



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 339 339**

51 Int. Cl.:
A01K 67/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02758262 .6**

96 Fecha de presentación : **21.06.2002**

97 Número de publicación de la solicitud: **1399015**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **24.03.2004**

54 Título: **Perlas o cápsulas de hidrogel como medios artificiales para la oviposición de insectos y la cría de endoparasitoides.**

30 Prioridad: **22.06.2001 EP 01870134**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
19.05.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
19.05.2010

73 Titular/es: **Université Catholique De Louvain
place de l'Université 1
1348 Louvain-La-Neuve, BE**

72 Inventor/es: **Hance, Thierry;
Debatty-Mestdagh, Michèle;
Cambier, Vincent;
Boegen, Catherine;
Muratori, Frédéric;
Lebbe, Olivier y
Dos Santos Goncalves, Ana-Maria**

74 Agente: **Arias Sanz, Juan**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Perlas o cápsulas de hidrogel como medios artificiales para la oviposición de insectos y la cría de endoparasitoides.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al campo del control de plagas de insectos usando agentes de biocontrol. La invención se refiere al uso de perlas (alginato, carragenanos, quitosano) o cápsulas de polímero para criar endoparasitoides de insectos *in vitro*.

10 **Antecedentes de la invención**

El principal método para combatir plagas, tal como áfidos, en todo el mundo es el de tratar el cultivo infestado con insecticidas. Sin embargo, hay inconvenientes para este método tales como contaminación ambiental, nocividad para seres humanos y animales, resistencia aumentada en plagas clave, creación de brotes de plagas secundarias, eliminación efectiva de insectos beneficiosos, etcétera. En la actualidad, hay un creciente interés en reducir el uso de pesticidas.

Una alternativa a los pesticidas químicos es el uso de agentes de biocontrol tales como depredadores y parasitoides para combatir plagas de insectos. No obstante, millones de estos insectos beneficiosos, los denominados agentes de biocontrol, se requieren para usar este método en los campos. En la actualidad, para la producción en masa, todavía es necesario criar estos insectos en sus huéspedes naturales, por ejemplo áfidos de cereales. Este método clásico es demasiado caro para permitir el uso a gran escala de insectos beneficiosos en la agricultura comercial. Una solución parece ser el desarrollo de medios artificiales para criar estos insectos beneficiosos. En efecto, este método permitirá reducir el coste de la producción en masa. Desde hace muchos años, los investigadores desarrollan métodos para producir los insectos beneficiosos (depredadores y parasitoides) en medios artificiales. Simmonds (1966) intentó cultivar tres icneumonidos ectoparásitos de pupa de polilla de codificación en gelatina nutritiva inclinada y carne cruda de ternera. Yazgan (1972) y House (1978) usaron un enfoque dietético para preparar medios utilizando el conocimiento existente de los requisitos nutricionales de los insectos en general, para criar satisfactoriamente el himenóptero parásito, *Itoplectis conquisitor* (Say) en dieta químicamente definida, sintética. House (1978) encapsuló una dieta sintética dentro de una cápsula Parafilm RTM y creó un huésped artificial que también sirvió adecuadamente para la oviposición y cría de *I. conquisitor*. Hoffman e Ignoffo (1974) y Hoffman *et al.* (1975) desarrollaron medios que permitieron al menos un éxito parcial en la cría del endoparasitoide de pupas, *Pteromalus puparum* (L.) y el parasitoide de huevos *Trichogramma pretiosum* (Riley), respectivamente.

Grenier *et al.* (1994) presentaron una revisión de más de medio siglo de investigación en el desarrollo de medios artificiales para entomófagos, y notificó éxitos en la producción de medios para ectoparasitoides y depredadores pero no para endoparasitoides. Curiosamente, ninguno de estos medios artificiales ha encontrado su camino en el uso para la producción comercial de cualquier entomófago, y ninguno de estos medios se ha incorporado en los sistemas de producción aumentativos para estos depredadores.

Con el fin de luchar contra los áfidos, la plaga de insectos más importante en la agricultura de las zonas de clima templado, los endoparasitoides son con frecuencia agentes de control biológico eficaces. No obstante, el número de parasitoides en los cultivos son con frecuencia demasiado bajos para reducir fuertemente las poblaciones de áfidos. Por tanto, son esenciales las liberaciones extensas de estos insectos beneficiosos. Desafortunadamente, en la actualidad no se ha desarrollado ningún medio artificial para criar estos endoparasitoides.

A pesar del esfuerzo considerable, ningún endoparasitoide de larvas himenóptero se ha criado satisfactoriamente desde huevo hasta adulto en medios artificiales. Sin embargo, se ha logrado un éxito parcial con dos endoparasitoides de larvas braconidos, *Microplitis croceipes* (Cresson) y *Cardiochiles nigriceps* (Viereck), y un endoparasitoide de pupas-larvas braconido, *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead). Pennachio *et al.* (1992) han cultivado el endoparasitoide de larvas de *Heliothis virescens* braconido, *Cardiochiles nigriceps*, a partir de huevos tras la formación de la banda germinal hasta la segunda fase en un medio artificial compuesto de un aminoácido, sal, vitamina, y medio que contiene hidratos de carbono complementado con albúmina sérica bovina, lactoalbúmina hidrolizada enzimáticamente, suero bovino fetal, yema de huevo y leche. Sin embargo, las larvas crecieron mucho más lentamente que *in vivo*, sólo el 10% mudó a la segunda fase y no completaron su desarrollo.

Es un objeto de la presente invención proporcionar métodos y huéspedes artificiales para la cría continua de endoparasitoides.

Es también un objeto de la presente invención proporcionar huéspedes artificiales para la oviposición de endoparasitoides.

Es un objeto adicional de la invención proporcionar métodos para producir huéspedes artificiales para endoparasitoides.

Es también un objeto de la invención proporcionar un medio para almacenar huéspedes artificiales que contenga endoparasitoides y aplicarlos fácilmente donde se necesiten para programas de control biológico.

Sumario de la invención

Hasta la presente invención, los huevos y las larvas de los endoparasitoides himenópteros se recogían de huéspedes parasitados previamente, se esterilizaban y se sumergían en la solución nutritiva *in vitro*. No obstante, estas manipu-

5 laciones podrían lesionar los parasitoides, requieren mucho tiempo y no permiten la cría en masa real. La invención proporciona ahora nuevos huéspedes para endoparasitoides.

El uso de perlas o cápsulas de biopolímero como huésped o recipiente para la oviposición hace posible evitar toda manipulación, por ejemplo, mediante el suministro continuo de los nutrientes necesarios introduciendo las perlas o

10 cápsulas (tras la oviposición) en una solución nutritiva y oxigenada que permite la difusión a través de la matriz de polímero sin eliminar los medios en el interior de las perlas. Las perlas o cápsulas que contienen la solución nutritiva pueden producirse en gran cantidad a bajo coste y almacenarse durante mucho tiempo en condiciones estériles sin perder sus propiedades antes de que vayan a usarse para la producción de endoparasitoides.

El uso de perlas o cápsulas de biopolímero como huéspedes o recipiente para la oviposición hace posible evitar todas estas manipulaciones.

Las perlas de biopolímero tales como alginato y quitosano se usan en una variedad de áreas de biotecnología en los procesos de encapsulación. Estas perlas se usan para encapsular diversos materiales tales como enzimas, hormonas,

20 fármacos, adsorbentes, etcétera. Los biomateriales viables que van a encapsularse también pueden ser tejidos, órganos, células vegetales o animales, bacterias, algas, hongos, etcétera. El material debe ser de un tamaño suficientemente pequeño para ser adecuado para la encapsulación mediante el método por goteo de esta invención pero puede variar ampliamente en diámetro desde menos de un micrómetro hasta varios milímetros.

Se realiza en la presente invención usar estas perlas o cápsulas de polímero para criar endoparasitoides de insectos. Estas perlas o cápsulas contendrán una solución nutritiva para estos endoparasitoides y estarán recubiertas con sustancias que potencian la oviposición tales como compuestos epicuticulares del huésped (áfido) u otros compuestos del huésped y/o de extractos de plantas. El parasitoide pondrá un huevo en las perlas o cápsulas con su ovipositor y la larva alimentada por la solución nutritiva se desarrollará en la perla. Las perlas o cápsulas pueden ponerse en un

30 flujo continuo de solución nutritiva esterilizada y oxigenada. De hecho, a medida que las larvas de los parasitoides en desarrollo consuman el nutriente y el oxígeno presentes en la solución nutritiva, puede ser necesario proporcionar de manera continua nuevos nutrientes. Esto es posible debido al uso de biopolímeros hidrófilos que son una matriz que contiene poros que permiten la difusión de grandes moléculas tal como BSA (69 kDa). Al final del desarrollo de las larvas en tercera fase, se retirarán las perlas o cápsulas, preferiblemente de manera automática, de los medios nutritivos y se colocarán en una cámara de temperatura constante con una humedad relativa que oscila desde el 75% hasta saturación. La larva hilará entonces un capullo y tras algunos días, los adultos eclosionarán de las perlas o cápsulas. Los métodos proporcionados por la presente invención pueden reducir considerablemente el tiempo necesario para la cría *in vitro* ya que reducen las necesidades de manipulación manual hasta casi nada, lo que evita el riesgo de dañar al endoparasitoide durante su desarrollo y permite la cría en masa automatizada industrial. Con respecto a la liberación en masa en el campo de la agricultura o en cualquier lugar o momento necesario para el control biológico de plagas de insectos mediante el endoparasitoide, dicho sistema incluso permitirá, por ejemplo, el rociado de una gran cantidad de ninfas encapsuladas colocadas en una solución adecuada tal como una solución fisiológica salina (NaCl, al 0,07% tamponada a un pH que oscila desde 6 hasta 7,5) y el rociado usando un pulverizador clásico como los usados comúnmente por los agricultores. Por tanto, puede representar un sistema ideal para el programa de control biológico en masa desde la producción del endoparasitoide hasta su liberación en masa donde sea necesario.

El medio nutritivo con el fin de criar endoparasitoides, es una solución nutritiva que comprende sacarosa, aminoácidos, vitaminas, sales minerales y esteroides encapsulados en una perla o cápsula de biopolímero esférica. Preferiblemente, dicha solución nutritiva líquida comprende al menos uno de los siguientes compuestos esenciales: trehalosa (la

50 concentración puede oscilar desde al menos 10 mg hasta 1 g/100 ml), colesterol (que oscila desde al menos 10 hasta 100 mg/100 ml) u otros esteroides, FBS (suero bovino fetal, al menos del 1 al 20% v/v) y vitamina C. El pH de los medios puede oscilar entre 6 y 7,5. El polímero usado puede ser un alginato, un carragenano o un quitosano (y mezcla de dos polímeros). También pueden usarse otros biopolímeros hidrófilos.

El medio puede encapsularse durante la preparación de las perlas o cápsulas y/o puede introducirse por difusión sumergiendo las perlas o cápsulas en la solución nutritiva tras su fabricación.

La misma solución nutritiva también puede usarse para introducirlo en las perlas y las cápsulas. Este medio puede oxigenarse y esterilizarse. Por ejemplo, las perlas o cápsulas se colocan en un dispositivo que parece un fermentador,

60 alimentado mediante un flujo de medio oxigenado y esterilizado.

