

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 935 730**

21 Número de solicitud: 202130842

51 Int. Cl.:

A01N 63/30 (2010.01)

A01N 25/12 (2006.01)

A01P 7/04 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

09.09.2021

43 Fecha de publicación de la solicitud:

09.03.2023

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD DE VALLADOLID (100.0%)
Ctt - Otri - Casa del Estudiante
C/ Real de Burgos, s/n
47001 Valladolid (Valladolid) ES**

72 Inventor/es:

**SACRISTÁN VELASCO, Alberto y
MARTÍN GARCÍA, Jorge**

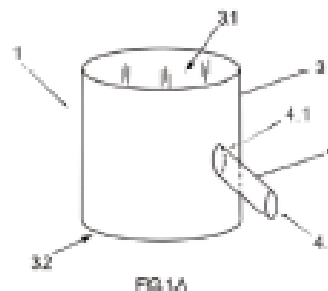
74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

54 Título: **DISPOSITIVO DE AUTOINOCULACIÓN PARA INSECTOS DEL GÉNERO *MONOCHAMUS***

57 Resumen:

La presente invención se refiere en un primer aspecto a un dispositivo de autoinoculación (1) para insectos del género *Monochamus* que comprende un difusor (2) que comprende a su vez una composición atrayente del género *Monochamus*, una pieza colector (3) y un conducto de salida (4) al exterior, de tal forma que cuando un insecto entra por la abertura superior de entrada (3.1) atraído por la composición atrayente y sale a través del conducto de salida (4), se impregna del agente entomopatógeno por rozamiento. En un segundo aspecto, la invención se refiere al uso de un dispositivo según el primer aspecto de la invención para la autoinoculación de insectos del género *Monochamus* con un agente entomopatógeno.



DESCRIPCIÓN

DISPOSITIVO DE AUTOINOCULACIÓN PARA INSECTOS DEL GÉNERO *MONOCHAMUS*

5

SECTOR TÉCNICO

10 La presente invención se encuadra dentro del sector fitosanitario y, en particular, en el sector técnico del control biológico de plagas forestales y, aún más particularmente, para el control de plagas en coníferas.

La presente invención describe un nuevo dispositivo de autoinoculación para el control de insectos que puede constituir una plaga o insectos vectores de plagas.

15

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

20 El insecto forestal perforador *Monochamus galloprovincialis* (Coleoptera: Cerambycidae) es una especie considerada como plaga secundaria en los pinares de España y Europa, al igual que otras especies del género en Norteamérica y Asia. Sin embargo, tras comprobar su función como vector del Nematodo de la Madera del Pino (NMP) en Portugal, causante de la Enfermedad del Marchitamiento del Pino (EMP), se ha convertido en un insecto de relevante importancia fitosanitaria y por ello se ha incrementado el estudio de su biología, ecología y control.

25

30 El NMP es un organismo de cuarentena en la Unión Europea incluido en la Lista A2 (EPPO, 2016. EPPO A1 and A2 Lists of pest recommended for regulation as quarantine pests. Vol. 2, no. September), causante de la Enfermedad del Marchitamiento del Pino (EMP). La enfermedad es ocasionada en las especies de coníferas susceptibles a los nematodos, que se alojan en los canales resiníferos y se alimentan de las células epiteliales y parenquimáticas. La acción de los nematodos desencadena una respuesta del hospedante que conduce a la perturbación del transporte hídrico y finalmente a su muerte por cavitación (FUKUDA, L., FUKUDA, K., HOGETSU, T. y SUZUKI, K. Cavitation and cytological changes in xylem of pine seedlings inoculated with virulent and avirulent isolates of *Bursaphelenchus xylophilus*

35

and *B. mucronatus*. J. 1992. Jpn. For. Soc, vol. 74, no. 4, pp. 289-299.). La muerte de los árboles sucede de forma rápida, los pinos infectados a comienzo de verano, aparentemente sanos, mueren al final de éste, manteniendo las acículas secas y rojizas en los ramillos (MAMIYA, Y. y KIYOHARA, T. Description of *Bursaphelenchus lignicolus* N. Sp. (Nematoda: Aphelenchoididae) from Pine Wood and histopathology of nematode-infested trees. 1972. Nematologica, vol. 18, pp. 120-124.). La primera referencia al NMP fuera de su área nativa que es América del Norte ocurrió en Japón en 1905 (MAMIYA, Y. Pathology of the Pine Wilt Disease caused by *Bursaphelenchus xylophilus*. 1983. Annual review of phytopathology, vol. 21, pp. 201-20.). En dicho país se ha convertido en la principal plaga forestal, causando pérdidas anuales entre uno y dos millones de metros cúbicos de sus pinos autóctonos como *Pinus densiflora* Siebold & Zucc, *Pinus thunbergii* Parl y *Pinus luchuensis* Mayr (FIRMINO, P.N., CALVÃO, T., AYRES, M.P. y PIMENTEL, C.S. *Monochamus galloprovincialis* and *Bursaphelenchus xylophilus* life history in an area severely affected by pine wilt disease: Implications for forest management. 2017. Forest Ecology and Management, vol. 389, pp. 105-115).

En torno al año 1980 se extendió a China, Corea y Taiwán. En Norteamérica, donde los pinos nativos no son susceptibles, se ha manifestado la enfermedad sobre especies introducidas como *Pinus nigra* J.F. Arnold y *Pinus sylvestris* L., y en Méjico sobre *Pinus estevezii* (Martínez) J. P. Perry. En 1999, se detectó su presencia sobre *Pinus pinaster* Aiton en la bahía de Setúbal en Portugal, desde donde ha acabado extendiéndose por todo el territorio portugués y Madeira. El primer foco detectado en España ocurrió en 2008 en Villanueva de la Sierra (Cáceres). Desde entonces se han declarado varios focos más en nuestro país: en 2010 en As Neves (Pontevedra), en 2012 en Valverde del Fresno (Cáceres), en 2013 en Sancti-Spiritus (Salamanca), en 2016 en Salvaterra do Miño (Pontevedra), este último a menos de dos kilómetros del foco de As Neves. En 2018, surgieron varios en Galicia: O Porriño, Pontearreas y Tui, y en Castilla y León, en Lagunilla. En 2019, se declaró su presencia en Sierra de Malvana (Extremadura).

La dispersión del NMP está necesariamente ligada a un insecto vector, aunque se conocen más de una veintena de especies de coleópteros (Cerambycidae, Curculionidae y Buprestidae) como portadores de *B. xylophilus* (Linit, MJ. Nematode-Vector relationships in the Pine Wilt Disease System. 1988. *Journal of nematology*, vol.

20, no. 2, pp. 227-235), se ha demostrado que únicamente, las especies del género *Monochamus Dejean* han resultado transmisores de la enfermedad (Kobakashi et al. The Japanese Pine Sawyer beetle as the vector of Pine Wilt Disease. 1984. *Annual review of entomology*. Vol. 29, no. 29, pp. 115-135.). Este género comprende unas
5 ciento cincuenta especies en todo el mundo, la mayoría hospedándose sobre coníferas. Nueve de ellas se han identificado como transmisores del NMP, principalmente: *Monochamus alternatus Hope* y *Monochamus saltuarius Gebler* (principales vectores en Asia), *Monochamus carolinensis Olivier*, *Monochamus scutellatus Say* y *Monochamus mutator LeConte* (Norte América) y *M. galloprovincialis*
10 (Europa). Los insectos del género *Monochamus* son fitófagos secundarios sobre tejidos de plantas leñosas. Los adultos se alimentan en el floema de los ramillos de árboles sanos. Realizan las puestas en incisiones en el cambium realizadas con las mandíbulas atravesando la corteza de troncos o ramas de diámetro mayor a cinco centímetros principalmente en pinos moribundos, en condiciones de estrés hídrico o
15 talados recientemente.

El proceso del NMP para introducirse en el vector se lleva a cabo en las cámaras de pupación del insecto. Los NMP detectan estas cámaras y se alojan en el cuerpo del vector una vez el insecto ha pupado. Tras la emergencia del adulto, los nematodos
20 son transportados hacia las ramillas de pinos sanos, a los que se dirigen los insectos para alimentarse y completar su desarrollo. Los nematodos descienden de su vector y son capaces de introducirse en un hospedante susceptible a través de las mordeduras de alimentación.

25 Aunque en todos los focos españoles se están aplicando las medidas de control y erradicación establecidas por el “*Plan Nacional de contingencia frente a Nematodo de la Madera del Pino*” (Ministerio de Agricultura Alimentación y Medio Ambiente, 2014), no se está consiguiendo frenar la expansión, principalmente en Galicia.

30 Por este motivo, el control de los vectores, y en este caso concreto, el control de los insectos del género *Monochamus* se presenta como una estrategia prometedora para frenar la expansión de la enfermedad del marchitamiento del pino.

A continuación, se exponen algunos ejemplos relevantes acerca de distintos métodos de control para estas plagas tanto del insecto vector como de tratamiento de los árboles que están infectados por NMP:

- 5 – La patente ES 2334763 B1 con título “Cebo atrayente para capturar el insecto coleóptero perforador del pino, *Monochamus galloprovincialis*” que describe un cebo atrayente para capturar dicho insecto que comprende al menos una feromona y dos kairomonas atractivas para dicha especie.
- 10 – La solicitud de patente US5452540A se refiere a un dispositivo para usar como trampa tipo embudo para la autoinoculación con agentes activos de insectos. El dispositivo comprende una cámara colectora, una entrada cerca de la parte superior de la cámara para la entrada de insectos desde la trampa y para la dirección de los insectos hacia el agente colocado en la superficie debajo de la entrada, y comprende al menos una salida para el escape de los insectos.
- 15 – La patente KR1018424460000 se refiere a un sistema para tratar árboles infectados, que permite tratar directamente la enfermedad mediante una sustancia insecticida y permite sellado y carga una cantidad efectiva de tratamiento en un determinado número de árboles infectados. Así mismo, este método para tratar los árboles infectados que consiste en emplear el dispositivo que describe. La
20 presente invención se refiere a un método de control de fumigación para árboles infectados con enfermedad del nematodo del pino.

En cualquier caso, existe la necesidad en este campo técnico de disponer de un dispositivo especialmente concebido para el control de la enfermedad del nematodo
25 del pino, mediante el control del insecto vector de esta plaga, evitando el uso de tratamientos químicos y que, de manera específica y eficaz, se pueda adaptar a las distintas necesidades de las zonas forestales afectadas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

30

La presente invención consistente en un nuevo dispositivo que está indicado para la autoinoculación de insectos del género *Monochamus* que permite reducir la población de dichos insectos.

De forma preferida, el nuevo dispositivo objeto de la invención, está especialmente indicado para el insecto forestal perforador *Monochamus galloprovincialis* (Coleoptera: Cerambycidae) que es insecto vector del Nematodo de la Madera del Pino (NMP) que es el causante de la Enfermedad del Marchitamiento del Pino (EMP). Este dispositivo
5 puede ser utilizado con otras especies del género *Monochamus*.

Este dispositivo se engloba dentro de las técnicas de control biológico de especies causantes de plagas o vectores de las mismas, ya que dicho dispositivo actúa atrayendo al insecto de forma específica y actúa sobre él mediante un organismo
10 entomopatógeno, con alta virulencia sobre la especie a controlar, de forma que el insecto a tratar y dicho organismo entomopatógeno entren en contacto produciendo la infección.

De esta manera, la invención se puede aplicar en sectores tales como biotecnología, industria de productos de control forestal o agricultura. Por lo tanto, los inventores
15 proponen un nuevo dispositivo para la autoinoculación de insectos del género *Monochamus*, evitando el efecto indeseado de que insectos de otras especies, que no son objeto de esta invención, puedan inocularse, afectando de manera negativa en el ecosistema donde se coloca este dispositivo.

20

Esto se consigue mediante la configuración particular del dispositivo objeto de la presente invención y sus componentes.

Así en un primer aspecto la invención se refiere a un dispositivo de autoinoculación (1)
25 para insectos del género *Monochamus* que comprende:

- al menos un difusor (2) que comprende al menos una composición atrayente de insectos del género *Monochamus*;
- una pieza colectora (3) que comprende una abertura superior de entrada (3.1), y tiene en su base (3.2) una malla de fondo con una luz de malla comprendida
30 entre 4,5 mm y 8,5 mm;
- un conducto de salida (4) al exterior que se une a la pared lateral de la pieza colectora (3) a una altura comprendida entre 1,0 cm y 4,0 cm con respecto a la base (3.2) de la pieza colectora (3), donde un primer extremo (4.1) del conducto de salida (4) está unido a la pared lateral de la pieza colectora (3) y
35 un segundo extremo (4.2) del conducto de salida (4) está en contacto con el

5 exterior y donde el conducto de salida (4) comprende en su cara interna un material textil rugoso impregnado de un agente entomopatógeno de insectos del género *Monochamus*, de tal forma que cuando un insecto entra por la abertura superior de entrada (3.1) atraído por la composición atrayente y sale a través del conducto de salida (4), se impregna del agente entomopatógeno por rozamiento.

10 En un segundo aspecto, la invención se refiere al uso del dispositivo de autoinoculación (1) de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención para la autoinoculación del género *Monochamus*, y de forma preferida, las especies *Monochamus sutor* y/o *Monochamus galloprovincialis* mediante un agente entomopatógeno. En realizaciones preferidas de la presente invención, el agente entomopatógeno es la cepa EABpb del hongo *Beauveria pseudobassiana*.

