(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 323 525**

(51) Int. Cl.:
A01N 63/00 (2006.01)
A01N 47/22 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Número de solicitud europea: **01985867 .9**
(96) Fecha de presentación : **12.12.2001**
(97) Número de publicación de la solicitud: **1347685**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **01.10.2003**

(54) Título: **Procedimiento para combatir organismos dañinos en cultivos de maíz Bt.**

(30) Prioridad: **28.12.2000 DE 100 65 395**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
20.07.2009

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
20.07.2009

(73) Titular/es: **Bayer CropScience AG.**
Alfred-Nobel-Strasse 50
40789 Monheim, DE

(72) Inventor/es: **Kern, Manfred**

(74) Agente: **Carpintero López, Mario**

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).

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. Pº de la Castellana, 75 – 28071 Madrid

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para combatir organismos dañinos en cultivos de maíz Bt.

Son conocidas plantas de maíz modificadas genéticamente que expresan toxinas de *Bacillus thuringiensis* (Bt) y por tanto presentan resistencia frente a infestación por determinados insectos dañinos (maíz Bt), y se utilizan cada vez más en el cultivo comercial de plantas (véase, por ejemplo, el documento EP-A 0.485.506). Aunque dicho maíz modificado genéticamente presenta ya muy buenas propiedades, existe todavía una serie de problemas, de modo que queda un amplio margen para mejoras.

En el documento WO 02/30205, se describe la protección de plantas de maíz Bt transgénicas frente a daños por alimentación mediante el tratamiento del producto de siembra con una cantidad eficaz de determinados plaguicidas. Se describe en el documento WO 99/35910 el combate de organismos dañinos en plantas transgénicas, como entre otras maíz Bt, mediante la aplicación de pimetrozina, profenofos, un derivado de benzoilurea o un derivado de carbamato sobre los organismos dañinos o su entorno. El documento WO 99/63829 da a conocer que determinados principios activos insecticidas en combinación con algodón Bt presentan efectos sinérgicos.

Era por tanto el objetivo procurar soluciones mejoradas a los problemas para combatir plagas del maíz.

Se ha encontrado ahora sorprendentemente que determinados insecticidas presentan efectos sinérgicos en el uso en combinación con maíz Bt.

Es por tanto objeto de la invención un procedimiento para combatir organismos dañinos en plantas de maíz modificado genéticamente que contienen un gen derivado de *Bacillus thuringiensis* que codifica una proteína insecticida eficaz y expresa ésta, en el que se aplica una cantidad insecticida eficaz sinérgica de metiocarb (482) sobre las plantas, sus productos de siembra o propagación y/o sus zonas de cultivo.

El número entre paréntesis reproduce el número de registro en el The e-Pesticide Manual', versión en CD-ROM 1.1, 1999-2000 (ISBN: 1-901396-22-3), basado en "The Pesticide Manual", 11ª ed., British Crop Protection Council, Farnham, 1997.

El procedimiento según la invención posibilita una cantidad de aplicación reducida de agentes fitoprotectores que actúan sinérgicamente con las plantas transgénicas, así como un aumento y ampliación del grado de efecto de las plantas transgénicas, y ofrece por tanto ventajas tanto económicas como ecológicas.

Las ventajas del procedimiento según la invención se basan por un lado en las sinergias con las toxinas de *Bacillus thuringiensis* (toxinas Bt) producidas en las plantas transgénicas, así como por otro lado, por ejemplo, en un número reducido de aplicaciones o en una reducción de las cantidades de aplicación hasta dosificaciones en parte subletales (en comparación con la aplicación convencional de los insecticidas individuales) y una contaminación ambiental claramente reducida ligada a ello.

Es igualmente objeto de la invención el uso de metiocarb para combatir organismos dañinos en sinergia con plantas de maíz modificadas genéticamente que contienen un gen derivado de *Bacillus thuringiensis* que codifica una proteína insecticida eficaz y expresa ésta.

El término "insecticida eficaz" comprende en el sentido de la invención efecto insecticida, acaricida, molusquicida, nematicida, ovicida, así como un efecto repelente, modificador del comportamiento y esterilizador

El compuesto insecticida eficaz utilizado según la invención es conocido y comercialmente obtenible.