Descripción detallada de la invención

Según una primera realización, la presente invención se refiere al uso de una perla o cápsula de polímero o hidrogel como huésped para un endoparasitoide.

65

Los términos “polímero” o “hidrogel” tal como se usan en el presente documento son intercambiables y simplemente se refieren al método de fabricación en el que un hidrogel es un gel preparado en un disolvente acuoso mientras

ES 2 339 339 T3

que un polímero es una molécula grande que generalmente se forma a partir de unidades más pequeñas o monómeros. Se prefieren las perlas o cápsulas de biopolímero.

5 El término “endoparasitoide” se refiere a un insecto y especialmente una avispa que completa su desarrollo larvario dentro del cuerpo de otro insecto matándolo finalmente y que como adulto es de vida libre.

Según una realización adicional, la invención se refiere al uso de perlas o cápsulas de polímero para la cría *in vitro* de endoparasitoides en el que dichas perlas o cápsulas se usan para la oviposición.

10 El término “oviposición” se refiere a la puesta de huevos por medio de un ovipositor, por ejemplo por insectos. El término “ovipositor” se refiere a un órgano o conjunto de órganos al final del abdomen, por el/los cual(es) se deposita(n) los huevos. Según la presente invención, el endoparasitoide depositará uno o varios huevos en la perla o cápsula de polímero.

15 El término “cápsula” se refiere a una perla hueca compuesta de una combinación de componentes, caracterizada además porque durante la fabricación de dichas cápsulas, se ha añadido un espesante, preferiblemente dextrano o carragenanos lambda, a la solución salina.

20 Las perlas o cápsulas de polímero pueden estar compuestas de alginato, carragenanos o quitosano. Estos biopolímeros también se eligen porque son productos naturales, no tóxicos que son completamente biodegradables y seguros para el medio ambiente.

Varios ejemplos de perlas o cápsulas de polímero, compuestas de uno de dichos componentes o compuestas de mezclas de al menos dos de dichos componentes se describen en las secciones de ejemplos.

25 En la técnica anterior, se han descrito varios métodos para preparar perlas o cápsulas de polímero. Sin embargo, en la presente invención se describen métodos para la preparación de perlas o cápsulas de polímeros que son especialmente adecuadas para su uso en métodos para la cría de parasitoides de insectos. La preparación de perlas o cápsulas es una modificación de protocolos descritos en la bibliografía (Wrong y Somesh, 1995; Velings, 1997; Somesh *et al.*, 1988). El protocolo básico usado para la preparación de cápsulas de biopolímero se describe en Somesh *et al.* Sin embargo, las cápsulas preparadas usando estas condiciones, no siempre dieron como resultado la deposición de huevos y también la forma de la cápsula fue sumamente variable. Por ejemplo, cuando se usan cápsulas, con el fin de permitir la oviposición, el espesor de la pared variará preferiblemente entre 5 y 100 μm . Éste es un motivo por el que los protocolos de la bibliografía para la preparación de cápsulas tuvieron que modificarse para producir biopolímeros adecuados para su uso en las realizaciones de la presente invención.

Según otra realización, la invención también se refiere, por tanto, a un método para la preparación de cápsulas de biopolímero, porosas e hidrófilas para la cría *in vitro* de endoparasitoides que comprende:

- 40 - agitar una solución de polímero que contiene entre aproximadamente el 0,75 y el 1% (p/v) de quitosano, y
- extruir a través de una aguja una solución iónica que contiene entre el 1,5 y el 3,5% (p/v) de tripolifosfato de pentasodio y entre el 10 y el 40%, preferiblemente entre el 10 y el 30%, entre el 15 y el 25%, de la manera más preferible aproximadamente el 20% de dextrano, generando de esta manera pequeñas gotitas que caen en la solución de polímero, preferiblemente la solución iónica se suministra a una velocidad de 7 ml/min. (o aproximadamente 10 gotitas/min.),
- 45 - retirar las cápsulas de la solución de polímero tras un máximo de 5 minutos o alternativamente tras un período de tiempo necesario para obtener cápsulas con un espesor de pared de entre 10 y 100 micrómetros,
- 50 - tratar las cápsulas en tripolifosfato de pentasodio durante menos de 30 minutos, por ejemplo 25, 20, 15, 10 ó 5 minutos, por ejemplo durante un período de un máximo de 15 minutos.

55 Preferiblemente, el diámetro de la aguja usada en estos métodos es de entre 0,35 y 0,55 mm, más preferiblemente, el diámetro de la aguja es de 0,45 mm.

Con respecto a la preparación de las cápsulas, las modificaciones que se refieren a la concentración de quitosano, la concentración de la solución iónica y la duración de la permanencia en la solución de quitosano que son necesarias para proporcionar las perlas con las características y propiedades requeridas.

65 El tiempo de duración en la solución de quitosano (polímero) es necesario para garantizar la formación del tamaño requerido de las perlas o cápsulas, una formación de esfericidad correcta y una buena capacidad de repetición de las perlas o cápsulas. Para las cápsulas de quitosano, el tiempo en el que las perlas se mantienen en la solución de polímero también determina el espesor de la pared de la cápsula. Si la pared de las cápsulas es demasiado gruesa (más de 100 micrómetros), el endoparasitoide no puede perforarla para poner un huevo, ya que el tamaño de su ovipositor es de aproximadamente 100 micrómetros. Si la pared de la cápsula no es suficientemente gruesa, entonces la cápsula colapsará durante la manipulación. Preferiblemente el tamaño debe ser de entre 5 a 10 y 100 micrómetros, lo más

ES 2 339 339 T3

preferiblemente la pared es de entre 20 y 40 μm , 10 y 50 μm , entre 10 y 60 μm , entre 10 y 80 μm , o entre 30 y 70, o el espesor de la pared es de 25 μm o 35 μm .

5 La concentración de los aniones de polifosfato determinará el número de interacciones (y su resistencia) entre las cadenas del polímero (quitosano) y por tanto, el espesor de la pared.

El espesor de la pared puede medirse usando un microscopio óptico o un microscopio electrónico. El microscopio óptico se registra a través de una cámara en un ordenador, que en función del aumento usado calcula el espesor real. También pueden usarse otras técnicas para medir el espesor de la pared que son bien conocidas por el experto en la técnica, por ejemplo, espectroscopía de RMN.

Además, si el tiempo de maduración (el tiempo en el que las perlas o cápsulas se tratan con tripolifosfato de pentasodio), es demasiado prolongado (por ejemplo, 30 minutos o más) se observan varias capas en la pared de la cápsula, y el espesor de la pared no es homogéneo para toda el área de la cápsula.

Además, se necesita la agitación de las soluciones (por ejemplo, la solución de polímero, en la que la solución iónica se vierte por goteo para preparar las cápsulas o la solución de tripolifosfato de pentasodio vertiéndose por goteo la solución de polímero en el caso de la preparación de perlas) para garantizar una forma homogénea de la cápsula.

15 Son necesarios un % optimizado de quitosano (preferiblemente entre el 1 y el 0,5%, más preferiblemente el 0,75%), un % de tripolifosfato de pentasodio (preferiblemente entre el 1,5 y el 3,5%, más preferiblemente el 2,5 o el 3%), y un pH optimizado (el pH de la solución de polímero obligatorio inferior a 5,5, preferiblemente 3,5, el pH de la solución iónica puede ser de entre 6 y 9, y preferiblemente 7 u 8) para obtener cápsulas estables con una buena esfericidad y elasticidad para permitir la introducción del ovipositor. Si la cápsula es demasiado resistente, el parasitoide no puede poner un huevo en el interior. Estas condiciones también son las mejores para permitir una porosidad y difusión correctas del nutriente en el interior de la cápsula.

Se añade un pigmento amarillo a la cápsula, puede ser Stabiloboss® o cualquier otro pigmento orgánico amarillo tal como luteína. Preferiblemente, las perlas o cápsulas se tiñen mediante difusión añadiendo dicho pigmento a bajas concentraciones, por ejemplo, entre el 1 y el 10%, preferiblemente el 4 o el 5%. Se proporciona un ejemplo del aumento en la capacidad de atracción del pigmento amarillo en la tabla 1. Como tal, la invención también se refiere a perlas o cápsulas de biopolímero que pueden obtenerse mediante cualquiera de los métodos descritos en el presente documento y métodos que proporcionan las perlas o cápsulas con propiedades esenciales para su uso en la cría de endoparasitoides.

35 Como tal, la invención también se refiere a perlas o cápsulas de polímero que pueden obtenerse mediante cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, porque estas perlas o cápsulas tienen ahora las características requeridas que las hacen adecuadas para su uso en la presente invención.

Además, las perlas o cápsulas de polímero preparadas mediante cualquiera de estos métodos pueden llenarse con una solución nutritiva con la que pueden alimentarse las larvas cuando se desarrollan a partir del huevo.

Por tanto, la presente invención se refiere más particularmente a perlas o cápsulas de polímero que comprenden una pared externa compuesta de un polímero, preferiblemente un biopolímero y más preferible fabricado de alginato, carragenanos, quitosano o una mezcla de los mismos. Dicha pared externa puede consistir en una o más capas. La pared externa de la perla o cápsula debe tener un espesor que sea suficiente pero no demasiado grueso para posibilitar que el endoparasitoide introduzca su ovipositor en él. Además, es necesario que la perla o cápsula sea hidrófila y tenga una porosidad, que permita la entrada de una solución nutritiva por difusión.

Otra característica importante de las perlas o cápsulas de polímero para ser adecuadas para los usos descritos en el presente documento, es el diámetro de la perla o cápsula. Preferiblemente el diámetro de las perlas o cápsulas es de aproximadamente el mismo tamaño que su huésped. El diámetro preferible de las perlas o cápsulas oscila entre 1 y 5 mm, más preferiblemente entre 1,5 y 3 mm.

El tamaño de la perla se ve influenciado por el método de preparación. El diámetro de la aguja determina el tamaño de las gotas que caen en la solución y por tanto determina el tamaño de las cápsulas o perlas. Se elige el tamaño para obtener el mejor valor que permita la manipulación de las perlas o cápsulas por el endoparasitoide antes o durante la oviposición (contacto de las antenas, caminar sobre las perlas o cápsulas, la inserción del ovipositor). Es necesaria la posición horizontal (véase la figura 1) para obtener cápsulas o perlas esféricas y una distribución homogénea del tamaño y diámetro entre las cápsulas o perlas producidas.

Además, la velocidad de goteo debe ser lo más alta posible para reducir la duración de tiempo entre el momento en el que la primera gota toca la superficie del líquido (solución de polímero o iónica) y el momento en que la última entra en contacto con el líquido. Esto es importante, para evitar una diferencia demasiado importante de tiempo de permanencia en la solución. Sin embargo, la velocidad de goteo no puede ser demasiado alta para evitar obtener un flujo continuo en lugar de gotas.