15 En un último aspecto, la invención se refiere al uso del dispositivo de autoinoculación (1) de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención para el tratamiento de la Enfermedad del Marchitamiento del Pino.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

20 Para completar la descripción y con objeto de ayudar a una mejor comprensión de las características de la invención, se acompaña a esta memoria descriptiva, como parte integrante de la misma, un conjunto de dibujos en dónde con carácter ilustrativo y no limitativo, se ha representado lo siguiente:

25 • Figura 1.- Fig.1.A. Vista en perspectiva del dispositivo de autoinoculación del insecto del género *Monochamus*. Fig.1.B. Vista en perspectiva de un prototipo del dispositivo de autoinoculación del insecto del género *Monochamus*, donde la pieza colectora y el conducto de salida se unen mediante una pieza de acoplamiento.

30 • Figura 2.- Vista de la planta del dispositivo de autoinoculación donde se observa la malla que se encuentra en la base de la pieza colectora que permite la liberación de insectos de tamaño inferior a *Monochamus* y que no son insectos objetivo para la inoculación con el organismo entomopatógeno.

35 • Figura 3.- Imagen del prototipo del dispositivo instalado en la zona forestal donde se quiere tratar la Enfermedad del Marchitamiento del Pino.

- 5

• Figura 4.- Imagen del detalle del prototipo del dispositivo objeto de la invención y como un insecto objetivo se inocula al salir por el conducto de salida. Fig. 4.A. se observa un prototipo del dispositivo con un conducto con tubo de 2,7 cm de diámetro interno forrado con fieltro de 3 mm de grosor. Fig. 4.B. se observa un insecto de la especie *M. galloprovincialis* autoinoculado con *B. pseudobassiana* 10^{10} conidios/gramo tras su paso por el dispositivo. Fig. 4.C. se observa un insecto de la especie *M. galloprovincialis* autoinoculado.
- 10

• Figura 5.- Imagen de un esquema sobre el funcionamiento del dispositivo de autoinoculación. En la figura 5.A. se observa como ejemplares del género *Monochamus* entran por la apertura superior de la pieza colectora y salen por el tubo de liberación autoinoculándose con el organismo entomopatígeno. En la figura 5.B. se observa como insectos que no pertenecen al género *Monochamus* y son de tamaño menor, se escapan por la malla de la base de la pieza colectora sin entrar en el tubo de liberación, evitando que se autoinoculen y dispersen el organismo entomopatígeno en sus poblaciones. En la figura 5.C. se observa como insectos que no pertenecen al género *Monochamus* y son de tamaño superior, se quedan retenidos en el interior de la pieza colectora, evitando que se autoinoculen y dispersen el organismo entomopatígeno en sus poblaciones.
- 15

• Figura 6.- Detalle de las mallas que definen los tratamientos del experimento 2. Fig. 6.A. Control (C): malla de luz inferior a 2 mm. Fig. 6.B. Malla 6.8 (6.8 M) que es una malla de luz 4,8 mm. Fig. 6.C. Malla 8.5 (8.5 M) que es una malla de luz 6,0 mm.
- 20

• Figura 7.- Resultados de todos los experimentos de campo para definir el dispositivo objeto de la invención. (A) corresponde con los resultados de los experimentos 1 y 2; (B) corresponde con los resultados de los experimentos 3 y 4; (C) corresponde con los resultados de los experimentos 5 y 6; (D) corresponde con los resultados de los experimentos 7 y 8.
- 25

• Figura 8.- Resultados obtenidos con respecto a la captura de insectos no objetivo en los experimentos 1 a 4. (A) corresponde con los resultados de los experimentos 1 y 2; (B) corresponde con los resultados de los experimentos 3 y 4.
- 30

• Figura 9.- Relación entre tiempo en el que los individuos de *M. galloprovincialis* permanecen vitales y la dosis de conidios recibida por unidad de peso (mg).

- Figura 10.- Esquema de funcionamiento del dispositivo de autoinoculación en un experimento realizado en el campo, que corresponde con el experimento 7. Este esquema solo se utiliza para testar la efectividad del sistema. Las trozas no tienen que ser instaladas cuando el dispositivo se utilice para el control del insecto objetivo. En dicho grafico se observa un prototipo del dispositivo objeto de la invención de la que salen insectos *M. galloprovincialis* nativos autoinoculados, que se representan con un círculo en la figura y se dirigen hacia las trozas de pino. En dicho gráfico también se observan insectos *M. galloprovincialis* nativos sin inocular, que se representan con un triángulo y se dirigen hacia las trozas de pino.

En las Figuras:

- (1) representa un prototipo del dispositivo de autoinoculación;
- (2) representa el difusor;
- (3) representa la pieza colectora;
- (3.1) representa la abertura superior de entrada;
- (3.2) representa la base de la pieza colectora;
- (4) representa el conducto de salida;
- (4.1) representa un primer extremo del conducto de salida;
- (4.2) representa un segundo extremo del conducto de salida;
- (5) representa un ejemplo de una pieza de acoplamiento;

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Tal y como se explica más arriba, los inventores proponen un nuevo dispositivo que está indicado para la autoinoculación de insectos del género *Monochamus* que permite reducir la población de dichos insectos.

Esto se consigue mediante un dispositivo que comprende una primera pieza colectora y una segunda pieza o conducto de salida gracias al cual dicho insecto se autoinocula mediante un organismo entomopatógeno por rozamiento.

Así en un primer aspecto la invención se refiere a un dispositivo de autoinoculación (1) para insectos del género *Monochamus* que comprende:

- al menos un difusor (2) que comprende al menos una composición atrayente para insectos del género *Monochamus*;
- una pieza colectora (3) que comprende una abertura superior de entrada (3.1), y tiene en su base (3.2) una malla de fondo con una luz de malla comprendida entre 4,5 mm y 8,5 mm;
- un conducto de salida (4) al exterior que se une a la pared lateral de la pieza colectora (3) a una altura comprendida entre 1,0 cm y 4,0 cm con respecto a la base (3.2) de la pieza colectora (3), donde un primer extremo (4.1) del conducto de salida (4) está unido a la pared lateral de la pieza colectora (3) y un segundo extremo (4.2) de la conducto de salida (4) está en contacto con el exterior y donde el conducto de salida (4) comprende en su cara interna un material rugoso impregnado de un agente entomopatígeno de insectos del género *Monochamus*, de tal forma que cuando un insecto entra por la abertura superior de entrada (3.1) atraído por la composición atrayente y sale a través del conducto de salida (4), se impregna del agente entomopatígeno por rozamiento.

El resultado es la obtención de un nuevo dispositivo de autoinoculación (1) para insectos del género *Monochamus* con un hongo entomopatígeno, que puede ser aplicado de forma operativa para el manejo de la Enfermedad del Marchitamiento del Pino (EMP). Esta aplicación se puede realizar en zonas donde disminuir la densidad del insecto vector sea una estrategia fundamental, como zonas demarcadas o de alto riesgo.

Tal y como se describe en el presente documento, el dispositivo objeto de la invención permite controlar la EMP mediante un sistema de captura y de atracción especialmente pensada para insectos del género *Monochamus*, de tal manera que el insecto entra dentro del dispositivo y facilita su salida a través del conducto de salida donde es infectado por contacto con un agente entomopatígeno y permitir así que dicho insecto inoculado infecte a otros insectos de su biotipo.

Dispositivo de la invención

En base a lo expuesto anteriormente, en un primer aspecto la invención se refiere a un dispositivo de autoinoculación (1) para insectos del género *Monochamus* que comprende:

- al menos un difusor (2) que comprende al menos una composición atrayente de insectos del género *Monochamus*;
- una pieza colectora (3) que comprende una abertura superior de entrada (3.1), y tiene en su base (3.2) una malla de fondo con una luz de malla comprendida entre 4,5 mm y 8,5 mm;
- un conducto de salida (4) al exterior que se une a la pared lateral de la pieza colectora (3) a una altura comprendida entre 1,5 cm y 4 cm con respecto a la base (3.2) de la pieza colectora (3), donde un primer extremo (4.1) del conducto de salida (4) está unido a la pared lateral de la pieza colectora (3) y un segundo extremo (4.2) de la conducto de salida (4) está en contacto con el exterior y donde el conducto de salida (4) comprende en su cara interna un material rugoso impregnado de un agente entomopatógeno de insectos del género *Monochamus*, de tal forma que cuando un insecto entra por la abertura superior de entrada (3.1) atraído por la composición atrayente y sale a través del conducto de salida (4), se impregna del agente entomopatógeno por rozamiento.

En el contexto de la presente invención, se entiende por dispositivo de autoinoculación un dispositivo especialmente diseñado para transferir a un organismo vivo una enfermedad o un agente causal de una enfermedad, la implantación de un microorganismo o un material infeccioso. En el contexto de la presente invención, se habla del término de autoinoculación, ya que un insecto para escapar del dispositivo al exterior tiene que atravesar un conducto de salida el cual está recubierto en su cara interior por un material rugoso que está impregnado por un agente entomopatógeno de insectos del género *Monochamus*. De esta forma, cuando un insecto atraviesa el conducto de salida se inocula con dicho agente entomopatógeno por rozamiento con el material rugoso.

En realizaciones particulares de la presente invención, el dispositivo de autoinoculación (1) está especialmente diseñado para los insectos del género *Monochamus*, siendo de forma preferida los insectos de la especie *Monochamus sutor* y *M. galloprovincialis*, y de forma aún más preferida, para la especie *M. galloprovincialis*.

En el presente documento, los insectos citados anteriormente también se denominan “insectos objetivo”. Así mismo, en el presente documento se hace referencia a insectos no objetivo que son aquellos insectos que, por diferentes causas, entre las que destaca la acción de la composición atrayente, pueden quedar atrapados dentro
5 de la pieza colectora, pero no son los insectos vectores de la Enfermedad del Marchitamiento del Pino, por lo que el dispositivo de la presente invención está especialmente diseñado para evitar su inoculación por el agente entomopatógeno.

En realizaciones particulares de la presente invención, la pieza colectora (3) del
10 dispositivo comprende una abertura superior de entrada (3.1). De manera opcional, la abertura superior de entrada (3.1) puede estar configurada para adaptarse a trampas de insectos que facilitan la captura de los insectos objetivo del presente dispositivo. Cabe señalar que las trampas de insectos que pueden unirse al dispositivo objeto de la invención, son trampas de insectos comúnmente conocidas en el estado de la
15 técnica en el ámbito forestal. Dichas trampas de insectos son un útil que consta de unas láminas deslizantes, que están hechas generalmente de plástico, y que interrumpen el vuelo del insecto a capturar y lo precipitan a la pieza colectora (3) del dispositivo objeto de la invención. La unión entre la trampa de insectos que se describe en el presente documento y la pieza colectora (3) del dispositivo objeto de la
20 invención puede ser fija, estando siempre unidos, o desmontable, por lo que dicho dispositivo (1) y la trampa de insectos se pueden unir y separar. Cabe destacar que el hecho de que sea desmontable, tiene la ventaja de que se puedan emplear distintos tipos de trampas de insectos o incluso se puede reemplazar un dispositivo (1) en el caso de que esté dañado por un nuevo dispositivo objeto de la invención.

25

En realizaciones particulares de la presente invención, tiene forma cilíndrica y la
abertura superior de entrada (3.1) tiene un diámetro de al menos 1 cm, y tiene un diámetro máximo de 12 cm, siendo de forma preferida, un diámetro de 6 cm a 10 cm. En otras realizaciones particulares de la presente invención, el diámetro de la abertura
30 superior de entrada (3.1) es de 1 cm, 2 cm, 3 cm, 4 cm, 5 cm, 6 cm, 7 cm, 8 cm, 9 cm, 10 cm, 11 cm o 12 cm. Esta dimensión se debe a que los insectos objetivo del presente dispositivo, que son insectos del género *Monochamus*, tienen unos élitros cuya anchura está comprendida entre 0,45 y 0,9 cm. En base a este diseño, se asegura la posibilidad de que dichos insectos entren y queden atrapados en la pieza
35 colectora (3).

En otras realizaciones particulares, la pieza colectora (3) tiene una altura, definiéndose como la distancia que hay entre comprende una abertura superior de entrada (3.1), y tiene en su base (3.2), de entre 12 cm y 20 cm, y de forma preferida entre 12 cm y 16
5 cm. En otras realizaciones particulares, la pieza colectora (3) tiene una altura de 12 cm, 13 cm, 14 cm, 15 cm, 16 cm, 17 cm, 18 cm, 19 cm o 20 cm.

De manera opcional, al menos un difusor (2) del dispositivo objeto de la invención puede ser situado en una pieza adicional que une al dispositivo de autoinoculación (1)
10 y que sirve para colocar el dispositivo de autoinoculación (1) en la rama de un árbol a tratar, en la trampa de insectos, que se ha descrito anteriormente, donde se une el dispositivo (1) para atrapar los insectos objetivo, en la superficie exterior de la pieza colectora (3), junto a la abertura superior de entrada (3.1) o en el interior de la pieza colectora (3).

15

En realizaciones particulares de la presente invención, al menos un difusor (2) comprende al menos una composición atrayente de insectos del género *Monochamus*.

En realizaciones particulares de la presente invención, la composición atrayente
20 comprende:

- a. la feromona 2-undeciloxi-1-etanol, y
- b. al menos dos cairomonas atractivas para insectos del género *Monochamus* o al menos un volátil de humo con respuesta antenal por insectos del género *Monochamus*.

25

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

En realizaciones preferidas de la presente invención, la composición atrayente de
30 insectos del género *Monochamus*, comprende la feromona 2-undeciloxi-1-etanol y al menos dos cairomonas atractiva para insectos del género *Monochamus*. De forma preferida, se emplea el cebo objeto de la patente P2334763 B1 cuyo titular es el mismo que el de la presente invención.

En una realización preferida, la cairomona atractiva para insectos del género *Monochamus* se selecciona del grupo que consiste en cairomona del árbol hospedante, cairomona de escolítidos y combinación de las anteriores.