El insecticida usado según la invención es habitualmente obtenible en forma de formulación comercial. Sin embargo, puede formularse dado el caso de modo diferente, dependiendo de cómo afecten los parámetros biológicos y/o fisicoquímicos. Como posibilidades de formulación se tienen en cuenta, por ejemplo:

Polvo humectable (WP), concentrado emulsionable (EC), disoluciones acuosas (SL), emulsiones, disoluciones pulverizables, dispersiones basadas en aceite o agua (SC), suspoemulsiones (SE), polvo espolvoreable (DP), desinfectante, gránulos en forma de microgránulos, gránulos de pulverización, recubrimiento y adsorción, gránulos dispersables en agua (WG), formulaciones de ULV, microcápsulas, ceras o cebos.

Estos tipos de formulación individuales son conocidos en principio y se describen, por ejemplo, en:

Winnacker-Küchler, "*Chemische Technologie*", vol. 7, C. Hauser Verlag München, 4ª ed. 1986; van **Falkenberg**, "*Pesticides Formulations*", Marcel Dekker N.Y., 2ª Ed. 1972-73; K. **Martens**, "*Spray Drying Handbook*", 3ª Ed. 1979, G. Goodwin Ltd. Londres.

Los coadyuvantes de formulación necesarios, como materiales inertes, tensioactivos, disolventes y otros aditivos, son igualmente conocidos y se describen, por ejemplo, en:

Watkins, "*Handbook of Insecticide Dust Diluents and Carriers*", 2ª Ed., Darland Books, Caldwell N.J.; H. v. **Olphen**, "*Introduction to Clay Colloid Chemistry*", 2ª Ed., J. Wiley & Sons, N.Y.; **Marsden**, "*Solvents Guide*", 2ª Ed., Interscience, N.Y. 1950; **McCutcheon's**, "*Detergents and Emulsifiers Annual*", MC Publ. Corp., Ridgewood N.J.; **Sisley** y **Wood**, "*Encyclopedia of Surface Active Agents*", *Chem. Publ. Co. Inc*., N.Y. 1964; **Schönfeldt**, "*Grenzflächenaktive Äthylenoxidaddukte*", *Wiss. Verlagsgesell*., Stuttgart 1967; **Winnacker-Küchler**, "*Chemische Technologie*", vol. 7, C. Hanser Verlag München, 4ª ed. 1986.

Basándose en estas formulaciones, pueden prepararse también combinaciones con otras sustancias plaguicidas eficaces, fertilizantes y/o reguladores del crecimiento de plantas, por ejemplo, en forma de una formulación preparada o de mezcla en tanque. Los polvos humectables son preparados dispersables homogéneamente en agua que, además del principio activo y aparte de una sustancia diluyente o inerte, contienen humectantes, por ejemplo, alquilfenoles polioxietilados, alcoholes grasos polioxietilados, alquil- o alquilfenolsulfonatos y dispersantes, por ejemplo, ligninsulfonato de sodio o 2,2'-dinaftilmetano-6,6'-disulfonato de sodio.

Los concentrados emulsionables se preparan mediante disolución del principio activo en un disolvente orgánico, por ejemplo, butanol, ciclohexanona, dimetilformamida, xileno o también compuestos aromáticos o hidrocarburos de alto punto de ebullición añadiendo uno o varios emulsionantes. Pueden usarse como emulsionantes, por ejemplo: sales de calcio del ácido alquilarilsulfónico como dodecilbencenosulfonato de calcio o emulsionantes no iónicos como poliglicolésteres de ácido graso, alquilarilpoliglicoléteres, poliglicoléteres de alcohol graso, productos de condensación de óxido de propileno-óxido de etileno, alquilpoliéteres, ésteres de ácido graso de sorbitán, ésteres de ácido graso de polioxietilensorbitán o ésteres de polioxietilensorbita.