ES 2 339 339 T3

La viscosidad de la gota debe ser lo suficientemente alta para conservar una forma esférica durante la caída y en el momento en el que la gota entra en la solución. Si la viscosidad es demasiado baja, entonces la gota choca con la superficie de líquido y se aplana o disgrega en la solución. Si la viscosidad es demasiado alta, el líquido se mueve con dificultad en los tubos y la aguja del dispositivo. La viscosidad se determina por la concentración de dextrano (peso molecular PM). Por tanto, la viscosidad determina la concentración de dextrano usada.

Preferiblemente, en el interior de la perla o cápsula, se presenta una cavidad en la que puede depositarse un huevo, preferiblemente por un endoparasitoide. Debe quedar claro que los huevos o las larvas también pueden depositarse en el interior de estas perlas, por ejemplo mediante microinyección.

Preferiblemente, dicha cavidad interna se llena con una solución nutritiva que permite la incubación de los huevos y el desarrollo de las larvas. Dichas perlas o cápsulas de polímero son extremadamente adecuadas para su uso como huésped para endoparasitoides ya que permiten el paso de oxígeno y gas carbónico pero también de una gran gama de moléculas incluyendo albúmina sérica bovina (69.000 daltons) debido a su naturaleza hidrófila y la matriz porosa que constituyeron mediante polimerización. A medida que la larva del endoparasitoide consume nutrientes durante su desarrollo, las perlas o cápsulas pueden sumergirse en la solución nutritiva, oxigenada constantemente y esterilizada usando un sistema de flujo y un dispositivo similar a un fermentador. Los nutrientes y el oxígeno pueden difundir entonces a través de las paredes de las perlas o cápsulas para alimentar a la larva, sin ninguna manipulación de dicha larva o la retirada o el cambio de la solución nutritiva inicial en la perla o cápsula.

Al preparar las cápsulas o perlas, hay varias posibilidades para introducir los medios nutritivos en su interior. Una primera opción es sumergir las cápsulas o perlas tras la preparación en la solución nutritiva y dejar entrar los nutrientes por difusión. La segunda opción es durante la preparación, por ejemplo de las cápsulas, mezclar la solución nutritiva con el dextrano y el tripolifosfato (solución iónica). Entonces una gotita de ese líquido se vierte por goteo en la solución de quitosano que polimeriza en la superficie de la gotita para producir una cápsula. El tripolifosfato provoca la polimerización, el dextrano se usa para espesar la solución. En esa condición, la solución queda atrapada en el interior de la cápsula durante la polimerización. En la sección de ejemplos se describe un procedimiento de encapsulación de este tipo.

La solución nutritiva preferida contiene sacarosa, trehalosa, aminoácidos, vitaminas, sales minerales y esteroides en condiciones definidas. Los compuestos esenciales que deben estar presentes son: trehalosa (en concentración que oscila desde al menos 10 mg hasta 1 g/100 ml), colesterol (que oscila desde al menos 10 hasta 100 mg/100 ml) u otros esteroides, FBS (suero bovino fetal, desde el 1 hasta el 20% v/v), vitamina C y colina. Las sales minerales son Na_2HPO_4 , MgSO_4 y CaCl_2 . El pH de los medios puede oscilar entre 6 y 7,5. Se describe un ejemplo de una solución de nutrientes de este tipo, por ejemplo para criar larvas de *Aphidius rhopalosiphii*, en la tabla 4.

Con el fin de potenciar la oviposición, las perlas o cápsulas pueden recubrirse con extractos epicuticulares del huésped (tales como hexadecanoato de octadecilo o escualeno u otros compuestos de alcano, alqueno, éster y aldehído, la tabla 6 muestra algunos ejemplos), feromonas del huésped tales como B-farneseno y/o extracto de plantas. La trehalosa debe estar presente en el interior de las perlas o cápsulas (en concentraciones que oscilan desde al menos 10 mg hasta 1 g/100 ml) para aumentar la oviposición. Además, las cápsulas o perlas se tiñen de amarillo preferiblemente usando el marcador Stabilo® como colorante amarillo. Estas perlas o cápsulas teñidas son más estimulantes para el endoparasitoide y son atacadas preferiblemente con respecto a su huésped normal (véase la figura 2, en la que puede observarse que la perla (amarilla) se prefiere con respecto a un áfido real, *Sitobion avenae*) por el endoparasitoide *Aphidius rhopalosiphii*.

En la presente invención se demuestra que una combinación de las cápsulas o perlas de biopolímero tal como se describe y tal como se prepara mediante los métodos modificados, y el color amarillo inducen una verdadera respuesta de oviposición incluyendo la puesta de huevo, y no sólo un ataque de oviposición lo que no significa que un huevo se deposite realmente. En efecto, el endoparasitoide tiene en su ovipositor nervios sensoriales que le permiten explorar y evaluar el huésped antes de poner huevos.

La invención se refiere por tanto al uso de una perla o cápsula de polímero tal como se describió anteriormente como huésped para endoparasitoides. En una realización relacionada, la invención se refiere al uso de dichas perlas de polímero o hidrogel para la cría *in vitro* de endoparasitoides.

Según una realización adicional, la invención se refiere al uso de perlas o cápsulas de polímero para la cría *in vitro* continua o por etapas de endoparasitoides.

Según una realización más específica, la invención se refiere al uso de dicha perla o cápsula de biopolímero que se usa para la oviposición y la cría continua de un endoparasitoide desde el huevo hasta la eclosión del adulto de dicho endoparasitoide.

La expresión “cría continua” o “cría *in vitro* continua” tal como se usa en el presente documento esta marcada por una secuencia de las fases de desarrollo que implican el desarrollo de un endoparasitoide desde la fase de huevo hasta la fase de ninfa encapsulada o eclosión del adulto, sin ninguna manipulación externa. Esto es posible por el uso de las perlas o cápsulas de la invención que permiten que tengan lugar todas estas fases dentro de la propia perla o cápsula, sin ningún manejo ni manipulación manual de las perlas o cápsulas. Opcionalmente se realiza una manipulación

externa, que también es parte de la presente invención, es decir, el almacenamiento de las ninfas encapsuladas a bajas temperaturas y alta humedad para una aplicación posterior.

La expresión “cría por etapas” tal como se usa en el presente documento se refiere al método de cría de endoparasitoides de una manera discontinua, esencialmente criando los endoparasitoides según los mismos métodos de la manera continua pero dejando la posibilidad de recoger los endoparasitoides en cualquier fase (etapa) de desarrollo y manteniéndolos en una fase quiescente durante un período definido de tiempo antes de volver a introducirlos en la siguiente fase de desarrollo. Puesto que las perlas o cápsulas son casi transparentes, puede monitorizarse fácilmente en qué fase de desarrollo está el endoparasitoide en la perla.

Otros momentos o estadios en el desarrollo del endoparasitoide en los que el desarrollo del endoparasitoide puede detenerse son por ejemplo, las fases larvianas 1, es decir justo tras la incubación del huevo, de 4 a 5 días tras la oviposición. En esa fase, el desarrollo de las larvas 1 puede interrumpirse durante varios días (de 2 a 5) colocándolas a 5°C en una solución nutritiva.

La ninfa encapsulada

Según aún otra realización relacionada, la invención se refiere al uso de dichas perlas para la oviposición, preferiblemente para la oviposición de endoparasitoides himenópteros o insectos.

Según una realización preferida, la invención se refiere especialmente al uso de perlas o cápsulas de polímero como huésped para endoparasitoides, perlas o cápsulas que son hidrófilas y porosas, por ejemplo perlas o cápsulas de biopolímero que están compuestas al menos parcialmente de alginato, carragenanos o quitosano, o mezclas de los mismos.

Según una realización más específica, la invención se refiere al uso de perlas de biopolímero que están compuestas esencialmente de alginato en el que dicho alginato es un copolímero de ácido beta-D-manurónico y ácido alfa-L-glucurónico, reticulado con cationes divalentes, tales como iones Ca^{++} .

El término “al menos parcialmente” tal como se usa en el presente documento significa desde aproximadamente el 10% hasta casi el 100%, por ejemplo el 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o 99%.

El término “esencialmente” tal como se usa en el presente documento significa que aproximadamente del 80 al 100% de su composición es alginato.

Según una realización preferida, la invención se refiere al uso de perlas o cápsulas de polímero que también están compuestas esencialmente de quitosano como huésped para el endoparasitoide en el que dicho quitosano es un derivado de quitina (poli-beta-(1-4)-2-amino-2-desoxi-D-glucopiranos) encontrada en un gran número de especies de hongos, crustáceos, insectos y otros artrópodos. Como el quitosano es el principal componente de la cutícula de insectos, por tanto, lo reconoce particularmente bien el endoparasitoide durante la oviposición y es muy adecuado para su desarrollo. La naturaleza porosa de la matriz de polímero también permite al insecto percibir la composición interna de los medios mediante el contacto de las antenas antes de la oviposición.

Las perlas o cápsulas de la presente invención pueden usarse como huésped para la cría *in vitro* de endoparasitoides, preferiblemente endoparasitoides himenópteros que pertenecen al orden de insectos (*Hymenoptera*).

Los endoparasitoides preferidos que se prevé en la presente invención que van a criarse usando huéspedes artificiales tal como se describió anteriormente, se eligen de la lista de endoparasitoides de áfidos presentada en la tabla 5.

No obstante, debe quedar claro que la presente invención no se limita a criar endoparasitoides de áfidos sino que puede usarse para otros endoparasitoides.

Los presentes inventores han mostrado que estímulos adicionales pueden aumentar el éxito de la oviposición por los endoparasitoides.

Por tanto, la invención se refiere además al método para la cría *in vitro* de endoparasitoides que comprende el uso de perlas o cápsulas de polímero tal como se describe o puede obtenerse mediante cualquiera de los métodos dados a conocer en el presente documento para la oviposición, en los que dichos endoparasitoides se colocan en un entorno que comprende trigo y/o sus huéspedes naturales. Según una alternativa adicional, los endoparasitoides se colocan en un entorno que comprende trigo o partes de una planta, u olores de plantas y/o sus huéspedes naturales o los olores de estos huéspedes naturales.

Preferiblemente cuando por ejemplo, van a criarse endoparasitoides himenópteros cuando se usan perlas o cápsulas de polímero, los endoparasitoides se colocan en un entorno que comprende trigo y áfidos de cereales. Según una alternativa adicional los endoparasitoides se colocan en un entorno que comprende trigo y áfidos de cereales o los olores de los áfidos de cereales.

ES 2 339 339 T3

5 Sin embargo, las propias perlas o cápsulas pueden imitar la textura, el olor, el color y otras características o propiedades necesarias para la oviposición. Tal como se ilustra en los ejemplos, el color de la perla o cápsula puede tener una influencia positiva en la oviposición. Por tanto, según una realización preferida, las perlas o cápsulas de polímero para su uso como huésped para la cría de endoparasitoides son amarillas, preferiblemente teñidas de amarillo con Stabiloboss®.

10 Según otra realización, la invención también se refiere al uso de las perlas o cápsulas de polímero tal como se describe en el presente documento en el que dichas perlas o cápsulas se recubren con extracto epicuticular de un huésped y/o extracto de plantas.

10 La presente invención además se refiere a cualquiera de los usos tal como se describen en los que dicho endoparasitoide se elige del grupo de endoparasitoides himenópteros tal como se enumeran en la tabla 5.