- 5 Es por ello que, en realizaciones preferidas de la presente invención, la composición atrayente comprende la feromona 2-undeciloxi-1-etanol, al menos una cairomona del árbol hospedante y al menos una cairomona de escolítidos, o la feromona 2-undeciloxi-1-etanol y al menos dos cairomonas de escolítidos.
- 10 En realizaciones preferidas de la presente invención, la feromona 2-undeciloxi-1-etanol está presente en la composición atrayente en una cantidad comprendida entre 10 mg y 1000 mg, preferentemente entre 20 y 500 mg, más preferentemente entre 25 y 300 mg y aún más preferentemente entre 40 y 200 mg.
- 15 En realizaciones preferidas de la presente invención, la cairomona del árbol hospedante puede ser un monoterpeno y en realizaciones más preferidas la cairomona del árbol hospedante es α -pineno. En realizaciones preferidas, la cairomona procedente del árbol hospedante está presente en el difusor en una cantidad comprendida entre 1 g y 400 g, preferentemente entre 10 g y 300 g, más
20 preferentemente entre 20 g y 200 g y aún más preferentemente entre 30 g y 100 g.

Según realizaciones particulares de la presente invención, las cairomonas de escolítidos se seleccionan del grupo que consiste en ipsenol, 2-metil-3-butenol, ipsdienol y combinación de las anteriores.

25

En realizaciones preferidas de la presente invención, las cairomonas de escolítidos están presentes cada una en el difusor en una cantidad comprendida entre 10 mg y 20 g, más preferido una cantidad comprendida entre 15 mg y 15 g, y aun más preferente en una cantidad comprendida entre 20 mg y 10 g.

30

En realizaciones particulares de la presente invención, el ipsenol está presente en el difusor en una cantidad comprendida entre 10 mg y 3000 mg, preferentemente entre 15 mg y 2000 mg, más preferentemente entre 20 mg y 1000 mg, y aún más preferentemente entre 20 y 700 mg. En otras realizaciones particulares de la presente

35

invención, el ipsdienol está presente en el difusor en una cantidad comprendida entre

10 mg y 3000 mg, preferentemente entre 15 mg y 2000 mg, más preferentemente entre 20 mg y 1000 mg, y aún más preferentemente entre 20 mg y 700 mg.

5 En otras realizaciones particulares de la presente invención, el 2-metil-3-butenol está presente en la composición atrayente en una cantidad comprendida entre 100 mg y 20000 mg, preferentemente entre 200 mg y 15000 mg, más preferentemente entre 500 mg y 10000 mg, y aún más preferentemente entre 1000 mg y 5000 mg.

10 En otras realizaciones particulares de la presente invención, la composición atrayente de insectos del género *Monochamus*, comprende la feromona 2-undeciloxi-1-etanol y al menos un volátil de humo con respuesta antenal por insectos del género *Monochamus*.

15 En realizaciones preferidas de la presente invención, el volátil de humo con respuesta antenal por insectos del género *Monochamus* que comprende la composición atrayente puede ser: 2-metoxifenol (S1), eugenol (S3) o una combinación de los anteriores. En realizaciones preferidas de la presente invención, donde la composición atrayente comprende uno o más volátiles de humo con respuesta antenal, cada uno de los volátiles de humo se encuentra en una cantidad comprendida entre 20 mg y 1000 mg, preferentemente 20 mg y 1000 mg, siendo de forma más preferida, se encuentra en una cantidad comprendida entre 20 mg y 500 mg.

25 Cabe destacar que la composición atrayente que comprende el difusor (2) tiene una gran importancia para la presente invención, ya que con dicha composición se pretende atraer con la mayor eficacia posible el insecto objetivo evitando a la vez con la mayor eficacia posible la atracción de especies de insectos no objetivo para que no sean inoculadas con el agente entomopatógeno.

30 En realizaciones particulares de la presente invención, la pieza colectora (3) comprende una malla de fondo en su base (3.2). Dicha malla tiene una luz de malla que está comprendida entre 4,5 mm y 8,5 mm, siendo de forma preferida, entre 5,0 mm y 8,0 mm, y aún más preferentemente, entre 6,0 mm y 7,5 mm. En otras realizaciones particulares, la luz de malla puede ser de 4,5 mm, 5,0 mm, 5,5 mm, 6,0 mm, 6,5 mm, 7,0 mm, 7,5 mm, 8,0 mm o 8,5 mm.

35

Cabe señalar que la malla que se sitúa en la base de la pieza colectora (3) tiene una importancia muy relevante para el dispositivo objeto de la invención, ya que dicha malla permite la fuga de insectos que son atraídos por la composición atrayente que comprende el dispositivo, pero que no pertenecen al grupo de insectos objetivo para el presente dispositivo. De esta manera, al tener una malla por la que puedan escapar, se evita que dichos insectos no objetivo atraviesen el conducto de salida evitando, por tanto, que sea inoculados por el agente entomopatógeno.

En una realización preferida de la presente invención, el agente entomopatógeno es la cepa EABpb del hongo *Beauveria pseudobassiana*, recogida en el Genbank con número: AY531938, la cual presenta un alto poder virulento sobre los insectos del género *Monochamus* y, de forma preferida, los insectos de la especie *Monochamus sutor* y *M. galloprovincialis*. Esta cepa EABpb del hongo *Beauveria pseudobassiana* presenta una buena capacidad de transmisión horizontal, entre individuos de distinto sexo durante el apareamiento, y vertical, al producirse una reducción del número de puestas en las hembras infectadas. Dicha cepa ha sido descrita en el artículo científico: G. Álvarez-Baz, M. Fernández-Bravo J. Pajares E. Quesada-Moraga. Potential of native *Beauveria pseudobassiana* strain for biological control of Pine Wood Nematode vector *Monochamus galloprovincialis*. 2015. *Journal of Invertebrate Pathology*. 132 (2015) 48–56.

En realizaciones particulares de la presente invención, la infección con la cepa EABpb de *Beauveria pseudobassiana* se realiza mediante formulaciones en talco que se depositan en el material rugoso que comprende el conducto de salida en su cara interna. En realizaciones preferidas de la presente invención, se preparan formulaciones en forma de talco que tienen una concentración de entre 10^9 y 10^{10} conidios/gramo. En realizaciones más preferidas de la presente invención, la concentración de la formulación es de 10^{10} conidios/gramo.

En realizaciones particulares de la presente invención, el material rugoso está impregnado de la formulación en talco de los conidios de la cepa EABpb de *Beauveria pseudobassiana*. La estructura del material rugoso permite la retención adecuada de la formulación en talco, de modo que el cuerpo del insecto objetivo, al salir por el conducto de salida, roza contra el material rugoso queda inoculado por los conidios de la formulación.

En el contexto de la presente invención, se entiende que el material rugoso está impregnado de la formulación en talco de los conidios de la cepa EABpb del hongo *Beauveria pseudobassiana* ya que, para obtenerlo, dicho material rugoso se impregna por inmersión en la formulación de dicha cepa.

En realizaciones particulares de la presente invención, el conducto de salida (4) se une a la pared lateral de la pieza colectora (3) a una altura comprendida entre 1 y 4 cm con respecto a la base de la pieza colectora (3). En realizaciones preferidas de la presente invención, la altura en la que se sitúa el conducto de salida (4) se encuentra a una altura comprendida entre 2 cm y 4,5 cm, de forma aún más preferida, se encuentra a una altura comprendida entre 2,5 cm y 3 cm. Además, en realizaciones preferidas de la presente invención, la altura con respecto a la base de la pieza colectora (3) a la que se encuentra el conducto de salida (4) puede ser de 1,5 cm, 2 cm, 2,5 cm, 3 cm, 3,5 cm, o 4 cm.

Gracias a la altura a la que se encuentra el conducto de salida (4), el dispositivo objeto de la presente invención permite evitar que insectos no objetivo, que pueden verse atraídos por la composición atrayente y hayan quedado atrapados en la pieza colectora, salgan a través del conducto de salida (4), evitando así, por tanto, que sean inoculados por el agente entomopatógeno. Esta característica técnica del dispositivo objeto de la invención minimiza el potencial impacto sobre otras especies de insectos forestales no objetivo presentes en la masa forestal y que hayan sido capturados accidentalmente o traídos por la composición atrayente.

En realizaciones particulares de la presente invención, el conducto de salida (4) tiene una longitud comprendida entre 6 cm y 14 cm, siendo de forma preferida, entre 7,5 cm y 12 cm, y aún más preferida entre 8,5 cm y 10 cm. En realizaciones particulares de la presente invención, la longitud del conducto de salida (4) puede ser de 6 cm, 6,5 cm, 7 cm, 7,5 cm, 8 cm, 8,5 cm, 9 cm, 9,5 cm, 10 cm, 10,5 cm, 11 cm, 11,5 cm, 12 cm, 12,5 cm, 13 cm, 13,5 cm o 14 cm.

En realizaciones particulares de la presente invención, el conducto de salida (4) tiene forma tubular o cilíndrica. Es por ello, que, en otras realizaciones particulares, el conducto de salida (4) tiene un diámetro que está comprendido entre 2 cm y 5 cm,

siendo de forma preferida, entre 2,5 cm y 4 cm, y aún más preferida entre 2,5 cm y 3 cm. En realizaciones particulares de la presente invención, el diámetro del conducto de salida (4) puede ser de 2 cm, 2,5 cm, 3 cm, 3,5 cm, 4 cm, 4,5 cm o 5 cm.

5 Cabe destacar que tanto la forma como las medidas del conducto de salida (4) están especialmente diseñadas para que el insecto, una vez capturado dentro de la pieza colectora (3) se vea obligado a atravesar el conducto de salida (4) para salir al exterior. De esta forma, las dimensiones del conducto de salida (4) permite la salida de los insectos objetivos, pero, además, su forma y sus dimensiones son lo suficientemente
10 reducidos para obligar al insecto capturado a atravesar el conducto de salida (4) arrastrándose con esfuerzo. Gracias a este hecho, el cuerpo del insecto objetivo se roza con el material rugoso impregnado y situado en la cara interna de dicho conducto asegurándose así la inoculación con el agente entomopatígeno mediante rozamiento.

15 De manera opcional, el conducto de salida (4) al exterior puede unirse a la pared lateral de la pieza colectora (3) mediante una pieza de acoplamiento (5). En esta realización preferida, la pieza de acoplamiento está a una altura comprendida entre 1 cm y 4 cm con respecto a la base pieza colectora (3). Además, en esta realización preferida, un primer extremo (4.1) del conducto de salida (4) está configurado de tal
20 manera que puede unirse a la pieza de acoplamiento (5). Gracias a esta realización opcional, el conducto de salida (4) puede unirse a la pieza colectora (3) de tal manera que queda acoplada permitiendo la salida de los insectos objetivo a través de dicho conducto, pero además, el conducto de salida puede desacoplarse de la pieza colectora (3) permitiendo que un conducto de salida cuya cantidad del agente
25 entomopatígeno se haya reducido o incluso agotado pueda ser intercambiado por otro conducto de salida (4) que comprenda una carga del agente entomopatígeno suficiente para llevar a cabo la inoculación de insectos objetivo.

En base a lo anterior, el conducto de salida (4) se une a la pared lateral de la pieza
30 colectora (3) mediante la pieza de acoplamiento (5) que se encuentra a una altura comprendida entre 1 cm y 4 cm con respecto a la base de la pieza colectora (3). En realizaciones preferidas de la presente invención, la altura en la que se sitúa la pieza de acoplamiento se encuentra a una altura comprendida entre 2 cm y 4,5 cm, de forma aún más preferida, se encuentra a una altura comprendida entre 2,5 cm y 3 cm.
35 Además, en realizaciones preferidas de la presente invención, la altura con respecto a

la base de la pieza colectora (3) a la que se encuentra la pieza de acoplamiento es de 1,5 cm, 2 cm, 2,5 cm, 3 cm, 3,5 cm o 4 cm.

5 Gracias a la altura a la que se encuentra la pieza de acoplamiento (4), el dispositivo objeto de la presente invención permite evitar que insectos no objetivo que pueden verse atraídos por la composición atrayente y hayan quedado atrapados en la pieza colectora, salgan a través del conducto de salida (4), evitando así, por tanto, que sean inoculados por el agente entomopatógeno. Esta característica técnica del dispositivo objeto de la invención minimiza el potencial impacto sobre otras especies de insectos
10 forestales no objetivo presentes en la masa forestal y que hayan sido capturados accidentalmente o atraídos por la composición atrayente.

En realizaciones particulares de la presente invención, el material rugoso que se encuentra sobre la cara interna del conducto de salida (4) del dispositivo objeto de la
15 invención es un textil no tejido cuya superficie tiene una textura rugosa. Se entiende por superficie rugosa aquellas superficies que contienen arrugas o sea que se presentan al tacto y en general también a la vista, como no lisas, con pliegues o dobleces.

20 En realizaciones particulares de la presente invención, el material rugoso tiene un grosor que está comprendido entre 1,5 mm y 4 mm, siendo en una realización preferida entre 2 mm y 3,5 mm, y siendo en una realización aún más preferida entre 2,5 mm y 3 mm. En otras realizaciones particulares, el material rugoso tiene un grosor que de 1,5 mm, 2 mm, 2,5 mm, 3 mm, 3,5 mm o 4 mm.

25

En el ámbito de protección de la presente invención, se entiende por textil no tejido una tela no tejida o un tipo de textil producido al formar una red con fibras unidas por procedimientos mecánicos, térmicos o químicos, pero sin ser tejidas y sin que sea necesario convertir las fibras en hilo.

30

De forma particular, el textil no tejido que puede emplearse en la presente invención puede comprender fibras que se selecciona del grupo que consiste en rayón, poliéster, algodón, polipropileno, nylon, pulpa de madera, borra, lana, pelo conglomerado, fibra de vidrio y combinación de las anteriores.

