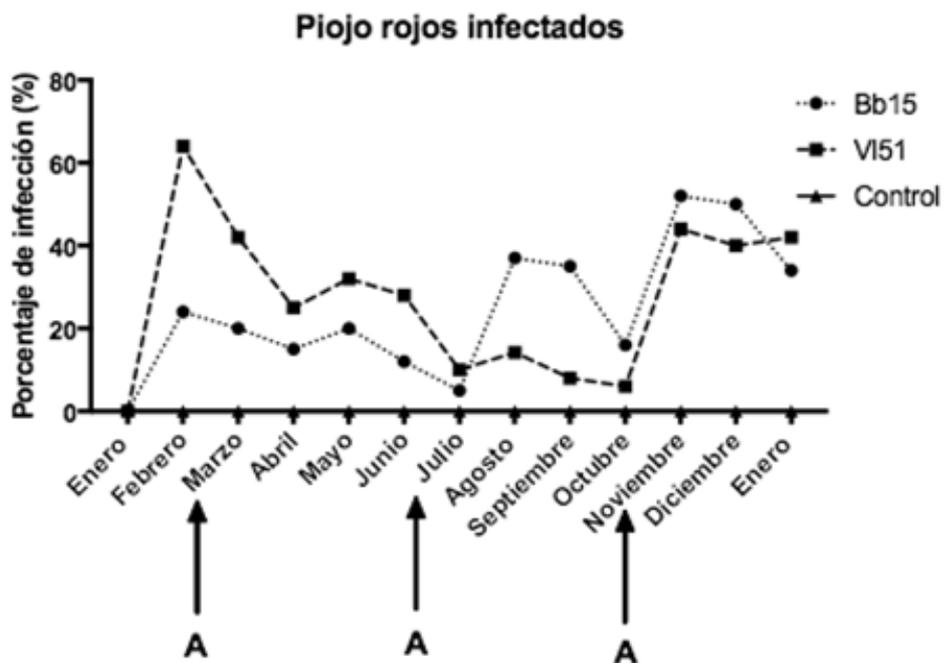


FIG. 9

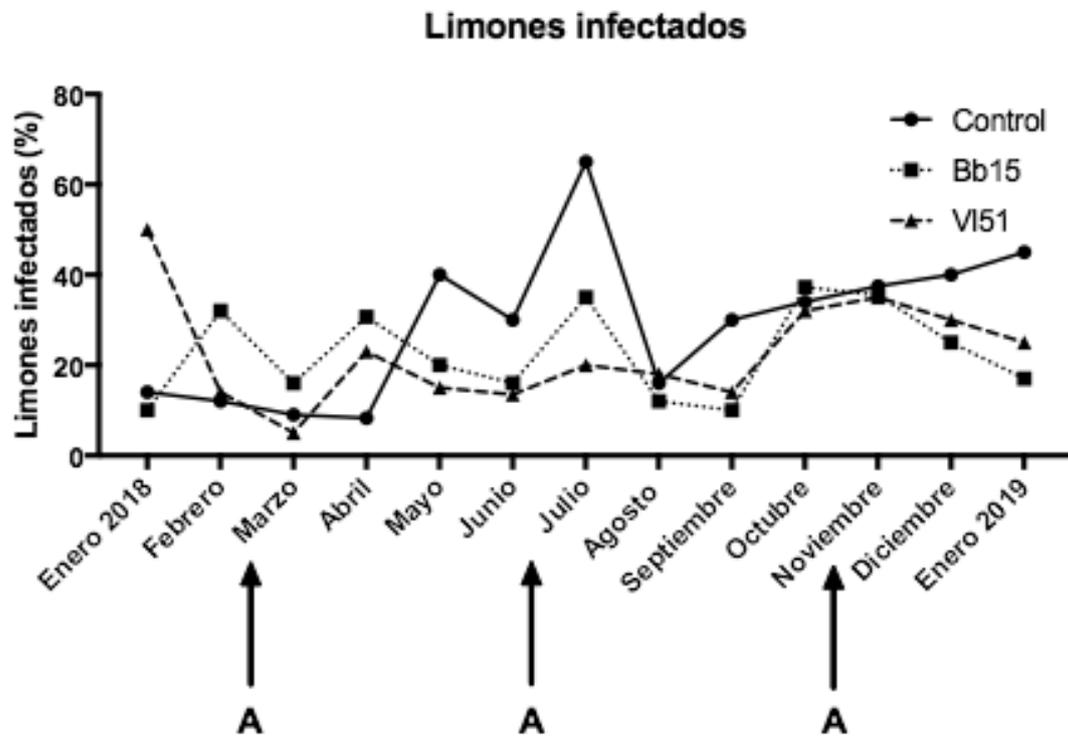


FIG. 10



- ②① N.º solicitud: 201931071  
②② Fecha de presentación de la solicitud: 03.12.2019  
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	VERHAAR M A et al. Improvement of the efficacy of <i>Verticillium lecanii</i> used in biocontrol of <i>Sphaerotheca fuliginea</i> by addition of oil formulations. Biocontrol, 1999, vol. 44, N° 1, ISSN 1386-6141, páginas 73-87, experimento III.	1-18
X	US 2018325120 A1 (JARONSKI STEFAN et al.) 15/11/2018, párrafo 40, 45, 46, 50, ejemplo 3	1-6, 10, 12-18
X	SAMISH M et al. Efficacy of the entomopathogenic fungus <i>Metarhizium brunneum</i> in controlling the tick <i>Rhipicephalus annulatus</i> under field conditions. Veterinary Parasitology, 2014, vol. 206, N 3, páginas 258 - 266, ISSN 0304-4017, DOI:10.1016/j.vetpar.2014.10.019, apartados 2.2. y 2.4.2	1-6, 10, 12-18
A	Manual de materias activas y recomendaciones en tratamientos para limón. Versión 12. 02/01/2019. En: AILIMPO. Recuperado de Internet el 14.05.2020 <a href="https://www.ailimpo.com/2019/01/14/nueva-edicion-del-manual-de-materias-activas-y-recomendaciones-en-tratamientos-para-el-limon-editado-por-ailimpo-2/">https://www.ailimpo.com/2019/01/14/nueva-edicion-del-manual-de-materias-activas-y-recomendaciones-en-tratamientos-para-el-limon-editado-por-ailimpo-2/</a>	1-18
A	FARIA MARCOS et al. Imbibitional damage in conidia of the entomopathogenic fungi <i>Beauveria bassiana</i> , <i>Metarhizium acridum</i> , and <i>Metarhizium anisopliae</i> . Biological Control, 2009, vol. 51, N° 3, páginas 346-354, ISSN 1049-9644(print) ISSN 1090-2112(electronic), DOI:10.1016/j.biocontrol.2009.06.012	1-18
A	CHANDLER D et al. Fungal biocontrol of Acari. Biocontrol Science and Technology, 2000, vol. 10, N° 4, páginas 357-384, ISSN 0958-3157. Todo el documento.	1-18