15 La invención se refiere además a un método para la cría *in vitro* (por ejemplo, continua) de un endoparasitoide que comprende las etapas de:

- usar una perla o cápsula de biopolímero tal como se describe en el presente documento, conteniendo dicha perla o cápsula una solución nutritiva, y
- 20 - introducir dicha perla o cápsula en una solución nutritiva, esterilizada, oxigenada durante el desarrollo del endoparasitoide.

25 Usando el método anterior, los endoparasitoides pueden criarse de manera continua hasta la fase de desarrollo deseada.

30 La invención se refiere por tanto a un método para la cría, para criar *in vitro* endoparasitoides hasta la fase de ninfas encapsuladas que comprende la etapa de recoger la perla o cápsula cuando el endoparasitoide es una ninfa encapsulada.

30 La invención también se refiere a una perla o cápsula de biopolímero que comprende una ninfa encapsulada de un endoparasitoide que puede obtenerse mediante el método descrito anteriormente.

35 Para permitir su supervivencia y distribución comercial, es importante que estas ninfas se almacenen en una solución. La solución nutritiva es una posibilidad sin embargo, demasiado costosa si sólo se necesita para la distribución porque durante la metamorfosis los parasitoides no necesitarán nutrientes. El agua sola no es suficiente debido a la presión osmótica, las ninfas parasitoides son hipertónicas y por tanto el agua entrará en la perla y la ninfa y provocará daños en las células de los endoparasitoides por el aumento de la presión interna. Por tanto, una manera más favorable es usar una solución isotónica salina (por ejemplo, NaCl al 0,007% tamponada a un pH que oscila desde 6 hasta 7,5) o cualquier otra solución que tenga el mismo efecto sobre la ninfa y que pueda usarse para conservar los tejidos vivos. Por tanto, el producto final puede ser la ninfa encapsulada (ninfas) en una solución salina isotónica. El agricultor sólo necesita pulverizar (por ejemplo, dispersar o rociar) la solución.

45 La liberación de una gran cantidad de parasitoides en el campo, por ejemplo un campo de trigo de varias ha, con el fin de que estos parasitoides puedan distribuirse uniformemente es una tarea muy difícil. La presente invención proporciona una cantidad concentrada de perlas o cápsulas que comprenden las ninfas encapsuladas en una solución conservante que puede diluirse según las necesidades del agricultor o de las máquinas que usa. Por tanto, la presente invención permite sólo rociar (pulverizar) las ninfas encapsuladas como insecticida, usando los sistemas clásicos (pulverizador, difusores) que cada agricultor o productor de plantas (horticultor, jardinero, etc.) tiene en su finca o empresa. Las cápsulas o perlas presentes en la solución se dispersarán uniformemente sobre las plantas en el campo y se secarán sólo porque el aire externo no está saturado en agua. Al secarse, el biopolímero se vuelve pegajoso y permanecerá sobre la planta hasta la eclosión del parasitoide incluso si hay viento o lluvia. En estas condiciones, la supervivencia del parasitoide sobre la planta antes de la eclosión será mejor que sólo sobre el suelo.

55 El término “pulverización” tal como se usa en el presente documento significa pulverizar la solución que contiene las perlas o cápsulas para permitir su dispersión en el campo, similar a un insecticida. También puede usarse un sistema neumático de pulverización o aplicación para lanzar las perlas o las cápsulas que contienen las ninfas.

60 La invención también se refiere a un método para la cría, para criar *in vitro* endoparasitoides hasta la fase de la eclosión del adulto que comprende la etapa de recoger el endoparasitoide cuando eclosiona de la perla o cápsula.

La invención también se refiere a un endoparasitoide que puede obtenerse mediante (por ejemplo, criarse mediante) los métodos descritos en el presente documento.

65 La invención se refiere además al uso de una perla o cápsula de biopolímero o un endoparasitoide obtenido mediante o que puede obtenerse mediante cualquiera de los métodos de la invención para la liberación en masa en el control de plagas.

ES 2 339 339 T3

Según otra realización, la presente invención se refiere a un método para la producción en masa de grandes cantidades de endoparasitoides que comprende la pulverización de perlas o cápsulas de biopolímero que pueden obtenerse mediante los métodos descritos en el presente documento colocando dichas perlas o cápsulas en una solución adecuada y/o la pulverización usando un pulverizador.

Además, la invención proporciona un sistema para la cría de endoparasitoides que comprende:

- usar al menos una perla o cápsula tal como se definió anteriormente o que puede obtenerse mediante cualquiera de los métodos de la invención,
- al menos un endoparasitoide, y
- un entorno adecuado para la oviposición de dicho endoparasitoide en dicha perla o cápsula.

Dicho sistema puede comprender al menos uno de los siguientes:

- usar extractos epicuticulares o feromonas del huésped y/o de extractos de plantas para recubrir dicha perla o cápsula para potenciar la oviposición de dicho endoparasitoide en dicha perla o cápsula,
- usar los olores del huésped o de la planta para mejorar la atracción de los endoparasitoides hacia las perlas o cápsulas,
- una solución nutritiva introducida en el interior de las perlas o cápsulas,
- una solución nutritiva en la que dichas perlas o cápsulas se sumergen tras la oviposición, preferiblemente las soluciones nutritivas dentro y fuera de las perlas o cápsulas son las mismas,
- un dispositivo que permite un flujo continuo de una solución nutritiva, oxigenada y esterilizada al que se añaden las perlas o cápsulas durante el desarrollo del endoparasitoide,
- un dispositivo que permite recoger dichas perlas o cápsulas al final del desarrollo del endoparasitoide (fase de pupa), posiblemente automatizado,
- una cámara de cría a temperatura constante con el fin de permitir la metamorfosis y la eclosión del adulto (por ejemplo, final de la fase larvaria, fase de pupa y adultos muy jóvenes),
- una cámara fría (temperatura que oscila desde -5°C hasta +5°C) con una humedad que oscila entre el 70 y el 100% lo que permite el almacenamiento de las ninfas encapsuladas (por ejemplo, el comienzo de la fase de pupa) en función de la necesidad de producción.

El término “ninfa encapsulada” se refiere a la fase de pupa (la última fase de desarrollo durante la que tiene lugar la metamorfosis) del endoparasitoide encapsulado en el interior de la cápsula o la perla en el que ha hilado un capullo, antes de la eclosión del adulto. La fase de pupa es muy fácil de reconocer visualmente sólo con un vistazo, ya que justo antes de la pupación, los endoparasitoides en fase larvaria 3 expulsan el contenido del tracto digestivo, que se denomina meconio. El meconio es muy fácil de observar ya que forma una pequeña mancha oscura. Como las cápsulas y perlas son casi transparentes, una mancha oscura es fácil de identificar sólo con una comprobación rápida durante la producción. Por ejemplo, cuando se observa que la mayoría de las perlas o cápsulas contienen larvas en fase 3, las perlas pueden recogerse manualmente de la solución nutritiva, o automáticamente, por ejemplo dando una instrucción a un aparato (por ejemplo, girando un botón o instrucciones dirigidas por ordenador) de que el recipiente que comprende las perlas o cápsulas y la solución nutritiva se vacíe y las perlas o cápsulas por ejemplo, se filtren y se transfieran o se transporten a un compartimento o contenedor siguiente en el que puede tener lugar la siguiente fase de desarrollo.

La cámara de cría recibirá las cápsulas o perlas que contengan la fase larvaria 3 al final de su desarrollo para permitir la metamorfosis. En efecto, en ese momento para la metamorfosis, la larva 3 completamente desarrollada ya no come más, y por tanto no necesita sumergirse en una solución nutritiva. La metamorfosis se realiza usando sus reservas de grasa y glucógeno. Si las perlas o cápsulas permanecieran en la solución nutritiva en esa fase de desarrollo del parasitoide, el adulto no podría dejar las cápsulas y se ahogaría el mismo en la solución. A este respecto, esta etapa participa en el proceso de cría continua.

La cámara fría se usa para almacenar las cápsulas o perlas a la temperatura adecuada. Nuestros experimentos han mostrado que es posible almacenar ninfas encapsuladas a aproximadamente 3°C en humedad alta (por ejemplo, desde el 70 hasta el 100%), preferiblemente en humedad intermedia (desde el 80 hasta el 97%) al menos durante de 3 a 5 semanas en fase de quiescencia y posiblemente más tiempo durante varios meses (1 a 6) en una fase de diapausa. Es apropiado evitar el aire saturado para evitar el crecimiento de hongos, que no se vuelven visibles en almacenamiento en frío, pero que se desarrollan sobre las ninfas cuando vuelven a temperaturas normales para el desarrollo (por ejemplo, 20°C).

El término “quiescencia” se refiere a la respuesta de insectos individuales a una desviación repentina imprevista, no cíclica y normalmente corta de las condiciones climáticas normales. Tal como se usa en el presente documento, “quiescencia” se refiere al reposo metabólico que puede inducirse mediante baja temperatura es decir, por debajo del umbral de desarrollo del insecto, comúnmente a aproximadamente 6°C pero puede depender del parasitoide usado.

5 Tan pronto como aumente la temperatura por encima de por ejemplo, 6°C en el caso anterior, el desarrollo continúa.

El término “diapausa” se refiere a una fase mediada hormonalmente de baja actividad metabólica, asociada con una morfogénesis reducida, aumento de la resistencia a condiciones ambientales extremas y una actividad del comportamiento alterada o reducida. La diapausa se produce durante una fase del desarrollo determinada genéticamente (por ejemplo, en la fase de pupa) en respuesta a señales ambientales (comúnmente una reducción de la duración del día como en otoño) que precede a condiciones desfavorables (tal como invierno). Tal como se usa en el presente documento “diapausa” se refiere a un reposo metabólico que puede inducirse por la duración de iluminación baja que imita las condiciones climáticas de otoño. En esa fase el endoparasitoide permanece vivo durante de 3 a 6 meses a baja temperatura.

15 El presente sistema proporciona por tanto varias opciones, por ejemplo la posibilidad de (1) sólo una cámara de cría hasta que el endoparasitoide salga de la ninfa, (por ejemplo, recogida de endoparasitoides), o (2) una cámara de cría hasta que el endoparasitoide sea una ninfa encapsulada y se transfiera entonces a una cámara fría para su almacenamiento, (por ejemplo, recogida de perlas con ninfas encapsuladas). Se proporcionan otras opciones para la recogida de cualquier otra fase de desarrollo del endoparasitoide siempre que haya una necesidad de la misma.

Por tanto, el sistema proporciona directamente un medio de producción de parasitoides o insectos beneficiosos a gran escala. Dichos parasitoides producidos o sus ninfas encapsuladas, directamente tras la producción o el almacenamiento, pueden usarse para liberaciones en masa en el marco del control biológico de plagas de insectos. Estas liberaciones pueden realizarse a mano o mediante cualquier clase de dispositivos de dispersión. Las ninfas encapsuladas pueden colocarse en una solución adecuada tal como una solución fisiológica salina (NaCl al 0,07% tamponada a un pH que oscila desde 6 hasta 7,5) y pulverizarse usando un pulverizador clásico. Cuando se secan, dicho biopolímero que constituye la perla o cápsula se vuelve pegajoso, en buenas condiciones las ninfas encapsuladas se pegarán sobre la planta antes de la eclosión del adulto. También puede usarse un sistema neumático de pulverización o aplicación para lanzar las perlas o las cápsulas que contienen las ninfas. Ambos sistemas permitirán una dispersión homogénea de los endoparasitoides cuando sea necesario. Ellos no excluyen el posible uso de un sistema de liberación lenta similar a un sistema difusor que contiene dichas perlas o cápsulas.