35

En una realización preferida de la presente invención, el textil no tejido puede ser fieltro. En el contexto de la presente invención, se entiende por fieltro un tejido una tela hecha de borra, lana o pelo conglomerado, sin tejer, que se obtiene por prensado.

5 En realizaciones particulares de la presente invención, el material rugoso está impregnado con un agente entomopatógeno. En el contexto de la presente invención, el significado de agente entomopatógeno se refiere a los microorganismos capaces de causar una enfermedad al insecto plaga, conduciéndolo a su muerte después de un corto período de incubación. Existen varios tipos, entre ellos hongos, bacterias,
10 nematodos y virus.

En realizaciones particulares de la presente invención, el material rugoso está impregnado de una formulación en talco de la cepa EABpb de *Beauveria pseudobassiana* a una concentración comprendida entre 10^9 y 10^{10} conidios/gramo.
15 De forma preferida, el material rugoso está impregnado de una formulación en talco de la cepa EABpb de *Beauveria pseudobassiana* con una concentración de 10^{10} conidios/gramo.

Usos de la invención

20

En un segundo aspecto, la invención se refiere al uso del dispositivo de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención para la autoinoculación de insectos del género *Monochamus* con un agente entomopatógeno, siendo de forma preferida, para la autoinoculación de insectos de las especies *Monochamus galloprovincialis* y/o
25 *Monochamus sutor*. En realizaciones preferidas, los insectos del género *Monochamus* son inoculados por la cepa EABpb de *Beauveria pseudobassiana*.

Un aspecto adicional de la presente invención es el uso del dispositivo de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención para el tratamiento de la Enfermedad del
30 Marchitamiento del Pino.

El dispositivo de la presente invención y su uso para el control de poblaciones de insectos del género *Monochamus*, presente numerosos beneficios con respecto a los métodos en los que exclusivamente se reducen al control de dichas plagas mediante
35 la captura masiva, y se enumeran a continuación:

- Incremento de la reducción de las poblaciones de dichos insectos hasta un máximo del 55% en las siguientes generaciones, mediante la reducción de la progenie hasta un 45%.
 - Dispersión de un organismo entomopatógeno altamente virulento sobre los insectos adultos del género *Monochamus*, permitiendo su establecimiento y propagación de una manera biológicamente controlada.
 - Se trata de una técnica de control biológico por lo que su utilización de otros tipos de tratamientos químicos o de otra naturaleza.
 - Se reduce el tiempo empleado en el mantenimiento operativo de los dispositivos objeto de la invención. Actualmente, se deben revisar de forma quincenal, vaciar el contenido y analizar el mismo en busca de nematodo. Con este sistema el mantenimiento se reduce a una sustitución mediante desenroscado de la pieza de inoculación gastada y la colocación de una nueva pieza de inoculación mediante roscado a la pieza de atracción.
- 15 Todos los términos y modos de realización descritos anteriormente son aplicables a cualquier aspecto y modo de realización de la invención. De acuerdo con la presente invención, el término en singular "el", "la", "un", "uno", "una", se refiere igualmente a su correspondiente en plural "los", "las", "unos", "unas", salvo que se desprenda del contexto que claramente el término se refiere a una especie en el singular. El término "comprende" o "que comprende", tal y como se usa en el presente documento, también describe "consiste en" o "que consiste en" de acuerdo con la práctica de patentes generalmente aceptada.

REALIZACIONES PREFERIDAS

25

La siguiente invención se describe por medio de los siguientes ejemplos, que deben interpretarse como meramente ilustrativos y no limitativos del alcance de la invención.

Experimento 1: Prototipo del dispositivo de autoinoculación (1) para insectos del género *Monochamus*:

El prototipo del dispositivo de autoinoculación (1) para insectos del género *Monochamus* que comprende:

- un difusor (2), que a su vez comprende una composición atrayente para el género *Monochamus*;

- una pieza colectora (3), que comprende en su pared lateral una perforación que de 27 mm de diámetro y que se encuentra a una determinada altura del fondo de dicha pieza colectora (3);
- y un conducto de salida (4) al exterior que es de plástico y de forma tubular, y que se encuentra abierto por los dos extremos (4.1, 4.2).

El conducto de salida (4) tiene un primer extremo (4.1) que por su configuración se une a la pieza colectora (3). El extremo opuesto del tubo (3.2) está abierto al exterior.

10 En esta realización particular, se coloca en la pared lateral de la pieza colectora (3) un sistema de acoplamiento entre la pieza colectora (3) y el conducto de salida (4) que es una rosca. En este ejemplo particular, la rosca se adhirió a la pieza colectora (3) mediante adhesivo termofusible (Figura 1.B).

15 De esta forma el conducto de salida (4), abierto en sus dos extremos, se podía conectar a la pieza colectora simplemente enroscándolo, quedando una vía de escape para los insectos desde el interior de la pieza colectora (3).

Además, la pieza colectora (3) tiene en su base (3.2) una malla que tiene luz de malla para permitir el escape de los insectos no objetivo.

El conducto de salida (4) comprende en su superficie interna un recubrimiento de un material textil, que en este caso particular es fieltro. En este fieltro se aplica la formulación en talco de conidios del organismo entomopatógeno.

25

El fieltro permite la retención del inóculo, de modo que el insecto al salir del dispositivo de autoinoculación (1) por el conducto de salida (4), roza contra el inóculo y contamina su cuerpo con los conidios del hongo (Véase figura 4).

30 El hongo utilizado en este experimento fue la cepa EABpb de *Beauveria pseudobassiana* cultivado en placas Petri para obtener una cantidad de conidios suficiente, preparándose en particular dos tipos de formulaciones en talco: 10^9 y 10^{10} conidios/gramo.

Se determinó, en laboratorio, la dosis necesaria que produjera la muerte del insecto inoculado tras 5 días. Se estima este periodo suficiente para permitir la dispersión del inóculo dentro del biotopo del insecto y entre sus congéneres, principalmente durante la cópula, al tiempo que elimina el ejemplar inoculado. En los siguientes experimentos se muestran los resultados con respecto a la eficacia en la inoculación de los insectos objetivo, así como la mejora significativa para evitar que insectos no objetivo sean inoculados por el agente entomopatógeno.

Ejemplo 2: Estudio sobre los distintos tipos de malla.

10 La composición atrayente que emplea el dispositivo objeto de la invención resulta atractiva para diversas especies de coleópteros depredadores y xilófagos que son capturadas y podrían resultar inoculadas con la cepa EABpb de *Beauveria pseudobassiana*.

15 En este experimento se estudian tres prototipos del dispositivo según el ejemplo 1 con un conducto de salida (4) de 6,5 cm de longitud y un diámetro interior 2,7 cm, y se testaron tres mallas, como se puede ver en la figura 6:

- Control: Malla de luz 2,0 mm,
- Experimento 1: Malla 6.8 (6.8 M): malla de luz 4,8 mm, y
- 20 • Experimento 2: Malla 8.5 (8.5 M): malla de luz 6,0 mm.

Los resultados obtenidos demostraron que el dispositivo de este experimento 2, funciona para *M. galloprovincialis*.

25 Para poder ver la tasa de autoinoculación de los insectos *M. galloprovincialis*, así como los insectos no objetivos liberados por cada una de los 3 tipos de mallas, se colocaron botes auxiliares para poder hacer un recuento posterior.

30 Casi todos los capturados se autoliberaron a través del conducto de salida (4) y siendo retenidos en el bote auxiliar para su recuento, y unos pocos quedaron retenidos y no se autoliberaron, ni se escaparon por la malla de fondo ($0,21 \pm 0,19$ y $0,14 \pm 0,14$ capturas/dispositivo, en 8.5 M y 6.8 M, respectivamente) lo que indica que *M. galloprovincialis* es capaz de utilizar dicho dispositivo sin problema.

35 Se capturaron un total de 12 especies de coleópteros saproxílicos, de los gremios de depredadores (2), xilófagos (5) y saproxilófagos (5), pertenecientes a las familias

Trogossitidae, *Cleridae*, *Elateridae*, *Cerambycidae* y *Buprestidae*, en cada uno de los experimentos 1 y 2 (Tabla 1).

De ellas, únicamente se analizaron aquellas que presentaron un número total de capturas superior a 20 en cualquiera de ambos ensayos

Familia	Género y especie Autor	Tipo ¹	Anchura máx. (mm)	Captura Ext.1	Captura Ext. 2
Trogossitidae	<i>Temnochila caerulea</i> Olivier	D	3,0/5,0	318	208
Cleridae	<i>Thanasimus formicarius</i> L.	D	1,5/3,0	164	16
Elateridae	<i>Lacon punctatus</i> Herbst	SX	3,0/5,5	4	2
	<i>Stenagostus rufus</i> De Geer	SX	4,0/5,5	2	2
Cerambycidae	<i>Spondylus buprestoides</i> G.	SX	4,0/8,0	105	224
	<i>Acanthocinus aedilis</i> L.	SX	1,5/3,0	3	4
	<i>Arhopalus ferus</i> Mulsant	X	2,0/4,0	0	12
	<i>Hylotrupes bajulus</i> L.	SX	4,0/6,0	7	1
	<i>Xylotrechus arvicola</i> Olivier	X	3,0/4,0	1	0
Buprestidae	<i>Buprestis novemmaculata</i> L.	X	5,0/9,0	93	68
	<i>Buprestis rustica</i> L.	X	5,0/9,0	24	41
	<i>Chalcophora mariana</i> L.	X	9,0/11,0	64	42

Tabla 1. Capturas de coleópteros saproxílicos no objetivo en los experimentos 1 y 2. D (depredador), X (xilófagos), XF (xilofungívoros) y SX (saproxilófagos). Anchura máx.: se mide en la parte más ancha de los élitros.

En la Tabla 1 se pueden observar las capturas de los principales insectos no objetivos ocurridas en los experimentos 1 y 2. Los prototipos del tratamiento control retuvieron en su pieza colectora un apreciable número de insectos no objetivo ($17,90 \pm 4,65$ capturas/dispositivo), mientras que ningún insecto fue encontrado en las piezas colectoras colectores de los dispositivos con fondo de malla más abierta. Aunque no fue registrado, gran número de estos insectos debieron escapar a través del fondo de malla, si bien algunos lo hicieron a través del dispositivo de autoliberación de *M. galloprovincialis* ($5,11 \pm 1,29$ y $5,04 \pm 1,32$ capturas/dispositivo), 8.5 M y 6.8 M respectivamente.

Comparando con las capturas de los controles, se puede estimar que el 72 % de los insectos no objetivo se escaparon a través de las mallas preparadas a tal efecto, pero el resto se autoliberaron a través del dispositivo para *Monochamus*, de forma que serían infectados con el hongo entomopatógeno.

5

No se encontraron diferencias significativas entre ambos tipos de tratamientos, malla de 6,0 mm de luz y de 4,8 mm, lo que muestra que cualquiera de ellas funciona adecuadamente como sistema de escape de insectos no objetivo de menor tamaño que *M. galloprovincialis*. Si se realiza un análisis por especie entre las principales capturas no objetivo, resulta destacable (Tabla 4) la reducción significativa de capturas de *S. buprestoides* y especialmente de los depredadores *T. caerulea* (reducción del 96 % en el número de capturas de los tratamientos respecto al control) y *T. formicarius* (reducción del 67 %). Esta reducción indica que el sistema de escape es eficiente para las dos principales especies de depredadores del hábitat subcortical capturados. El resto de las especies no objetivo no mostraron diferencias significativas entre los 3 tratamientos, siendo el número de capturas por dispositivo bajo (entre $0,32 \pm 0,25$ y $1,39 \pm 0,59$).

10

15

Género y especie (Autor)	Control	Escapados por dispositivo (6.8 M)	Escapados por dispositivo (8.5 M)
<i>Buprestis novemmaculata</i> (L.)	0,82±0,55 a	1,39±0,69 a	1,11±0,69 a
<i>Buprestis rustica</i> (L.)	0,32±0,25 a	0,18±0,21 a	0,36±0,26 a
<i>Chalcophora mariana</i> (L.)	0,82±0,36 a	1,00±0,45 a	0,46±0,28 a
<i>Spondylus buprestoides</i> (Gressitt)	1,39±0,59 a	0,68±0,45 b	1,68±0,71 a
<i>Thanasimus formicarius</i> (L.)	3,43±1,42 a	1,14±0,53 b	1,29±0,49 b
<i>Temnochila caerulea</i> (Olivier)	10,8±4,04 a	0,43±0,24 b	0,14±0,17 b

20

Tabla 2. Media de individuos por dispositivo de cada una de las especies no objetivo capturadas en el tratamiento control, o que utilizaron el dispositivo de autoliberación para escapar en los tratamientos ME (Malla Estrecha) y MA (Malla Ancha) el experimento 1. Medias para cada especie seguidas de la misma letra no son diferentes significativamente, $p < 0.05$)

25

A partir de los resultados de este experimento se opta por sustituir la malla de fondo estándar por la de 6,0 mm de luz (8.5 M)

Ejemplo 3: Estudio sobre la selectividad de los prototipos del dispositivo

Los resultados obtenidos en el Experimento 1, condujeron estudios sobre la selectividad del dispositivo, evitando que los individuos no objetivo que no podían escapar a través de la malla del fondo de la pieza colectora no lo hiciesen a través del dispositivo de autoliberación de *M. galloprovincialis*. Para ello en el experimento 2 se testó la elevación de dicho dispositivo a 2,0 cm por encima de la base (3.2) de la pieza colectora (3), provisto de malla 8.5 M (6,0 mm de luz).