A	EP 1884160 A1 (BOZSIK BELA PAL et al.) 06/02/2008, párrafos 5-6, 52, reivindicaciones 1,4	1-18
A	ES 2257213 A1 (INTRACHEM BIO ITALIA S P A) 16/07/2006, Ejemplo.	1-18

Categoría de los documentos citados

- X: de particular relevancia  
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría  
A: refleja el estado de la técnica

- O: referido a divulgación no escrita  
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud  
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

- para todas las reivindicaciones  para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe 12.05.2020	Examinador A. I. Polo Diez	Página 1/3
--	-------------------------------	---------------



- ②<sup>1</sup> N.º solicitud: 201931071  
②<sup>2</sup> Fecha de presentación de la solicitud: 03.12.2019  
③<sup>2</sup> Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤<sup>1</sup> Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤ <sup>6</sup> Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	BENHAMOU NICOLE. Potential of the mycoparasite, <i>Verticillium lecanii</i> , to protect citrus fruit against <i>Penicillium digitatum</i> , the causal agent of green mold: A comparison with the effect of chitosan. <i>Phytopathology</i> , 2004, vol. 94, N° 7, páginas 693-705, ISSN 0031-949X (ISSN print)	1-18

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

**El presente informe ha sido realizado**

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
12.05.2020

Examinador  
A. I. Polo Diez

Página  
2/3

## CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

**A01N63/30** (2020.01)

**A01N25/04** (2006.01)

**A01N27/00** (2006.01)

**A01P7/00** (2006.01)

**A01P3/00** (2006.01)

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

A01N, A01P

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, INTERNET, CAPLUS, MEDLINE, EMBASE, BIOSIS