Tal como se usa en el presente documento, el término “difusor” se refiere a un dispositivo que permite liberar lentamente una cierta cantidad de parasitoide por unidad de tiempo. Puede ser una caja en la que se almacenan el parasitoide o las ninfas encapsuladas con algo de comida para el adulto y que permitirá a los adultos encontrarse en el interior tras la eclosión y posiblemente aparearse. Puede ser cualquier otra clase de dispositivo que se colocará en los campos, huertos o invernaderos que permite la eclosión de los adultos y su liberación. Es una alternativa a un dispositivo de rociado o cualquier clase de dispositivo de dispersión.

El término “entorno” en este aspecto puede referirse a una entidad física así como a las condiciones fisiológicas o ambientales en las que sería posible esa oviposición del endoparasitoide en perlas o cápsulas, que sirven como huésped artificial para la oviposición. Una entidad física podría ser por ejemplo, una jaula, un recipiente, un invernadero que comprende las perlas o cápsulas y el endoparasitoide más o menos juntos entre sí. Las condiciones fisiológicas o ambientales, por ejemplo, pueden comprender el clima apropiado o la regulación del clima en términos de temperatura, luz, humedad, etc. para establecer las condiciones óptimas para la oviposición y la supervivencia y cría óptimas de los huevos y las larvas, otras condiciones tales como la presencia de trigo o áfidos de cereales, u otros componentes que proporcionan olor o cualquier otra condición para imitar el entorno natural del endoparasitoide para la oviposición.

Según otra realización preferida, dicho sistema comprende de uno a varios endoparasitoides elegidos de la lista de endoparasitoides de áfidos presentados en la tabla 5.

La expresión “al menos uno” tal como se usa en el presente documento se refiere a al menos uno en términos de números, tal como “al menos un organismo o insecto”. Alternativamente la expresión “al menos uno” también puede significar “al menos una especie”, cuando por ejemplo, más de una clase de insecto beneficioso o endoparasitoide debe criarse al mismo tiempo, y para cada especie uno o más organismos o insectos pueden estar contenidos dentro del sistema.

La invención, que ahora se describe en general, se entenderá más fácilmente haciendo referencia a las siguientes tablas, figuras y ejemplos, que se incluyen meramente con fines de ilustración de ciertos aspectos y realizaciones de la presente invención y no pretenden limitar la invención. Todas las referencias mencionadas en el presente documento se incorporan como referencia.

Breve descripción de las figuras

65 Figura 1: *Diseño experimental de la preparación de cápsulas de biopolímero.*

La posición de la aguja es de importancia, ya que es necesario que sea horizontal para producir buenos resultados.

Figura 2: *Comportamiento de oviposición de Aphidius rhopalosiphi.*

Se prefieren las cápsulas de quitosano para los áfidos (A). Presencia de huevos en cápsulas tras la oviposición (C y D).

Ejemplos

Ejemplo 1

Perlas de biopolímero

a) Descripción y formación

1. Perlas de alginato

El alginato se produce como el principal polisacárido estructural de las algas pardas marinas (*Phaeophyceae*). Químicamente es un copolímero de bloque lineal unido a α (1 $\rightarrow$ 4) del ácido β -D-manurónico (M) y su epímero en C(5) ácido α -L-gulurónico (G). La proporción M/G puede variar fuertemente y se correlaciona claramente con las propiedades de los alginatos.

La formación de las perlas de alginato de calcio es la siguiente. Se vierte por goteo una solución que contiene 7,5 g/l de alginato (cecalgum: M/G = 1,2) a temperatura ambiente a través de una aguja para formar gotitas que caen en una solución de CaCl_2 0,1 M agitada rápidamente. Se forma una perla ($\phi = 2,3$ mm) casi instantáneamente debido a la reticulación de las moléculas de alginato por los cationes Ca^{++} .

2. Perlas de quitosano

El quitosano, poli- β -(1-4)-2-amino-2-desoxi-D-glucopiranos, es un derivado de la quitina, un polisacárido que se encuentra en una gran variedad de crustáceos, insectos y hongos.

La formación de las perlas de quitosano es la siguiente. Se disuelven 10 g/l de quitosano en una solución de ácido acético 14 ml/l. Se vierte por goteo la solución a temperatura ambiente a través de una aguja para formar gotitas que caen en tripolifosfato de pentasodio agitado rápidamente (pH 8,6). Las gotitas forman instantáneamente unas perlas de polifosfato de quitosano ($\phi = 2-3$ mm). Se lavan las perlas en ácido acético y se colocan en tripolifosfato de pentasodio. Después de 30 minutos, se retiran las perlas y se enjuagan con agua desmineralizada.

b) Aceptación por el endoparasitoide

Las señales químicas percibidas por el endoparasitoide a través de los receptores en las antenas y los tarsos son indudablemente de gran importancia en la aceptación del huésped. También es muy importante el tamaño, la forma, el color o la textura de la superficie del huésped. Si se acepta en esta fase, intentan explorar al huésped con su ovipositor. No obstante, los parasitoides frecuentemente insertan su ovipositor en un huésped pero no prosiguen poniendo un huevo. El ovipositor normalmente está cubierto de nervios sensoriales y parece probable que el insecto rechaza al huésped tras percibir que es inadecuado para la oviposición. El parasitoide puede evaluar la idoneidad del huésped usando señales químicas. Por tanto, se sometieron a prueba perlas de polímero como huésped para el endoparasitoide *Aphidius rhopalosiphi*. Se determinó la influencia del color (tabla 1), el tipo de polímero, alginato y quitosano (tabla 2) y el entorno (tabla 3), la presencia de trehalosa en el interior de la cápsula (tabla 7) y el extracto de plantas o del huésped (tabla 6) en el comportamiento del parasitoide.

1. Efecto del color sobre el comportamiento de oviposición

Nuestros resultados muestran que la respuesta, el ataque y la aceptación de los parasitoides son mejores en las perlas teñidas de amarillo que en las perlas no teñidas. Además, se observa que las perlas teñidas con Stabiloboss® (n.º de art. 070/24, Alemania) frecuentemente provocan el ataque y la aceptación del parasitoide en comparación con las perlas teñidas con E102 (Vahine BP17, 84170 Monteux, Francia). Por consiguiente, las perlas teñidas de amarillo con el marcador Stabilo®, son ejemplos preferidos de perlas de hidrogel.

2. Efecto del biopolímero (alginato o quitosano) sobre el comportamiento durante la oviposición

Nuestros resultados muestran que la respuesta, el ataque y la aceptación del parasitoide son mejores en las perlas de alginato que en las perlas de quitosano. Esto está provocado probablemente por la diferencia de color entre las perlas. En efecto, el alginato y la quitosano absorben de manera diferente el colorante (Stabilo®).

Sin embargo, con respecto a las cápsulas, se encontraron los resultados opuestos. El quitosano es más atrayente que el alginato.

3. Efecto del entorno sobre el comportamiento de oviposición

Con el fin de determinar el efecto del entorno sobre el comportamiento de oviposición del endoparasitoide *Aphidius rhopalosiphi*, se colocaron perlas de alginato teñidas con el Stabilo® en entornos diferentes:

- solo,
- con áfidos,
- con trigo,
- con áfidos sobre trigo.

Los resultados se muestran en la tabla 3.

Los resultados muestran que el entorno cercano del parasitoide puede influir en su comportamiento de oviposición. En efecto, cuando se colocan las perlas con áfidos o trigo, la respuesta del parasitoide es más frecuente. Además, el porcentaje de aceptación del parasitoide (aceptación/respuesta * 100) es importante (19%) cuando se colocan las perlas con áfidos y es muy importante (32%) cuando se colocan las perlas en un conglomerado (áfidos + trigo) en comparación con la referencia (4%). Por tanto, es posible que los olores liberados por los áfidos y el trigo exciten a los parasitoides.

4. Efecto de la presencia de trehalosa en el interior de cápsulas de quitosano

Se compararon cuatro clases de solución nutritiva en el interior de cápsulas de quitosano amarillas con respecto al comportamiento de oviposición y el número de huevos puestos en el interior de dichas cápsulas por los parasitoides *Aphidius rhopalosiphi*:

- solución nutritiva básica para parasitoides
- solución de áfidos molidos
- solución de trehalosa al 0,6% introducida en las cápsulas por difusión
- solución de trehalosa incorporada en la solución iónica con dextrano durante el proceso de la formación de la cápsula.

Parece que el número total de cápsulas atacadas, número total de cápsulas con huevos así como el número de huevos recogidos en las cápsulas, y la proporción entre estos dos valores siempre es mayor en el caso de trehalosa incorporada con dextrano y en segundo lugar en trehalosa incorporada por difusión (tabla 7). Las cápsulas de quitosano amarillas que contienen trehalosa son por tanto muy adecuadas para la oviposición del endoparasitoide. Se encontraron repetidamente huevos en esa clase de experimento.

5. Efecto de la presencia de extractos de huésped sobre el comportamiento de oviposición (véase la tabla 7)

Con el fin de determinar la capacidad de atracción de los compuestos epicuticulares de áfidos con respecto a los endoparasitoides, se extrajeron compuestos epicuticulares de la exuvia de áfidos usando metanol. Una exuvia es la cutícula que permanece tras la muda del insecto. Esta tabla muestra la diferencia observada entre el comportamiento de oviposición del parasitoide *Aphidius rhopalosiphi* sobre exuvia fresca (que contiene todos los compuestos epicuticulares), exuvia lavada con metanol (metanol frío) y exuvia de nuevo aplicada con el extracto de metanol después del lavado. Los comportamientos medidos son: de encuentro (RENC), contacto de las antenas (CA), pliegues del abdomen (PLIEGUE), contacto del ovipositor (CO), aceptación (PLIEGUE+CO) y pliegue del abdomen no seguido por oviposición (PLIEGUE solo). Parece que la exuvia fresca así como la exuvia de nuevo aplicada son más atrayentes que la exuvia lavada.

Además, se muestra un análisis (tabla 8) de la composición del extracto metabólico de los compuestos epicuticulares que pertenecen al huésped que pueden usarse para recubrir las perlas o cápsula con el fin de aumentar el nivel de oviposición en las perlas o cápsula. Se observó que esta clase de extracto con escualeno aumenta el nivel de oviposición por el endoparasitoide en la perla o cápsula.