No se encontraron diferencias significativas en las capturas de *M. galloprovincialis* entre los tratamientos. Como en el experimento anterior, puede deducirse que ninguno de los *M. galloprovincialis* escapó a través de la malla del fondo, y todos lo hicieron a través del dispositivo preparado para ello, sin diferencias entre el que estaba conectado a la pieza colectora a ras de fondo (TB) o 2,0 cm en altura con respecto a la base (TA). Se observa que hubo una disminución del número total de individuos no objetivo capturados en todos los tratamientos, comparado con el experimento 1 (785 frente a 620), excepto en dos especies. No se encontró ningún individuo retenido en los tratamientos con fondo de Malla Ancha, mientras que se observó una ligera reducción no significativa en el número de insectos que escaparon a través del dispositivo elevado (TA) comparado con el dispositivo bajo ($1,62 \pm 0,65$ en TA frente a $2,12 \pm 0,84$ en TB de capturas medias/dispositivo).

Si se analizan los resultados por cada una de las principales especies no objetivo (Tabla 5), se puede ver que hubo un menor número de capturas en cada una de ellas comparados con el experimento 1, pese a la mayor duración del experimento 2, excepto del cerambícido *S. buprestoides* que aumentó notablemente su número. Es destacable la reducción general en las capturas de los depredadores *T. formicarius* y *T. caerulea*. En cualquier caso, la elevación del dispositivo sólo supuso ligeras mejoras, no significativas, en las especies *B. novemmaculata* y *S. buprestoides*.

30

Género y especie (Autor)	Control	Escapados a través de dispositivo (TB)	Escapados a través de dispositivo (TA)
<i>Buprestis novemmaculata</i> (L.)	0,30±0,37 a	0,34±0,30 a	0,25±0,25 a
<i>Buprestis rustica</i> (L.)	0,14±0,16 a	0,23±0,26 a	0,14±0,13 a
<i>Chalcophora mariana</i> (L.)	0,21±0,19	0,21±0,21 a	0,13±0,13 a

	a		
<i>Spondylus buprestoides</i> (Gressitt)	0,82±0,38	1,26±0,54 a	0,83±0,37 a
	a		
<i>Thanasimus formicarius</i> (L.)	0,16±0,20	0,00±0,00 b	0,05±0,08 ab
	a		
<i>Temnochila caerulea</i> (Olivier)	2,60±2,25	0,05±0,08 b	0,05±0,08 b
	a		

5 Tabla 3. Media de individuos por prototipo de dispositivo de cada una de las especies no objetivo capturadas en el tratamiento control, o que utilizaron el dispositivo de autoliberación para escapar en los tratamientos TA: Tubo Alto (1,0 cm por encima del fondo) o TB: Tubo Bajo (enrasado con el fondo del experimento 2. Medias para cada especie seguidas de la misma letra no son diferentes significativamente, $p < 0.05$)

Ejemplo 4: Estudio sobre la altura con respecto a la base de la pieza colectora a la que se dispone el conducto de salida del dispositivo

10

El dispositivo descrito y testado en los experimentos 1 y 2 puede incorporar fácilmente la función de autoinoculación, añadiendo un recubrimiento interior en el tubo de un fieltro que es un textil no tejido a modo de forro interno. En este fieltro se aplicará la formulación de conidios del hongo en talco, de modo que al escapar por el tubo el insecto roza contra el fieltro impregnado en el inóculo formulado en talco y contamina su cuerpo con los conidios (Figura 4).

15

Así se plantearon los experimentos 3 y 4 que evaluaron la efectividad en la autoliberación de *M. galloprovincialis* donde el conducto de salida (4) tiene 10 cm de longitud, recubierto con fieltro de 1,5 mm de grosor. Al mismo tiempo se evaluaron las alturas de conexión de dicho dispositivo de autoinoculación para conseguir la reducción del escape de los insectos no objetivo que por tamaño superior no pueden escapar a través de la malla de fondo de 6,0 mm de luz.

20

- 25
- Experimento 3: se testaron las alturas en la base (3.2) de la pieza colectora (3) y la altura de 2 cm con respecto a la base (3.2).
 - Experimento 4: se testaron las alturas de 2 y 4 cm en altura con respecto a la base (3.2).

Los resultados mostraron un correcto funcionamiento del sistema de autoinoculación en relación a la autoliberación de *M. galloprovincialis* en una altura de 2 cm, pero se producía un aumento en el número de *Monochamus* retenidos en la pieza colectora, que no escapaban a través de la malla de fondo, y no eran capaces de alcanzar el dispositivo de autoinoculación para liberarse.

Los resultados indicaron que el dispositivo de autoinoculación de 100 mm de longitud, 27 mm de diámetro interno, forrado internamente con fieltro de 1,5 mm de grosor, colocado a una altura de 2,0 cm de la base (3.2) modificado mediante la sustitución de la malla de fondo por una de 6,0 mm de luz, permite la autoinoculación de la práctica totalidad de los individuos de *M. galloprovincialis* capturados. Además, la malla de fondo permite el escape de la mayoría de insectos no objetivo capturados.

Ejemplo 5: Estudio sobre la composición atrayente que comprende el dispositivo

15

Así mismo se realizó un experimento 5 donde la composición atrayente comprende volátiles de humo con respuesta antenal por *M. galloprovincialis*. Se compararon dos tipos de composiciones atrayentes:

- P+S1: Un difusor con la feromona 2-undeciloxi-1-etanol (P) y un segundo difusor de 2-Metoxifenol (S1).
- P+K: Un difusor con la feromona 2-undeciloxi-1-etanol (P) y un difusor con al menos dos kairomonas atractivas para insectos del género *Monochamus* (K).

En este experimento se utilizaron los difusores (2) descritos en el párrafo anterior y la pieza colectora (3) pero no se instaló el conducto de salida (4), puesto que se pretendía comparar el número total de *M. galloprovincialis* y de insectos no objetivo capturados.

Los resultados no mostraron diferencias significativas entre el número total de capturas de *M. galloprovincialis* (376 con P+K frente a 471 con P+S1).

30

Sin embargo, el número de capturas de insectos no objetivo se redujo significativamente (894 con P+K frente a 121 con P+S1).

35

Ejemplo 6: Estudio sobre el grosor del material rugoso del dispositivo

Así mismo se realizaron los experimentos 6, 7 y 8 donde se compararon diferentes dispositivos de autoinoculación (1) con distintos grosores de fieltro 1,5 mm y 3 mm en el dispositivo de autoliberación de 2,7 cm de diámetro interno y 10 cm de longitud.

- Experimento 6: con fieltro de 3 mm
- 5 • Experimento 7: con fieltro de 1,5 mm
- Experimento 8: con distintas combinaciones del dispositivo con fieltro de 1,5 mm.

Resumen de los experimentos llevados a cabo (Tabla 4) y resultados obtenidos (Figura 7):

Exp.	Trat	Comp Atray	Malla fondo (luz, mm)	Altura de conexión (cm)	Long./diam. del D. A. (cm)	Fieltro (mm)
1	6.8 M	P+K	4,8	0	6,5 / 2,7	NO
	8.5 M		6,0	0		
	C		1,0	-		
2	0 H	P+K	6,0	0	6,5 / 2,7	NO
	2 H		1,0	2		
	C		-	-		
3	0 H	P+K	6,0	0	10 / 2,7	1,5
	2 H		1,0	2		
	C		-	0		
4	0 H	P+K	6,0	0	10 / 2,7	1,5
	4 H		1,0	4		
	C		-	-		
5	C	P+K	-	-	-	-
	P+S1	P+S1	-	-	-	-
6	C_P+K	P+K	-	-	-	-
	C_S3	P+S3	-	-	-	-
	SR_P+K	P+K	6,0	2	10 / 2,7	3
	SR_S3	P+S3	-	-		
7	C_P+K	P+K	-	-	-	-
	C_S3	P+S3	-	-	-	-
	D_P+K	P+K	6,0	2	10 / 2,7	1,5
	D_S3	P+S3	-	-		
8	C_P+K	P+K	-	-	-	-
	C_S	P+S1+S3	-	-	-	-
	D_P+K	P+K	6,0	2	10 / 2,7	1,5
	D_S	P+S1+S3	-	2		

10

Tabla 4. Descripción de los experimentos de campo realizados. P+K: Un difusor comprende un difusor con la feromona 2-undeciloxi-1-etanol (P) y al menos dos caïromonas atractivas para insectos del género *Monochamus* (K); Un difusor

comprende un difusor con la feromona 2-undeciloxi-1-etanol (P) y S1: difusor de 2-Metoxifenol o S3: difusor de Eugenol; S: difusores de 2-Metoxifenol y Eugenol. C: hace referencia a la pieza colectora, sin dispositivo de autoinoculación. D: hace referencia a pieza colectora con dispositivo de autoinoculación. Filtro: Recubrimiento interno del dispositivo de autoliberación con fieltro de 1,5 mm o 3 mm de grosor.

A continuación, se muestran los principales resultados de todos los experimentos de campo que han permitido el desarrollo y configuración del dispositivo de autoliberación y autoinoculación actual.

Se indica “Retenidos” para los ejemplares capturados de *M. galloprovincialis* que permanecieron en la pieza colectora, es decir, no fueron capaces de autoliberarse a través del dispositivo y no consiguieron escapar a través de la malla de fondo. Por el lado contrario, se indican como “Autoliberados” los adultos capturados de *M. galloprovincialis* que utilizaron el dispositivo de autoliberación y fueron recapturados en el bote auxiliar (Figura 7). Los datos muestran la media de los insectos capturados por dispositivo durante todo el periodo de experimentación (véase la tabla 4)

En la Figura 7 se muestran los resultados obtenidos en todos experimentos de campo. La explicación de cada uno de los experimentos se recoge en la Tabla 4. El tratamiento control (C) no presenta gráficos en el lado derecho porque no tenía un dispositivo de autoliberación, se colocaba en la pieza colectora estándar. En estos gráficos, la mayoría de *M. galloprovincialis* se autoliberó a través del dispositivo. El dispositivo de autoliberación (1) tenía una en la base (3,2) malla del tipo 8.5M (6,0 mm de luz) la malla inferior estándar y se conectó el dispositivo en a 2 cm (2H) por encima de la base tal y como se ha descrito en el ejemplo 1, y en la tabla 1). Además, se emplearon un difusor con la feromona 2-undeciloxi-1-etanol (P) y dos difusores de volátiles de humo (2-Metoxifenol (S1) y eugenol (S3)).

Ejemplo 6: Estudio sobre el inoculo empleado en el dispositivo

Se testaron dos dispositivos, uno basado en un tubo estrecho con filtro fino (EF), y otro en tubo ancho con fieltro grueso (AG). Para este experimento se emplearon conductos de salida (4) con una longitud de 10 cm. Se pueden observar los resultados en la figura 18).

En el mismo ensayo se testaron dos dosis de inóculo, $1 \cdot 10^9$ y $1 \cdot 10^{10}$ conidios/gramo formulados en talco, además de un control sólo con talco y otro control sin talco.

5 El inóculo infeccioso fue preparado de la siguiente manera. Se cultivaron conidios en placas Petri 90 mm con medio extracto de malta-agar durante 15 días. Se extrajeron y se suspendieron en una solución de Tween 80 al 0,1%, se agitó, sónico y filtro para eliminar el micelio. Por último, se determinó la concentración (conidios/gramo) con una cámara Malassez y se prepararon los formulados con talco.

10

Los insectos ensayados procedieron de capturas en Valledado (Segovia) del experimento 2 y Tabuyo del Monte (León).

15 Los insectos adultos aptos *M. galloprovincialis* se clasificaron según su peso en: pequeños (<200 mg), medianos (200-400 mg) y grandes (>400 mg). Los individuos se asignaron a los tratamientos de forma que no hubiese sesgo en el tamaño. Véase la tabla 2. En total se utilizaron 200 adultos de *M. galloprovincialis*.

En total se testaron 8 tratamientos en un diseño factorial 2 dispositivos x 4 dosis:

20

Tratamiento	Dispositivo	Inóculo
AGC		No
AGT	Tubo de 3,5 cm de diámetro + fieltro grueso (3,0 mm)	Talco
AGB9		<i>B. pseudobassiana</i> 10^9 conidios/gramo
AGB10		<i>B. pseudobassiana</i> 10^{10} conidios/gramo
EFC		No
AGT	Tubo de 2,7 cm de diámetro + fieltro fino (1,5 mm)	Talco
EFC		<i>B. pseudobassiana</i> 10^9 conidios/gramo
AGB9		<i>B. pseudobassiana</i> 10^{10} conidios/gramo

Tabla 5. Relación de tratamientos aplicados para determinar la dosis de *Beauveria pseudobassiana*.

25 Para comprobar que la cepa EABpb de *B. pseudobassiana* no había perdido virulencia durante los ensayos, se llevaron a cabo otros dos tratamientos, fuera del diseño factorial, utilizando el mismo sistema de inoculación que estos autores:

- Inmersión *B. pseudobassiana* 10⁹ conidios/gramo (IB9): inoculación de los individuos por inmersión en formulación de *B. pseudobassiana* 10⁹ conidios/gramo en talco.
- Inmersión *B. pseudobassiana* 10¹⁰ (IB10): inoculación de los individuos por inmersión en una formulación de *B. pseudobassiana* de 10¹⁰ conidios/gramo.

Los tratamientos por autoinoculación se aplicaron haciendo pasar a cada individuo de *M. galloprovincialis* a través del dispositivo de autoinfección. Los individuos fueron pesados antes y después del tratamiento para cuantificar la cantidad de inóculo adquirido durante el tratamiento. Por cada tratamiento se utilizaron 20 repeticiones (insectos).

Todo el protocolo de inoculación se realizó en la cámara de flujo laminar, que fue desinfectada con alcohol tras cada tratamiento. Una vez tratados, los insectos fueron mantenidos individualmente en botes de vidrio de un litro junto con ramillas frescas de pino silvestre hasta el final del ensayo. Los insectos se inspeccionaron diariamente durante 21 días. En cada inspección se determinó si los insectos estaban vivos, vitales y muertos. En el contexto de la presente invención. El término vitales quiere decir que los insectos están vivos pero sin vitalidad, es decir, con parcial o totalmente inmovilizados, incapaces de desplazamiento efectivo.