Ejemplo 2

Cápsulas de biopolímero

Los endoparasitoides con frecuencia insertan su ovipositor en las perlas de alginato teñidas de amarillo y colocadas en un “conglomerado”. No obstante, siempre prosigue poniendo un huevo. Por tanto, es posible que las perlas no sean un buen soporte de puesta para los parasitoides. Por consiguiente, se sometieron a prueba otros soportes. Se sometieron a prueba tres clases de cápsulas de biopolímero: quitosano/dextrano, quitosano/carragenanos lambda y alginato/dextrano en los siguientes.

a) *Descripción y formación*1. *Quitosano/dextrano*

Las cápsulas de quitosano/dextrano se producen de la siguiente manera. Se disuelve una solución que contiene quitosano al 1% en agua que contiene ácido acético al 1,4% (v/v), se mantiene en agitación usando un agitador magnético a temperatura ambiente. Se extruye una suspensión acuosa que contiene polifosfato de sodio al 1,5% y dextrano al 40% a través de una aguja que genera pequeñas gotitas ($\phi = 2-3$ mm). Las gotitas forman instantáneamente una membrana de polifosfato de quitosano que encierra la gotita. Se retiran las cápsulas de la solución y se tratan adicionalmente en tripolifosfato de sodio al 1,5% (pH 8,5) durante media hora. Las cápsulas se enjuagan y guardan en agua desmineralizada.

2. *Quitosano/carragenanos lambda*

Las cápsulas de quitosano/carragenanos lambda se producen de la siguiente manera. Se disuelve una solución que contiene quitosano al 1% disuelto en agua que contiene ácido acético al 1,4% (v/v), se mantiene en agitación usando un agitador magnético a temperatura ambiente. Se extruye una suspensión acuosa que contiene polifosfato de sodio al 1,5% y carragenanos lambda al 1,4% a través de una aguja que genera pequeñas gotitas ($\phi = 2-3$ mm). Las gotitas forman instantáneamente una membrana de polifosfato de quitosano que encierra la gotita. Se retiran las cápsulas de la solución y se tratan adicionalmente en tripolifosfato de sodio al 1,5% (pH 8,5) durante media hora. Se retiran las cápsulas y se lavan en ácido acético al 1,4%. Se colocan las cápsulas en tripolifosfato de pentasodio. Después de 30 minutos, las cápsulas se enjuagan con agua desmineralizada y se guardan en agua desmineralizada.

3. *Alginato/dextrano*

Las cápsulas de alginato/dextrano se producen de la siguiente manera. Se prepara una solución que contiene alginato de sodio al 0,5% y se mantiene en agitación usando un agitador magnético a temperatura ambiente. Se extruye una suspensión acuosa que contiene CaCl_2 al 1,3% y dextrano al 20% a través de una aguja que genera pequeñas gotitas ($\phi = 2-4$ mm) que cae en una solución de alginato agitada rápidamente. Se forma una membrana capsular casi instantáneamente alrededor de la gota en suspensión para la reticulación de las moléculas de alginato interfaciales por cationes de Ca^{++} . Antes de retirar las cápsulas se diluye la solución de polímero cinco veces añadiendo la cantidad requerida de agua milli-Q. Por último, se retiran las cápsulas y se colocan en una solución de CaCl_2 al 1,3% durante 8 horas.

b) *Aceptación por el endoparasitoide*

Los experimentos mostraron que los parasitoides pusieron huevos en las cápsulas de quitosano/dextrano.

Ejemplo 3

Optimización de los métodos de preparación de cápsulas de biopolímero

Con el fin de optimizar la forma, el diámetro, la porosidad y el espesor de la pared de las perlas de biopolímero, el protocolo de Somesh *et al.* 1988 se cambió drásticamente en varios puntos. Se muestra una visión general de estos cambios en la tabla 9. Las diferencias importantes se indican en cursiva.

ES 2 339 339 T3

TABLA 1

Perlas de biopolímero alginato como huésped para el endoparásitoide Aphidius rhopalosiphi: influencia del color de la perla

	Sin color	E102	STABILO®
Respuesta	1,6 ± 2,6	16,6 ± 8,2	13,5 ± 7,2
Ataque	0,3 ± 0,8	3,6 ± 3,1	6,5 ± 4,2
Aceptación	0	1,7 ± 2,0	4,3 ± 3,5

La respuesta se define como el número de encuentros con la perla de 30 parasitoides hembra observado durante 15 minutos.

El ataque se define como el número de flexiones del abdomen por debajo del tórax orientando la punta del ovipositor hacia la perla de 30 parasitoides hembra observado durante 15 minutos.

La aceptación se define como el número de contactos con el ovipositor de 30 parasitoides hembra observado durante 15 minutos.

El E102 (H₂O:E102 1:1) y el marcador Stabilo® (H₂O:Stabilo 1:1) se usan como colorantes amarillos.

TABLA 2

Perlas como huésped para el endoparásitoide Aphidius rhopalosiphi: influencia del biopolímero

	Respuesta	Ataque	Aceptación
Alginato	13,5 ± 7,2	6,5 ± 4,2	4,3 ± 3,5
Quitósano	10,6 ± 5,7	3,1 ± 2,6	1,4 ± 1,7

La respuesta se define como el número de encuentros con la perla de 30 parasitoides hembra observado durante 15 minutos.

El ataque se define como el número de flexiones del abdomen por debajo del tórax orientando la punta del ovipositor hacia la perla de 30 parasitoides hembra observado durante 15 minutos.

La aceptación se define como el número de contactos con el ovipositor de 30 parasitoides hembra observado durante 15 minutos.

TABLA 3

Perlas de biopolímero alginato como huésped para el endoparásitoide Aphidius rhopalosiphi: influencia del entorno

	Respuesta	Ataque	Aceptación
Solo	12,4 ± 8,8	4,7 ± 5,0	0,5 ± 1,5
Áfidos	20,1 ± 12,3	7,4 ± 7,7	3,9 ± 4,2
Trigo	25,2 ± 12,3	5,3 ± 5,3	1,3 ± 1,8
Áfidos + trigo	13,5 ± 7,2	6,5 ± 4,2	4,3 ± 3,5

La respuesta se define como el número de encuentros con la perla de 30 parasitoides hembra observado durante 15 minutos.

El ataque se define como el número de flexiones del abdomen por debajo del tórax orientando la punta del ovipositor hacia la perla de 30 parasitoides hembra observado durante 15 minutos.

La aceptación se define como el número de contactos con el ovipositor de 30 parasitoides hembra observado durante 15 minutos.

ES 2 339 339 T3

TABLA 4

Solución nutritiva usada para criar larvas de Aphidius rhopalosiphi

Medio basal	SSM3 ¹
Aditivos	
Trehalosa	600 mg/100 ml
Vitaminas	1 ml (solución madre) ²
FBS (suero bovino fetal)	10% (v/v)

¹Composición de SSM3

	Shields y Sang 1977 Célula de <i>Drosophila</i>
Número de catalogo	S8398
mg/100 ml	
b-alanina	25
alanina	150
arginina	50
asparagina	30
ácido aspártico	30
cisteína	20
cistina	
ácido glutámico	1441
glutamina	60
glicina	50
histidina	55
hidroxiprolina	
isoleucina	25
leucina	40
lisina	85
metionina	25
fenilalanina	25
prolina	40
serina	35
treonina	50
triptófano	10
tirosina	36
valina	40
TOTAL de aminoácidos	2322

<u>Azúcar</u>	
<u>glucosa</u>	<u>1000</u>
<u>Vitaminas</u>	
<u>colina</u>	<u>5</u>
<u>Sales minerales</u>	
<u>Na₂HPO₄</u>	<u>88</u>
<u>MgSO₄</u>	<u>215</u>
<u>CaCl₂</u>	<u>76</u>
<u>tampón BIS-TRIS</u>	<u>105</u>
<u>ácido oxalacético</u>	<u>25</u>
<u>Diversos</u>	
<u>extracto de levadura</u>	<u>100</u>
<u>pH</u>	<u>6,4</u>

ES 2 339 339 T3

²Composición de las vitaminas (mg/100 ml)

Biotina	0,008
Colina	90
Cianocobalamina	0,05
Ácido fólico	0,06
Inositol	5
Nicotinamida	1
Ácido pantoténico	0,8
Piridoxina	0,01
Riboflavina	0,008
Tiamina	0,008

TABLA 5

Relaciones entre plantas, pulgones y parasitoides

Pulgón	Huésped I	Huésped II	Parasitoide
<i>Acyrtosiphon caraganae</i>			<i>Aphidius ervi</i> (Hal.) <i>Toxares deltiger</i> (Hal.)
<i>Acyrtosiphon kindoi</i>			<i>Aphidius eadyi</i> <i>Praon volucre</i> (Hal.)
<i>Acyrtosiphon pisum</i> (Harr.)		<i>Urtica dioica</i> L. Familia de leguminosas: <i>Vicia faba</i> L., guisante, judía, trébol	<i>Aphidius eadyi</i> <i>Aphidius ervi</i> (Halyday) <i>Aphidius picipes</i> <i>Aphidius smithi</i> <i>Aphidius urticae</i> <i>Praon dorsale</i> <i>Praon volucre</i> (Halyday) <i>Toxares deltiger</i> (Hal.)
<i>Aphis fabae</i> (Scop.)	<i>Evonymus europaea</i>		<i>Aphidius colemani</i> (Vier.) <i>Aphidius matriarcae</i> (Hal.) <i>Ephedrus plagiator</i> (Nees) <i>Lipolexis gracilis</i> (Förster) <i>Lysiphlebus cardui</i> <i>Lysiphlebus fabarum</i> (Marshall) <i>Praon abjectum</i> (Hal.) <i>Praon volucre</i> (Hal.) <i>Trioxys angelicae</i> (Haliday)
<i>Brachycaudus helichrysi</i>	<i>Prunus spinosa</i>	Asteraceae	
<i>Brachycaudus sp.</i>			<i>Dysaphis sp.</i> <i>Ephedrus persicae</i> (Frog.) <i>Ephedrus plagiator</i> (Nees) <i>Lipolexis gracilis</i> (Förster) <i>Lysiphlebus fabarum</i> (Marshall) <i>Paralipsis enervis</i> (Nees) <i>Praon volucre</i> (Hal.) <i>Trioxys angelicae</i> (Halyday)

ES 2 339 339 T3

	<i>Cinara sp.</i>			<i>Pauesia sp.</i>
5	<i>Diuraphis noxia</i> (Kurdjumov)			<i>Diaretiella rapae</i> (M'Intosh)
	<i>Drepanisiphum platanoidis</i>	<i>Acer spp.</i>		<i>Aphelinus thomsoni</i> (Graham)
10	<i>Elatobium abietinum</i>	<i>Picea</i>		
	<i>Forda sp.</i>			<i>Monoctonia pistaciaccola</i>
15	<i>Hyalopterus pruni</i> (Geoffr.)	<i>Prunus</i>	<i>Phragmites communis</i>	<i>Ephedrus plagiator</i> (Nees) <i>Praon volucre</i> (Halyday)
20	<i>Macrosiphon pisum</i>		Familia de leguminosas	<i>Aphidius ervi</i> (Hal.)
	<i>Macrosiphum euphorbiae</i>	<i>Rosa spp.</i>	<i>Solanaceae</i>	<i>Aphidius ervi</i> (Hal.)
25				<i>Aphidius nigripes</i>
30	<i>Metopolophium dirhodum</i>	<i>Rosa spp.</i>	Gramíneas	<i>Aphelinus abdominalis</i> <i>Aphidius ervi</i> (Hal.) <i>Aphidius picipes</i> <i>Aphidius rhopalosiphi</i> <i>Aphidius uzbekistanicus</i> <i>Ephedrus plagiator</i> (Nees) <i>Praon volucre</i> (Hal.) <i>Toxares deltiger</i> (Hal.)
35	<i>Metopolophium Fetuscae</i> (Theobald)			<i>Aphidius ervi</i> (Hal.) <i>Aphidius picipes</i> <i>Aphidius rhopalosiphi</i> <i>Aphidius uzbekistanicus</i>
40	<i>Microlophium carnosum</i> (Buckton)		<i>Urtica dioica</i>	<i>Aphidius ervi</i> (Hal.) <i>Aphidius picipes</i> (Nees) <i>Aphidius urticae</i>
45	<i>Microlophium evansi</i>		<i>Urtica dioica</i> L.	<i>Aphidius ervi</i> (Hal.)
50	<i>Mindarus Abietinus</i> (Koch)			<i>Pseudopraon minderphagum</i>
55	<i>Myzus persicae</i>	<i>Prunus persicae</i>	<i>Patata</i> <i>Nabo</i> <i>Chrysanthenum</i> <i>Brassicaceae</i> (variedades de cultivo)	<i>Aphidius colemani</i> <i>Aphidius ervi</i> (Hal.) <i>Aphidius matricariae</i> <i>Diaretiella rapae</i> (M'Intosh) <i>Ephedrus cerasicola</i> <i>Ephedrus plagiator</i> (Nees)
60	<i>Ononis spp.</i>		<i>Urtica dioica</i> L.	
	<i>Pemphigus sp.</i>			<i>Monoctonia pistaciaecola</i>
65	<i>Periphyllus acericola</i> (Walker)		<i>Acer pseudoplatanus</i>	<i>Praon sylvestre</i> (Sary)
	<i>Periphyllus</i>		<i>Acer platanoides</i>	<i>Trioxys flacatis</i> (Alaekauer) <i>Praon sylvestre</i> (Sary)

ES 2 339 339 T3

	<i>aceris</i> (Linnaeus)		<i>Trioxys flacatis</i> (Alaekauer)
5	<i>Periphyllus</i> <i>coracinus</i>	<i>Acer platanoides</i>	<i>Aphidius setiger</i>
	(Koch)		<i>Trioxys glacatus</i> (Alaekauer)
10	<i>Periphyllus</i> <i>hirticornis</i> (Walker)	<i>Acer campestre</i>	<i>Aphidius setiger</i> <i>Praon sylvestre</i> (Stary) <i>Trioxys flacatus</i> (Alaekauer)
15	<i>Periphyllus</i> <i>lyropictres</i> (Kessler)	<i>Acer platinoides</i> <i>Acer</i> <i>pseudoplatanus</i>	<i>Aphidius setiger</i> <i>Trioxys flacatus</i> (Alaekauer)
20	<i>Periphyllus</i> <i>obscurus</i> (Mamontova)	<i>Acer campestre</i>	<i>Trioxys flacatus</i> (Alaekauer)
	<i>Periphyllus</i> <i>sp.</i>	<i>Acer spp.</i>	<i>Praon sylvestre</i>
25	<i>Periphyllus</i> <i>testudinaceus</i> (Ferne)	<i>Acer campestre</i> <i>Acer platinoides</i> <i>Acer</i> <i>pseudoplatanus</i>	<i>Praon sylvestre</i> (Stary) <i>Trioxys flacatus</i> (Alaekauer)
30	<i>Protolachnus</i> <i>sp.</i>		<i>Diaretus leucopterus</i> (Hal.)
35	<i>Rhopalosiphum</i> <i>padi</i>	<i>Prunus</i> <i>padus</i> L. <i>Cultivos</i> <i>Capsella bursa-</i> <i>pastoris</i>	<i>Diaretiella rapae</i> (M'Intosh) <i>Trioxys angelicae</i> (Haliday)
	<i>Schizolachnus</i> <i>sp.</i>		<i>Pauesia unlilachni</i> (Gahan)
40	<i>Schizolachnus</i> <i>graminum</i> (Rondoni)	<i>Sorgo</i> <i>Cebada</i>	<i>Aphidius rhopalosiphi</i> <i>Lysiphlebus testaceipes</i> (Cresson)
45	<i>Sitobion</i> <i>avenae</i>	<i>Gramíneas</i>	<i>Aphidius avenaphis</i> (Fitch) <i>Aphidius ervi</i> (Hal.) <i>Aphidius picipes</i> (Nees) <i>Aphidius rhopalosiphi</i> <i>Aphidius uzbekistanicus</i> <i>Diaretiella rapae</i> (M'Intosh) <i>Ephedrus plagiator</i> (Nees) <i>Praon volucre</i> (Hal.) <i>Toxares deltiger</i> (Hal.)
50			
55	<i>Sitobion</i> <i>fragariae</i>	<i>Rubus</i> <i>fruticosus</i> <i>Gramíneas: Avena</i> <i>sativa</i> L. <i>Digitalis sp.</i>	<i>Aphidius ervi</i> (Hal.) <i>Aphidius rhopalosiphi</i>

TABLA 6

Consecuencia de la presencia de trehalosa sobre el comportamiento de oviposición de *Aphidius rhopalosiph*

Parámetros	T	Th _{Dex}	Th _{Dif}	JP
N.º total de cápsulas	60	60	60	60
% de cápsulas atacadas	23,33%	46,67%	46,67%	36,67%
N.º de ataques por cápsulas atacadas	2,57	5,04	11,43	4,86
N.º de cápsulas con huevos	0	6	1	0
% de cápsulas con huevos/total de cápsulas	-	10%	1,67%	-
% de cápsulas con huevos/total de cápsulas atacadas	-	21,42%	3,57%	-
Número total de huevos encontrados en el interior de las cápsulas	0	10	2	0
% de huevos/total de cápsulas	-	16,67%	3,33%	-
% de huevos/total de cápsulas atacadas	-	35,71%	7,14%	-

T: Cápsula control: Cápsula de quitosano + stabilo amarillo

Th_{Dex}: Cápsulas amarillas + trehalosa mezclada con dextrano.

Th_{Dif}: Cápsulas amarillas + trehalosa introducida por difusión.

JP: Cápsulas amarillas que contienen extractos de áfidos molidos.

TABLA 7

Capacidad de atracción de los compuestos epicuticulares del áfido con respecto a los endoparasitoides

Comportamiento	Fresco	REAPP	Metileno frío
RENC	31,0	40,2	15,2
CA	21,7	16,6	5,5
PLIEGUE	3,7	2,2	0,8
CO	8,5	2,7	1,7
ACEPTACIÓN	12,1	4,9	2,5
PLIEGUE solo	3,7	2,2	0,8

ES 2 339 339 T3

TABLA 8

Composición del extracto metabólico. También había escualeno presente

	Moléculas identificadas	Tiempo de retención (min.)
5	Tetradecanoato de metilo	9,98
	9-Metiltetradecanoato de metilo	11,32
10	Cis-9-octadecanoato de metilo	12,45
	Hexadecanoato de metilo	12,73
	Cis,cis-9-12-octadienoato de metilo	Cerca al pico siguiente
	Cis-9-octadecenoato de metilo	15,28
15	Octadecanoato de metilo	15,59

TABLA 9

Modificación del protocolo para la preparación de cápsulas de quitosano para oviposición

	Somesh et al. 1988: Técnicas para preparar cápsulas con membrana de hidrogel	<u>Invencción</u>
25		
30	Solución de polímero	1 % (p/v) de quitosano (Sigma) Ácido acético al 1,4% (v/v).
	Solución iónica	Tripolifosfato de pentasodio al 1,5% (p/v) Dextrano (Sigma) al 40% (p/v).
35	Duración en quitosano	Sin datos
	Enjuague de cápsulas	Ácido acético al 1,4% (v/v)
40	Tiempo de maduración	30 min. en tripolifosfato de pentasodio al 1,5%
	Agitación de la solución de polímero	Sin datos
45	Diámetro de la aguja	No facilitado
50	Tasa de suministro de solución iónica	No facilitada
55	pH	No facilitado
60		pH de la solución de polímero: 3,5 (obligatorio t < 5,5) pH de la solución iónica: intervalo entre 6 y 9
	<u>Características que favorecen la oviposición en las cápsulas</u>	
	Color de las cápsulas	Sin objeto
65	Contenido de las cápsulas	Sin objeto

Referencias

Grenier et al. (1994) en Pest Management in the Subtropics, Biological Control-a Florida Perspective, Eds, D., Rosen, F. D. Bennett, y J. L. Capinera, Intercept Press, Andover, Reino Unido, capítulo 10, págs. 181-205.

Hoffman, J.D., Ignoffo, C.M. (1974). Growth of *Pteromalus puparum* in a semi-synthetic medium. *Ann. Ent. Soc. Am.* 67, 524-525.

Hoffman, J.D., Ignoffo, C.M y Dickerson, W.A. (1975). *In vitro* rearing of the endoparasitic wasp, *Trichogramma pretiosum*. *Ann. Ent. Soc. Am.* 68, 335-336.

House, H.L. (1978) An artificial host: Encapsulated synthetic medium for *in vitro* oviposition and rearing the endoparasitoid *Itoplectis conquisitor* (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Canadian entomologist.* 110, 331-333.

Pennacchio, F., Vinson, S.B., Tremblay, E. (1992). Preliminary results on *in vitro* rearing of the endoparasitoid *Cardichiles nigriceps* from egg to second instar. *Entomol. Exp. Appl.*, 64, 209-216.

Simmonds, F.J. (1966). Insect parasites and predators. En Insect Colonization and Mass production (Ed. By Smith C. N.), págs. 489-499. *Academic Press*, Nueva York.

Somesh C. Nigam, I-Fu Tsao, Akiyoshi Sokada y Henry Y. Wang 1988. Techniques for preparing hydrogel membrane capsules. *Biotechnology Techniques* vol 2 n.º 4. págs. 271-276 Anexo 1.

Velings N. (1997): Propriétés physico-chimiques des billes d'alginate et leur influence sur l'incorporation ou le relargage de molécules bioactives. Université catholique de Louvain (UCL).

Wang Henry Y; Nigam Somesh (1995) US 5427935 Hybrid membrane bead for encapsulating materials in semi-permeable hybrid membranes.

Yagzan, S. (1972). A chemically defined synthetic diet and larval nutritional requirements of the endoparasitoid *Itoplectis conquisitor*. *Journal of insect physiology*, 18, 2123-2141.