Los individuos que transitaron por los dispositivos de autoinfección ensayados recogieron dosis de inóculo (o talco en los controles) que fueron significativamente diferentes tal y como se muestra en la Tabla 6. Se observa que el dispositivo ancho (AG) fue el que menor cantidad de inóculo aportó (1,58-1,85 mg/insecto, 0,59-0,62% del peso), comparado con el Estrecho (EF) (2,02-2,70 mg/insecto, 0,88-0,93%). El tratamiento por inmersión (IB) aportó lógicamente la mayor cantidad de inóculo.

Tratamiento	Dosis media (mg/insecto)	Dosis/peso (%)
AGT	1,58 a	0,59
AGB9	1,85 a	0,62
AGB10	1,61 a	0,55
EFT	2,02 b	0,88
EFB9	2,69 b	0,93
EFB10	2,70 b	0,81
IB9	5,94	1,95
IB10	6,30	2,46

Tabla 6. Dosis de inóculo recogidas por los individuos de *M. galloprovincialis* al recorrer el dispositivo de autoinfección. Medias seguidas de la misma letra no son diferentes significativamente, $p < 0.05$).

5

Los tratamientos por inmersión (*B. pseudobassiana* a 10^9 y a 10^{10} conidios/gramo) confirmaron la virulencia de la cepa, con un tiempo de supervivencia promedio de $6,75 \pm 0,41$ y $4,65 \pm 0,39$ días, respectivamente, similares al obtenido por Alvarez-Baz et al. (2015) con una concentración de $4,25 \cdot 10^9$ conidios/gramo (4,8 días).

10

Todos los tratamientos con *B. pseudobassiana* causaron la mortalidad completa de los insectos tratados, mientras que la mortalidad de los controles fue sólo la mitad y su tiempo de supervivencia fue significativamente mayor tal y como se recoge en la tabla 7. Hubo diferencias significativas en el tiempo medio de supervivencia de los individuos entre los tratamientos. Los insectos que se autoinfectaron con la dosis de *B. pseudobassiana* de 10^{10} conidios/gramo sobrevivieron significativamente menos tiempo que los infectados con la dosis de 10^9 conidios/gramo y no hubo diferencias entre el dispositivo ancho (AG) o estrecho (EF) en esta dosis.

20

Los insectos infectados por la dosis baja de *Beauveria* a través del dispositivo estrecho sobrevivieron significadamente menos tiempo que los infectados por esta dosis en el dispositivo ancho.

Tratamiento	Mortalidad (%)		Análisis de supervivencia de Kaplan-Meier			
			TPS (media \pm SE)	Intervalo de confianza (95%)		
				Inferior	Superior	
AGC	50	a	15,80 \pm 1,719	a	12,432	19,168
AGT	60	a	16,55 \pm 1,301	a	13,999	19,101
AGB9	100	b	12,15 \pm 0,871	b	10,442	13,858
AGB10	100	b	6,65 \pm 0,412	c	5,842	7,458
EFC	50	a	16,35 \pm 1,469	a	13,471	19,229
EFT	45	a	17,50 \pm 1,048	a	15,447	19,553
EFB9	100	b	8,85 \pm 0,689	d	7,499	10,201
EFB10	100	b	5,75 \pm 0,347	c	5,070	6,430

Tabla 7. Mortalidad y Tiempo Promedio de Supervivencia (TPS) para cada tratamiento de autoinfección con *B. pseudobassiana*. Medias con la misma letra no son significativamente diferentes entre sí, ($P < 0,05$).

25

Las técnicas de autodiseminación se fundamentan en la transmisión horizontal y/o vertical de los individuos autoinfectados. Para ello se requiere no sólo que los

individuos sobrevivan durante unos días, sino que también deben estar los suficientemente vitales para desplazarse, aparearse y realizar la puesta en el caso de las hembras. Por tanto, se analizó el tiempo en el que los individuos tratados se encontraron lo suficientemente vitales como para realizar estos comportamientos (Véase tabla 8).

Los resultados ofrecieron las mismas diferencias que el análisis de supervivencia, si bien los tiempos medios de vitalidad fueron inferiores. Los individuos tratados con la dosis mayor de *B. pseudobassiana* estuvieron 2,7 (EF) o 3,1 (EG) días vitales, un tiempo que podría considerarse insuficiente para la autodiseminación. Por otro lado, los tratamientos con la dosis menor lograron TPV de 4,8 (EF) o 6,8 (AG) días, más acorde con los objetivos.

Tratamiento	Análisis de vitalidad (modificado de TPS Kaplan-Meier)		
	TPV (media \pm SE)	Intervalo de confianza (95%)	
		Inferior	Superior
AGC	15,05 \pm 1,776 a	11,569	18,531
AGT	15,30 \pm 1,338 a	12,677	17,923
AGB9	6,80 \pm 0,462 b	5,894	7,706
AGB10	3,15 \pm 0,233 c	2,694	3,606
EFC	15,50 \pm 1,538 a	12,136	18,164
EFT	17,05 \pm 1,233 a	14,634	19,466
EFB9	4,85 \pm 0,350 d	4,164	5,536
EFB10	2,70 \pm 0,231 c	2,248	3,152

Tabla 8. Tiempo medio en el que los individuos tratados se muestran vitales (realizan movimientos con todos los artejos). 1 TPV: Tiempo Promedio de Vitalidad limitado a 21 días. Los datos en misma columna con misma letra no son significativamente diferentes ($\alpha = 0.05$).

En la Figura 9 se relaciona la dosis de conidios por unidad de peso recibida por los individuos con el tiempo que permanecieron vitales, con capacidad de realizar un comportamiento normal, que permitiese la autodiseminación del entomopatógeno. Se observa una disminución exponencial del número de días vitales al aumentar la dosis recibida, hasta valores de $5 \cdot 10^4$ conidios/miligramo de peso de los individuos. Incrementos de esta dosis no supusieron reducciones apreciables del tiempo medio de vitalidad.

Ejemplo 7: Experimento del funcionamiento en el campo de un prototipo del dispositivo objeto de la invención.

En este último experimento, se ha analizado la capacidad del organismo entomopatógeno para producir la transmisión vertical, hacia la siguiente generación.

- 5 Como se puede ver en la figura 10, se instalaron 6 grupos de 4 trozas de pino (2 m de longitud, 10-15 cm de diámetro), colonizables por *M. galloprovincialis*, alrededor de un prototipo del dispositivo de autoinfección tal y como se describe en el ejemplo 1, y que estaba inoculado con una formulación en talco de conidios de la cepa EABpb a con una concentración de 10^{10} conidios/gramo, a la cual se le había añadido un colorante
- 10 rojo para poder distinguir entre los adultos de *M. galloprovincialis* que habían sido autoinfectados en los dispositivos insectos rojos, por el colorante, que salen inoculados del dispositivo y otros adultos no inoculados que llegasen a ellas directamente que son insectos negros, al no tener colorante.
- 15 Las trozas fueron colonizadas de forma natural, algunos de los adultos que se habían autoinfectado previamente en el dispositivo, pudieron inocular las trozas posteriormente.

En total se instalaron 5 bloques con el tratamiento de la cepa EABpb *B. pseudobassiana* y 5 bloques control.

20

Estas trozas fueron colonizadas durante el verano tanto por los adultos de *M. galloprovincialis* que habían sido autoinfectados, de color, como por otros adultos no inoculados que llegasen a ellas directamente, y que eran de color negro.

25

Las trozas se retiraron y la población larvaria se dejó evolucionar hasta la emergencia de los adultos al año siguiente, cuando se descortezaron y se evaluaron las galerías larvarias.

30 Los resultados mostraron que, comparando con las trozas control, se produjo una reducción significativa de la progenie de nuevos adultos en las trozas tratadas de hasta el 50%, así como una significativa menor supervivencia de la progenie larvaria en todas sus fases, entre la puesta y la realización de galerías de pupación y durante la fase de pupación y formación del adulto

35

Se redujo un 53% en el número de insectos emergidos de las trozas correspondientes a los tratamientos (354), frente a los controles (666).

REIVINDICACIONES

1. Un dispositivo de autoinoculación (1) para insectos del género *Monochamus* que comprende:
- 5 - al menos un difusor (2) que comprende al menos una composición atrayente de insectos del género *Monochamus*;
- una pieza colectora (3) que comprende una abertura superior de entrada (3.1), y tiene en su base (3.2) una malla de fondo con una luz de malla comprendida entre 4,5 mm y 8,5 mm;
- 10 - un conducto de salida (4) al exterior que se une a la pared lateral de la pieza colectora (3) a una altura comprendida entre 1,5 cm y 4 cm, con respecto a la base (3.2) de la pieza colectora (3), donde un primer extremo (4.1) del conducto de salida (4) está unido a la pared lateral de la pieza colectora (3) y un segundo extremo (4.2) de la conducto de salida (4) está
- 15 en contacto con el exterior y donde el conducto de salida (4) comprende en su cara interna un material rugoso impregnado de un agente entomopatógeno de insectos del género *Monochamus*, de tal forma que cuando un insecto entra por la abertura superior de entrada (3.1) atraído por la composición atrayente y sale a través del conducto de salida (4), se
- 20 impregna del agente entomopatógeno por rozamiento.
2. El dispositivo de acuerdo con la reivindicación 1, donde la composición atrayente comprende:
- a. la feromona 2-undeciloxi-1-etanol, y
- b. al menos dos cairomonas atractivas para insectos del género
- 25 *Monochamus* o al menos un volátil de humo con respuesta antenal por insectos del género *Monochamus*.
3. El dispositivo de acuerdo con la reivindicación 2, donde la feromona 2-undeciloxi-1-etanol se encuentra en una cantidad comprendida entre 10 y 1000 mg.
- 30
4. El dispositivo de acuerdo con la reivindicación 2 o 3, donde las al menos dos cairomonas atractivas para insectos del género *Monochamus* se selecciona del grupo que consiste en cairomona del árbol hospedante, cairomona de escolítidos y combinación de las anteriores.
- 35

5. El dispositivo de acuerdo con la reivindicación 4, donde al menos una de las al menos dos cairomonas atractivas para insectos del género *Monochamus* es una cairomona del árbol hospedante y está comprendida entre 1 g y 400 g.
- 5 6. El dispositivo de acuerdo con la reivindicación 4 o 5, donde al menos una de las al menos dos carimonas atractivas para insectos del género *Monochamus* es una cairomona de escolítidos y está comprendida entre 10 mg y 20 g.
7. El dispositivo de acuerdo con la reivindicación 2 o 3, donde el al menos un volátil
10 de humo con respuesta antenal por insectos del género *Monochamus* se selecciona del grupo que consiste en 2-Metoxifenol (S1), eugenol (S3)) y una combinación de los anteriores.
8. El dispositivo de acuerdo con la reivindicación 1 a 7, donde el dispositivo (1)
15 comprende una pieza de acoplamiento (5) que une la pieza colectora (3) con el primer extremo (4.1) del conducto de salida (4).
9. El dispositivo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde el agente entomopatógeno es la cepa EABpb de *Beauveria pseudobassiana*.
- 20 10. El dispositivo de acuerdo con la reivindicación 9, donde el material rugoso está impregnado de una formulación en talco de la cepa EABpb de *Beauveria pseudobassiana* con una concentración comprendida entre 10^9 y 10^{10} conidios/gramo.
- 25 11. El dispositivo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, donde el conducto de salida (4) tiene una longitud comprendida entre 6 cm y 14 cm.
12. El dispositivo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, donde
30 el conducto de salida (4) tiene forma tubular.
13. El dispositivo de acuerdo con la reivindicación 12, donde el conducto de salida (4) tiene un diámetro comprendido entre 2 cm y 5 cm.

14. El dispositivo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, donde el material rugoso tiene un grosor que está comprendido entre 1,5 mm y 4 mm.
- 5 15. El dispositivo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, donde el material rugoso es un textil no tejido con una textura superficial rugosa.
- 10 16. Uso de un dispositivo definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 para la autoinoculación de insectos del género *Monochamus* con un agente entomopatógeno.
- 15 17. Uso de un dispositivo de acuerdo con la reivindicación 16, donde los insectos son de las especies *Monochamus sutor* y/o *Monochamus galloprovincialis*.
18. Uso de un dispositivo de acuerdo con la reivindicación 16 o 17, donde el agente entomopatógeno es la cepa EABpb de *Beauveria pseudobassiana*.
19. Uso de un dispositivo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18, para el tratamiento de la Enfermedad del Marchitamiento del Pino.