REIVINDICACIONES

1. Uso de una perla o cápsula de biopolímero esférica, porosa e hidrófila para la cría *in vitro* de endoparasitoides, **caracterizado** porque dicha perla o cápsula se usa para la oviposición y cría continua de un endoparasitoide desde el huevo hasta la eclosión del adulto de dicho endoparasitoide.
2. Uso según la reivindicación 1, en el que dicha perla o cápsula de biopolímero se compone de alginato, carragenanos o quitosano, o mezclas de los mismos.
3. Uso según la reivindicación 2, en el que dicha perla o cápsula de biopolímero se compone esencialmente de alginato, en el que dicho alginato es un copolímero de ácido beta-D-manurónico y ácido alfa-L-glucurónico, reticulado con cationes divalentes.
4. Uso según la reivindicación 2, en el que dicha perla o cápsula de biopolímero se compone esencialmente de quitosano, en el que dicho quitosano es un derivado de quitina (poli-beta-(1-4)-2-amino-2-desoxi-D-glucopiranososa).
5. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicha perla o cápsula de polímero es esencialmente amarilla.
6. Uso según la reivindicación 5, en el que dicha perla o cápsula de polímero se tiñe de amarillo.
7. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dichas perlas o cápsulas se recubren con extracto epicuticular del huésped y/o extracto de plantas.
8. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicho endoparasitoide se elige del grupo de endoparasitoides himenópteros seleccionados de *Aphelinus abdominalis*, *Aphelinus thomsoni* (Graham), *Aphidius avenaphis* (Fitch), *Aphidius colemani* (Vier.), *Aphidius eadyi*, *Aphidius ervi* (Hal.), *Aphidius matriarcae* (Hal.), *Aphidius nigripes*, *Aphidius picipes* (Nees), *Aphidius rhopalosiphi*, *Aphidius setiger*, *Aphidius smithi*, *Aphidius uzbekistanicus*, *Aphidius urticae*, *Aphidius uzbekistanicus*, *Diaretiella rapae* (M'Intosh), *Diaretus leucopterus* (Hal.), *Dysaphis* sp., *Ephedrus cerasicola*, *Ephedrus persicae* (Frog.), *Ephedrus plagiator* (Nees), *Lipolexis gracilis* (Förster), *Lysiphlebus cardui*, *Lysiphlebus fabarum* (Marshall), *Lysiphlebus testaceipes* (Cresson), *Monoctonia pistaciicola*, *Paralipsis enervis* (Nees), *Pauesia* sp., *Pauesia unilachni* (Gahan), *Praon abjectum* (Hal.), *Praon dorsale*, *Praon sylvestre* (Stary), *Praon volucre* (Hal.), *Pseudopraon minderphagum*, *Toxares deltiger* (Hal.), *Trioxys angelicae* (Haliday), *Trioxys flacatis* (Alaekauer), *Trioxys glacatus* (Alaekauer).
9. Método para la cría *in vitro* de endoparasitoides desde el huevo hasta la eclosión del adulto, que comprende usar una perla o cápsula de biopolímero esférica, porosa e hidrófila tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para la oviposición, en el que dicho endoparasitoide se coloca en un entorno que comprende trigo y/o sus huéspedes naturales y/o los olores de sus huéspedes naturales.
10. Método para la cría *in vitro* de endoparasitoides himenópteros desde el huevo hasta la eclosión del adulto, que comprende usar una perla o cápsula de biopolímero esférica, porosa e hidrófila tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para la oviposición, en el que dicho endoparasitoide se coloca en un entorno que comprende trigo y/o áfidos de cereales.
11. Método para la cría *in vitro* continua de un endoparasitoide que comprende las etapas de:
 - usar una perla o cápsula de biopolímero esférica, porosa e hidrófila tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, conteniendo dicha perla o cápsula una solución nutritiva, y
 - introducir dicha perla o cápsula en una solución nutritiva, esterilizada, oxigenada durante el desarrollo del endoparasitoide.
12. Método según la reivindicación 11, para la cría *in vitro* de endoparasitoides hasta la fase de ninfas encapsuladas que comprende la etapa de recoger la perla o cápsula cuando el endoparasitoide es una ninfa encapsulada.
13. Método según la reivindicación 12, para la cría *in vitro* de endoparasitoides hasta la fase de eclosión de ninfas adultas que comprende la etapa de recoger el endoparasitoide eclosionado de la perla o cápsula.
14. Perla o cápsula de biopolímero esférica, porosa e hidrófila que comprende una ninfa encapsulada de un endoparasitoide obtenida mediante el método según la reivindicación 12.
15. Uso de una perla o cápsula de biopolímero según la reivindicación 14 en el control de plagas.

ES 2 339 339 T3

16. Método para la producción en masa de grandes cantidades de endoparasitoides que comprende pulverizar las perlas o cápsulas de biopolímero obtenidas mediante el método según la reivindicación 12, mediante colocación de dichas perlas o cápsulas en una solución adecuada y/o pulverización usando un pulverizador.

5 17. Sistema para la cría de endoparasitoides que comprende:

- usar al menos una perla o cápsula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9,
- al menos un endoparasitoide, y
- 10 - un entorno adecuado para la oviposición de dicho endoparasitoide en dicha perla o cápsula.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

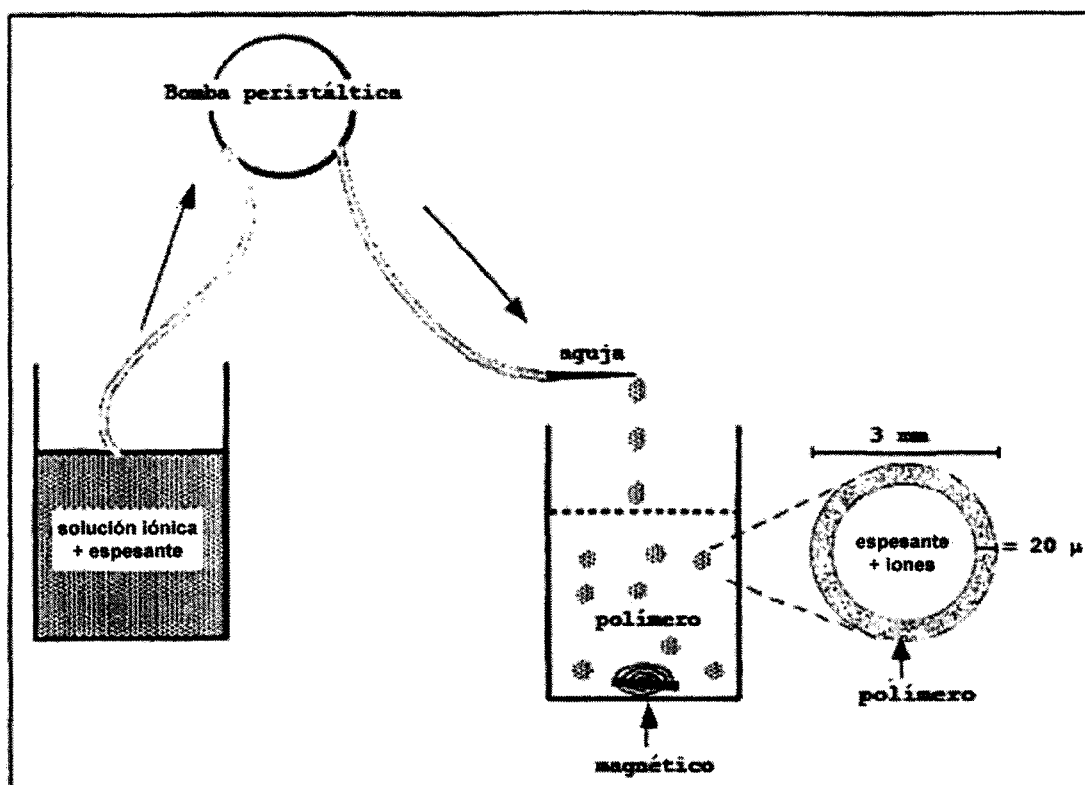


FIGURA 1

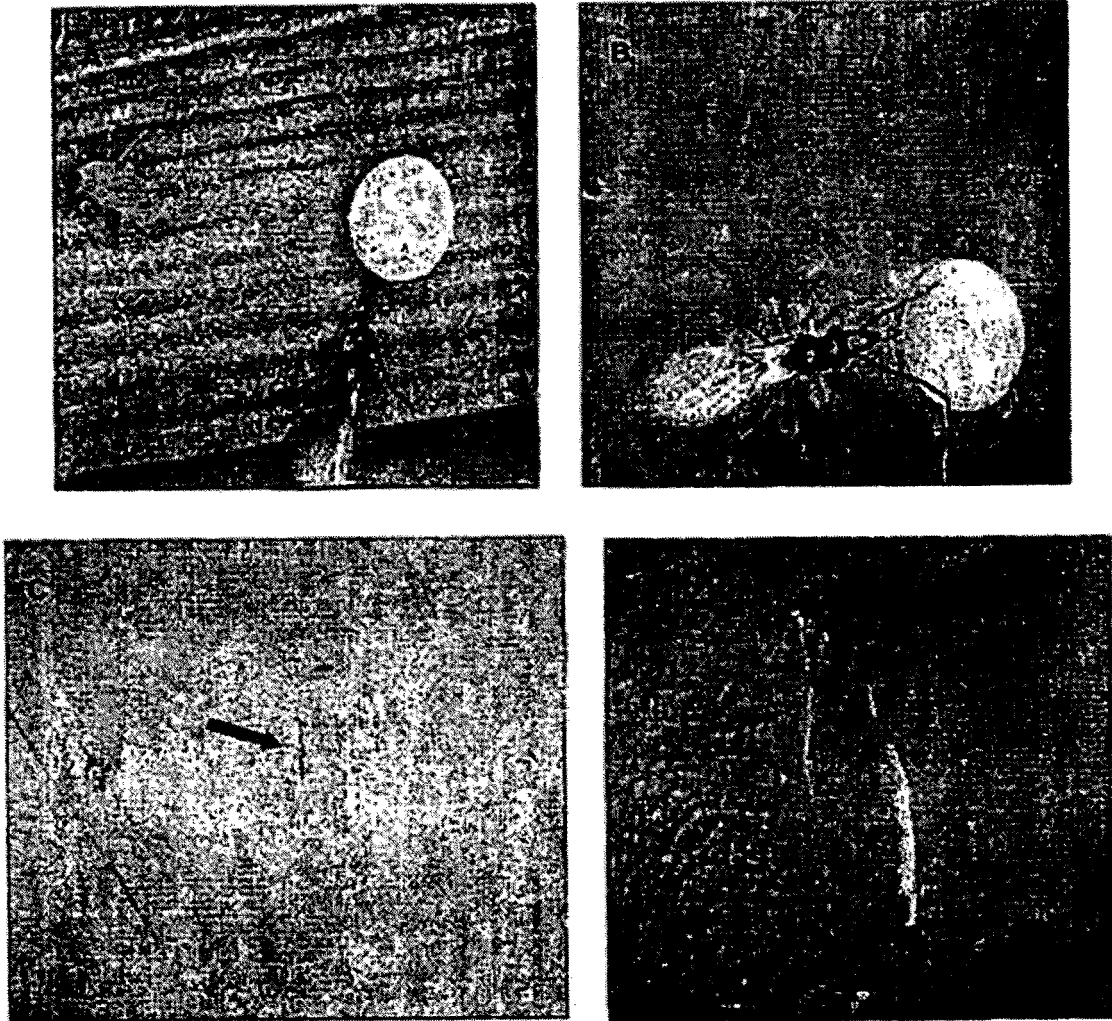


FIGURA 2