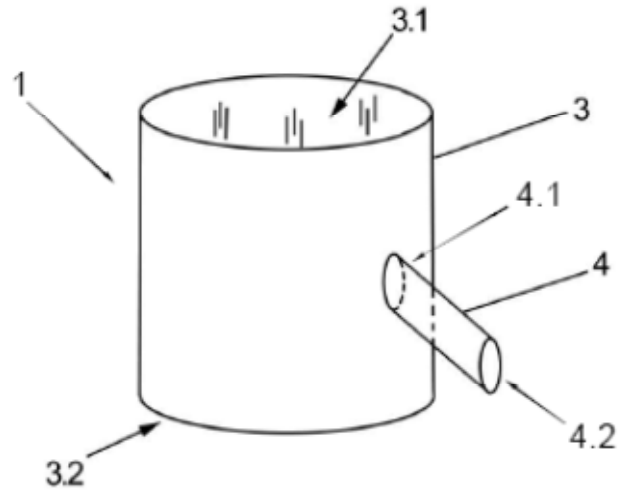


FIG.1A

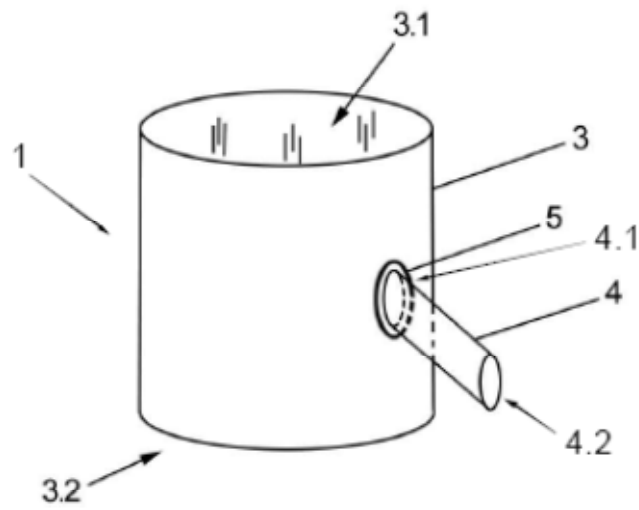


FIG.1B

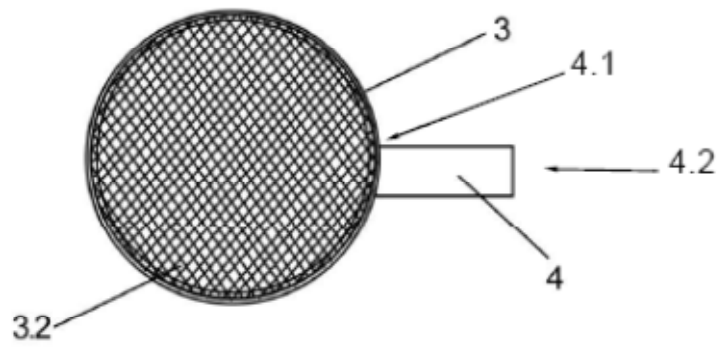


FIG.2



FIG. 3



FIG. 4. C.



FIG. 4. B.



FIG. 4. A.

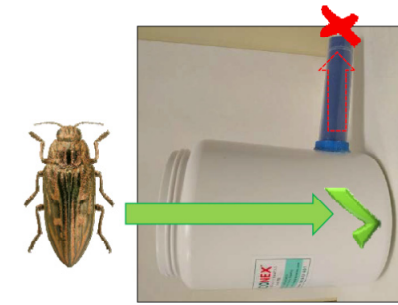


FIG. 5. C.

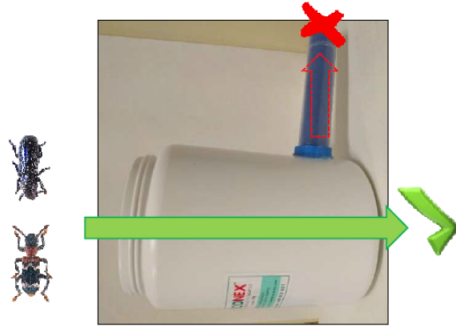


FIG. 5. B.

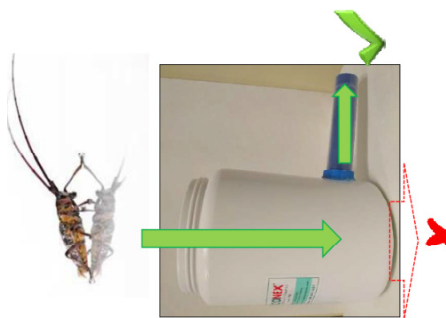


FIG. 5. A.

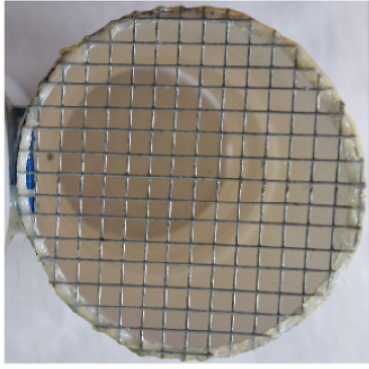


FIG. 6. C.

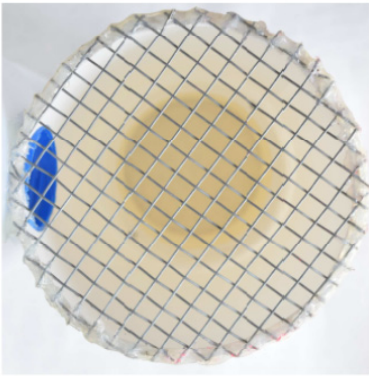


FIG. 6. B.



FIG. 6. A.

(A)

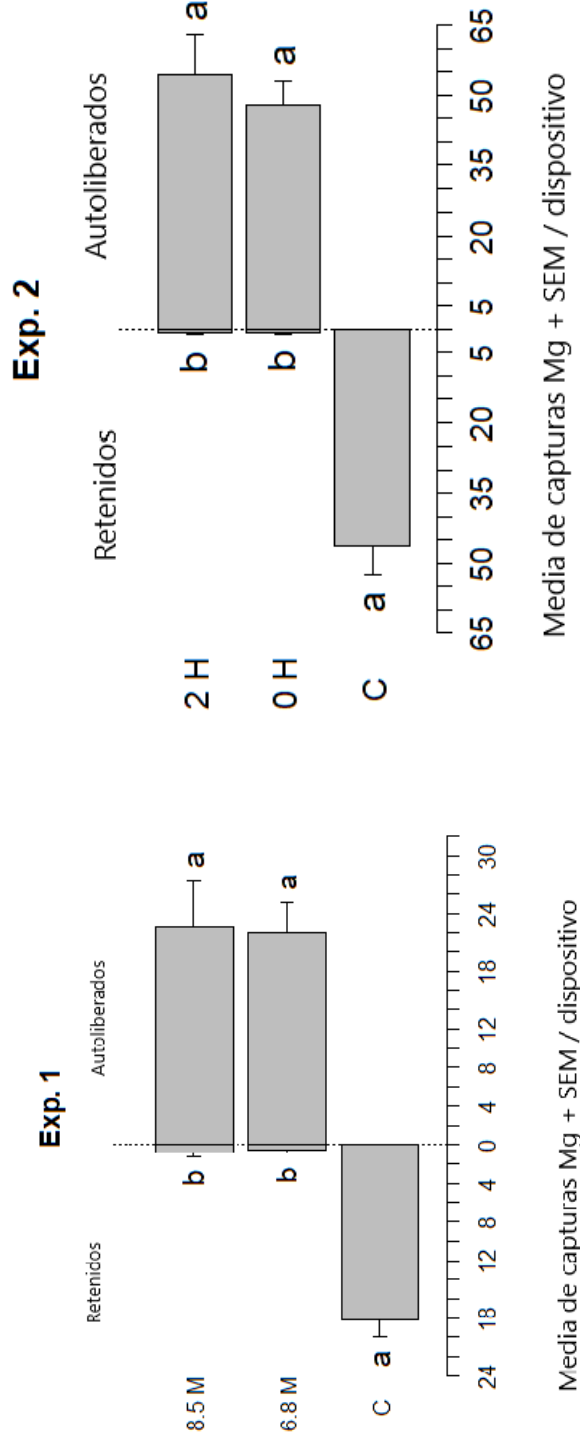


FIG. 7

(B)

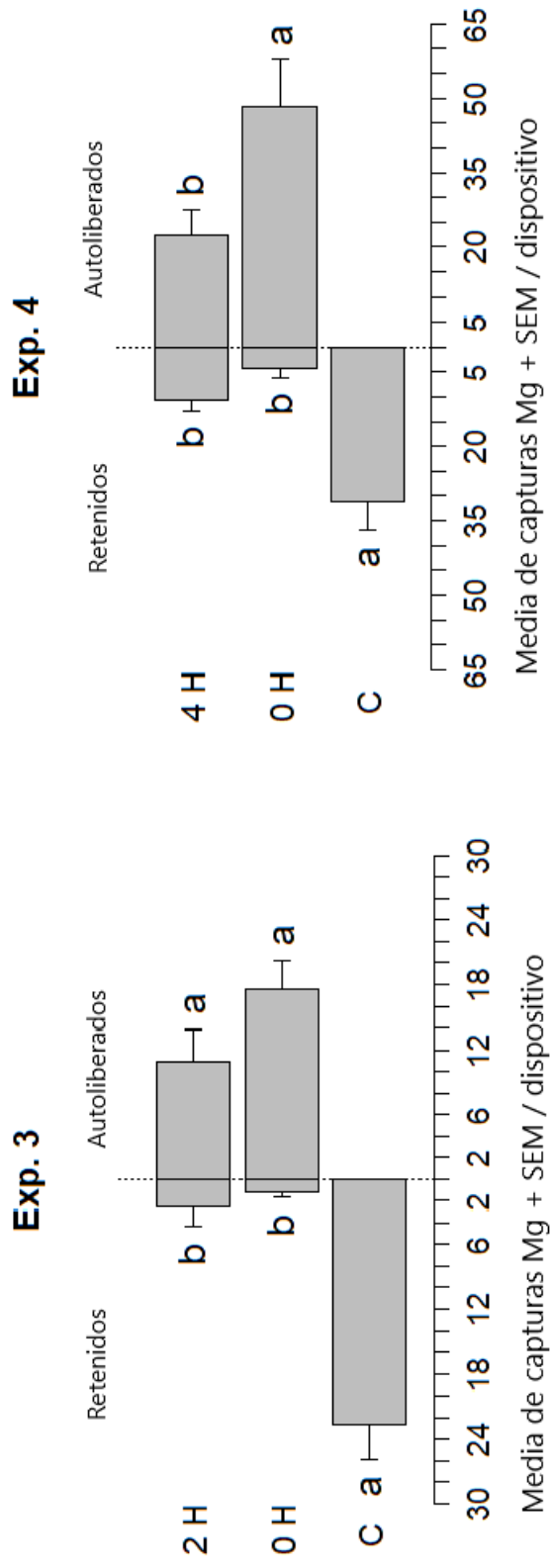


FIG. 7 (cont.)

(C)

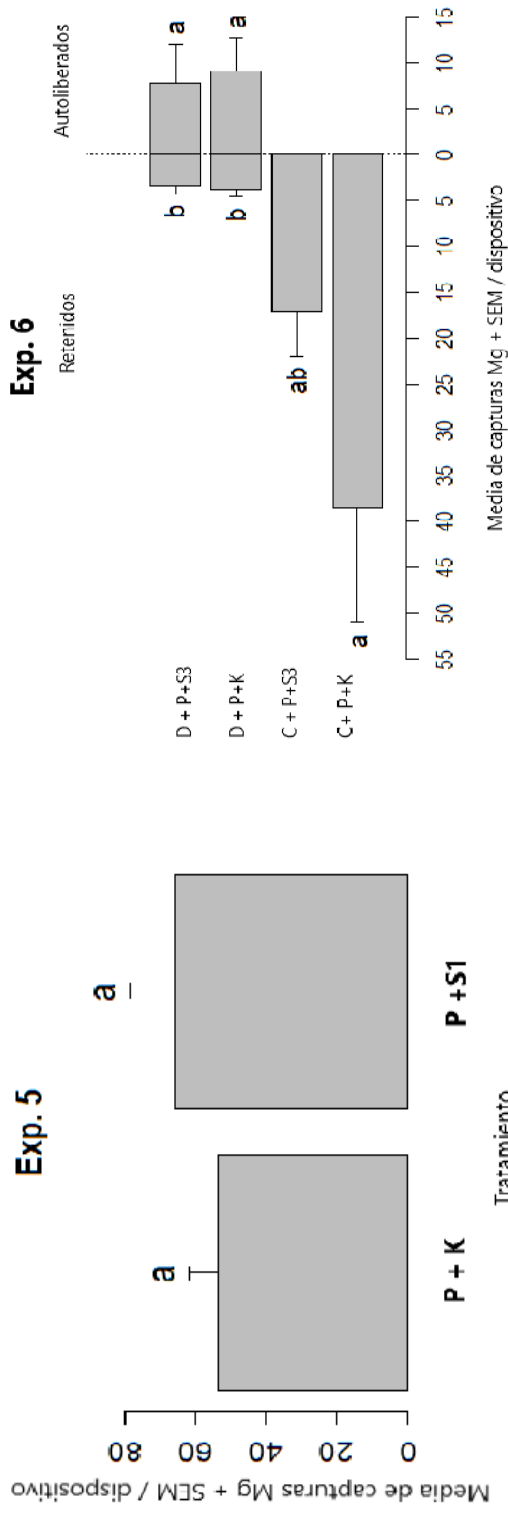


FIG. 7 (cont.)

(D)

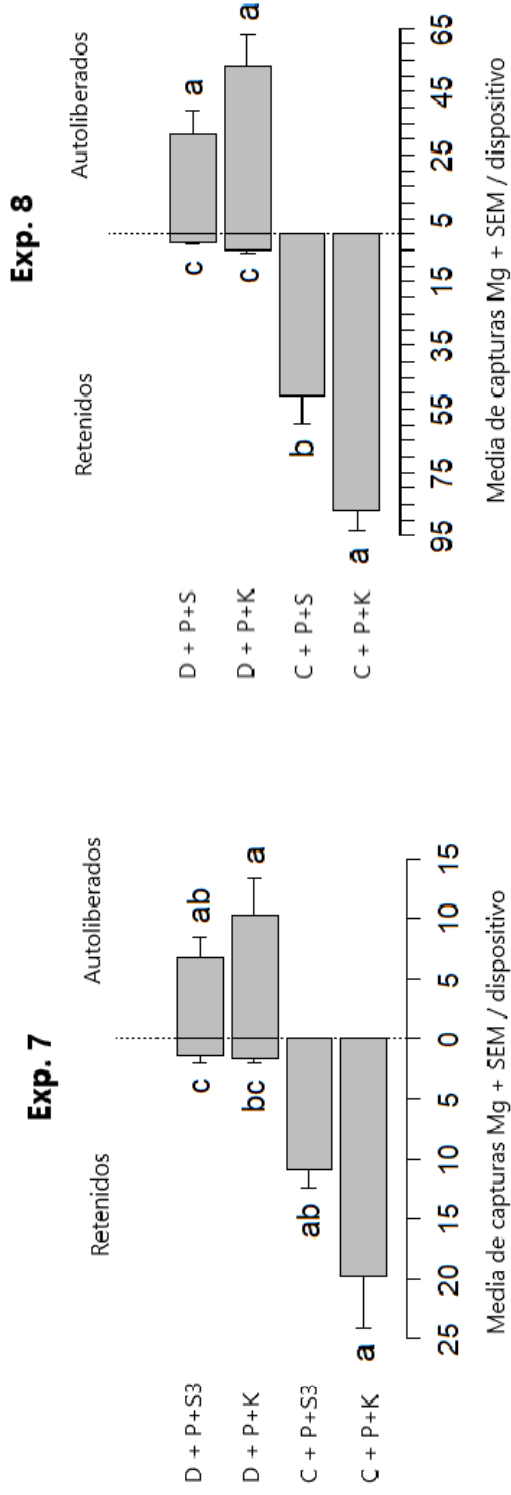


FIG. 7 (cont.)

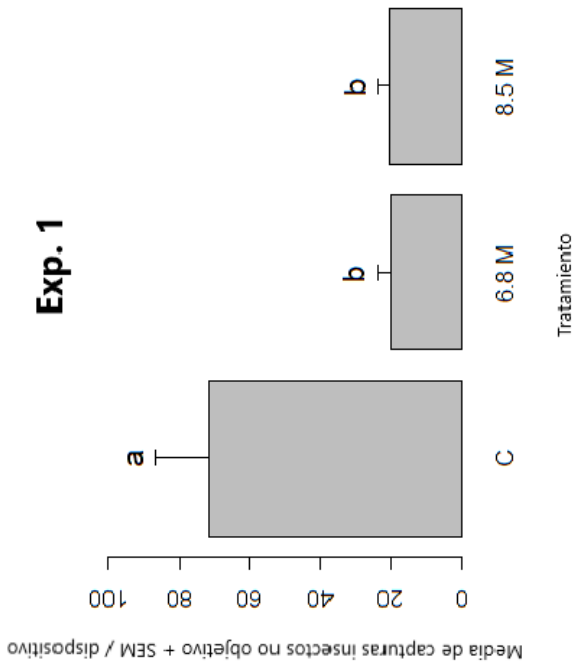
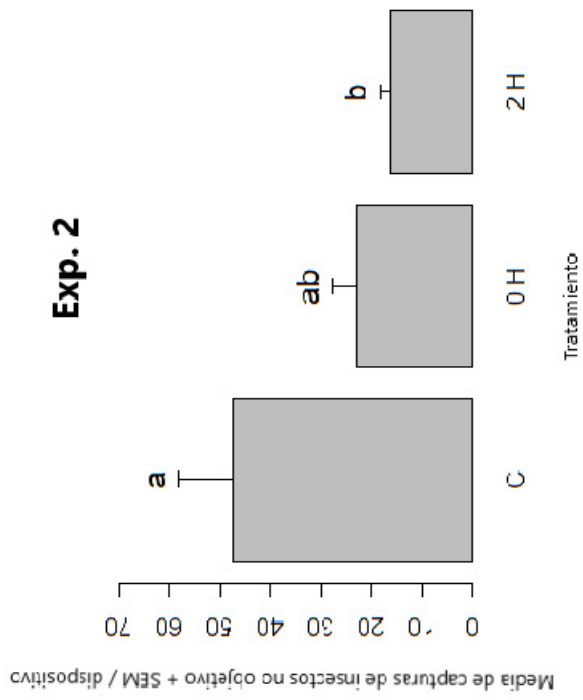


FIG. 8

(A)

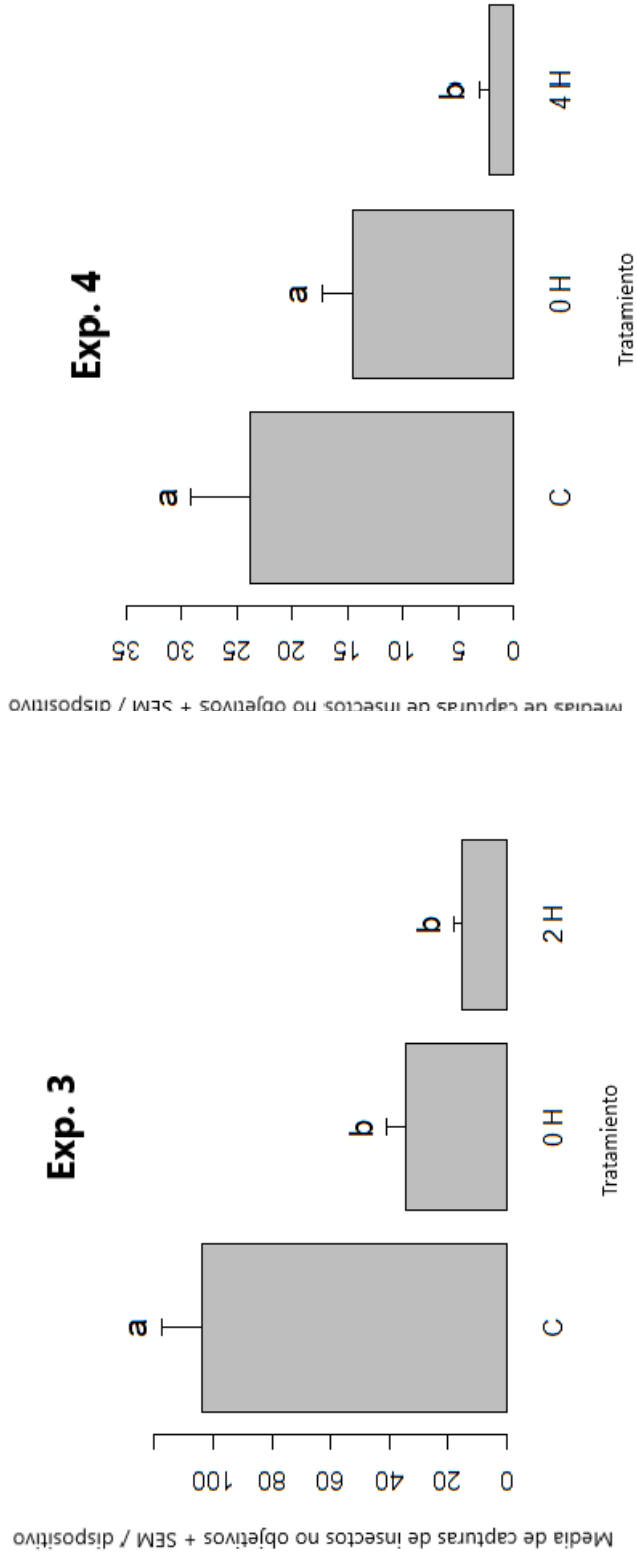


FIG. 8 (cont.)

(B)

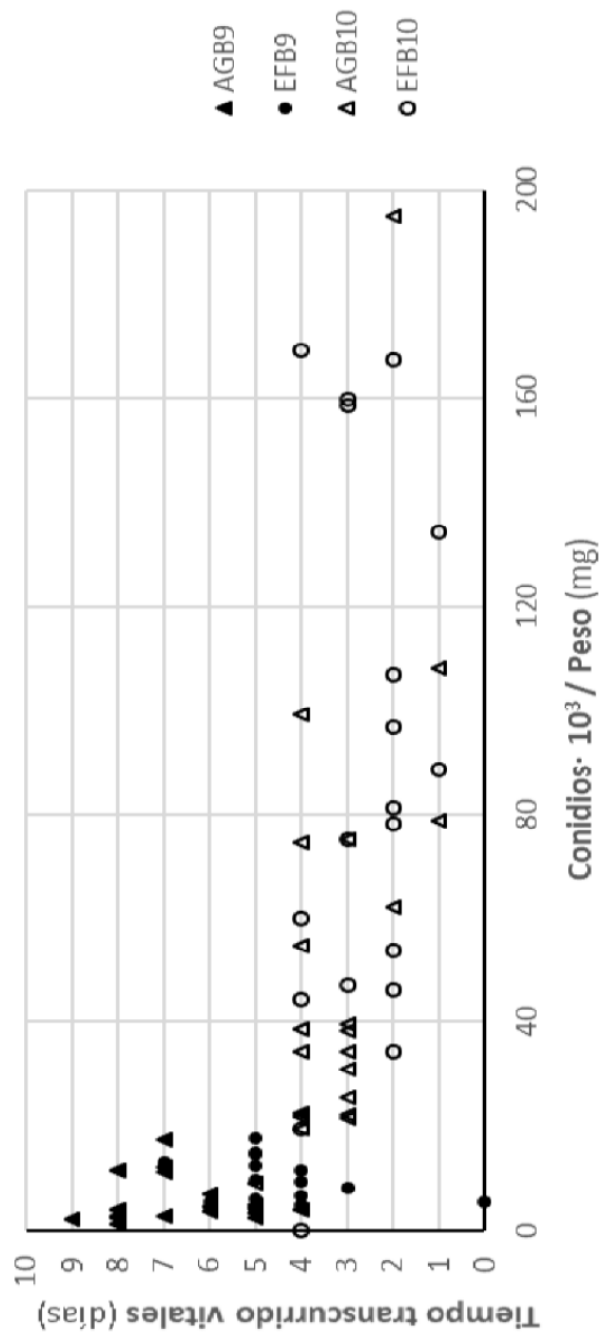


FIG. 9

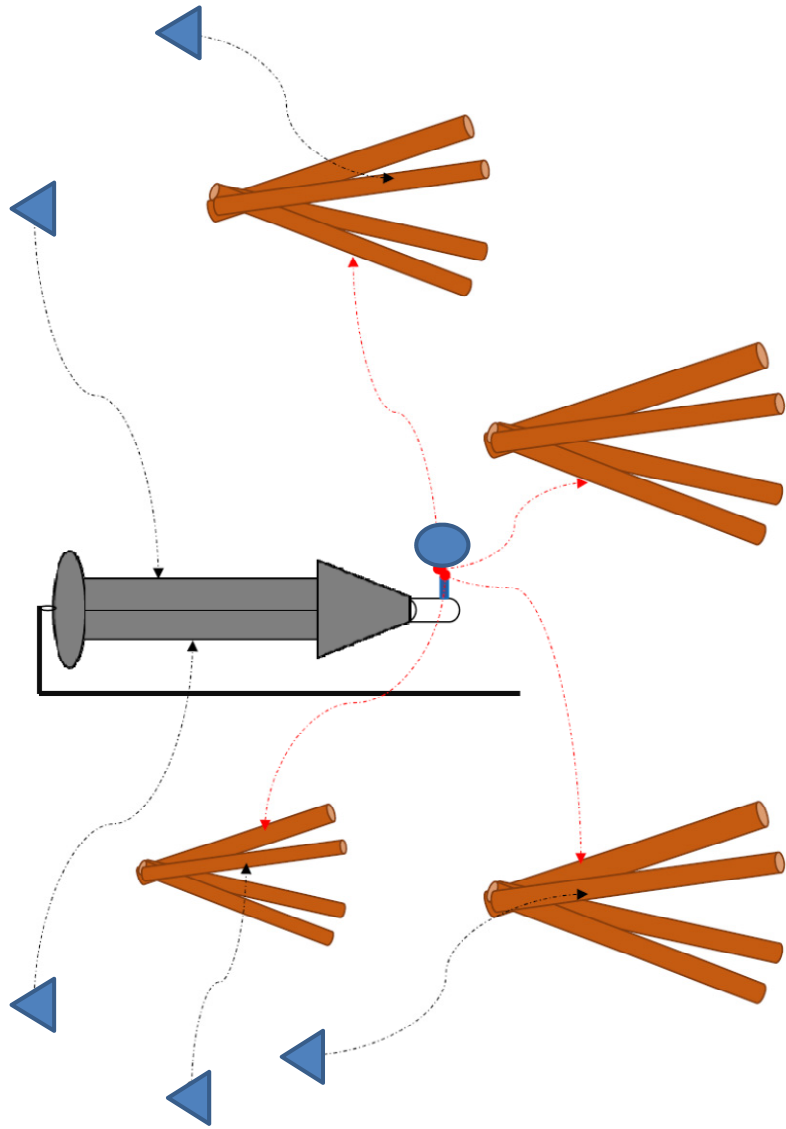


FIG. 10



- ②① N.º solicitud: 202130842
②② Fecha de presentación de la solicitud: 09.09.2021
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	SACRISTÁN VELASCO, A., FERNANDEZ BRAVO, M., QUESADA MORAGAS, E., & PAJARES ALONSO, J.A. Control biológico del vector del nematodo de la madera del pino <i>Monochamus galloprovincialis</i> Olivier mediante autoinfección con el hongo entomopatógeno <i>Beauveria pseudobassiana</i> S.A. Rehner & Humber. Cuadernos De La Sociedad Española De Ciencias Forestales, 2018, Vol. 44, N° 2, Páginas 147-168 Recuperado de Internet <URL: https://doi.org/10.31167/csefv5i44.19491 >. experimento 3, figura 2	1-19
Y	ES 2334763 A1 (UNIV VALLADOLID) 15/03/2010, reivindicaciones	1-19
A	EP 3143874 A1 (FYTOFARM SPOL S R O) 22/03/2017, reivindicaciones	1-19

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
29.07.2022

Examinador
I. Rueda Molíns

Página
1/2

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A01N63/30 (2020.01)

A01N25/12 (2006.01)

A01P7/04 (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