Los polvos espolvoreables se obtienen mediante el molido del principio activo con sustancias sólidas finamente divididas, por ejemplo, talco, arcillas naturales como caolín, bentonita, pirofilita o tierra de diatomeas. Los gránulos pueden prepararse mediante atomización del principio activo sobre material inerte granulado capaz de absorción o mediante aplicación de concentrados de principio activo mediante adhesivos, por ejemplo, poli(alcohol vinílico), poliacrilato de sodio o también aceites minerales sobre la superficie de sustancias portadoras como arena, caolinita o material inerte granulado. Pueden granularse también principios activos adecuados del modo habitual para la preparación de gránulos de fertilizante, si se desea en mezcla con fertilizantes.

En polvos humectables, la concentración de principio activo asciende, por ejemplo, aproximadamente de 10 a 90% en peso, estando compuesto el resto hasta 100% en peso por componentes de formulación habituales. En concentrados emulsionables, la concentración de principio activo puede ascender a aproximadamente 5 a 80% en peso. Las formulaciones en forma de polvo contienen en su mayoría 5 a 20% en peso de principio activo, las disoluciones pulverizables de aproximadamente 2 a 20% en peso. En gránulos, el contenido de principio activo depende en parte de si el compuesto activo se presenta líquido o sólido y de cuál coadyuvante de granulación, carga y demás se usa.

Además, las formulaciones de principios activos citados contienen dado el caso las sustancias adhesivas, humectantes, dispersantes, emulsionantes, de penetración, disolventes, cargas o portadores habituales respectivamente.

Para la aplicación, se diluyen los concentrados presentes dado el caso en forma comercial de modo habitual, por ejemplo, en polvos humectables, concentrados emulsionables, dispersiones, y también parcialmente en microgránulos, mediante agua. Los preparados en forma de polvo y granulados, así como disoluciones pulverizables, ya no se diluyen habitualmente antes de la aplicación con otras sustancias inertes.

La cantidad de aplicación necesaria varía con las condiciones externas como temperatura, humedad y demás. Puede oscilar dentro de límites amplios, por ejemplo entre 0,1 g/ha y 5,0 kg/ha o más de sustancia activa. Preferiblemente, se encuentra sin embargo entre 0,1 g/ha y 1,0 kg/ha. A causa del efecto sinérgico entre el maíz Bt y el insecticida, son especialmente preferidas cantidades de aplicación de 0,5 a 500 g/ha.

Para metiocarb, se prefieren cantidades de aplicación de 50 a 5000 g/ha, se prefieren especialmente 50 a 2000 g/ha.

El principio activo puede presentarse en sus formulaciones comerciales así como en formas de aplicación preparadas a partir de estas formulaciones en mezclas con otros principios activos, como insecticidas, cebos, esterilizadores, acaricidas, nematicidas, fungicidas, sustancias reguladoras del crecimiento o herbicidas.

Son otros asociados de mezcla preferidos

1. Del grupo de ésteres del ácido carbónico:

acrinatrina, aletrina, alfametrina, (E)-(1*R*)-cis-2,2-dimetil-3-(2-oxotiolan-3-ilidenmetil)ciclopropanocarboxilato de 5-bencil-3-furilmetilo, beta-ciflutrina, bioaletrina, bioaletrina (isómero de (S)-ciclopentilo), biorresmetrina, bifentrina, (1*RS*)-trans-3-(4-*terc*-butilfenil)-2,2-dimetilciclopropanocarboxilato de (*RS*)-1-ciano-1-(6-fenoxi-2-piridil)metilo (NCl 85193), cicloprotrina, cititrina, cifenotrina, empentrina, esfenvalerato, fenflutrina, flumetrina, fluvalinato (isómero D), imiprotrina (S-41311), permetrina, fenotrina (isómero (*R*)), praletrina, piretrinas (productos naturales), resmetrina, tetrametrina, teta-cipermetrina (TD-2344), transflutrina, zeta-cipermetrina (F-56701);

2. Del grupo de amidinas:

clordimeform;

3. Otros:

ABG-9008, acetamiprida, *Anagrapha falcitera*, AKD-1022, AKD-3059, ANS-118, bifenazato (D-2341), binapacrilo, BJL-932, bromopropilato, BTG-504, BTG-505, buprofezina, canfeclor, clorobenzilato, clorfluazurón, 2-(4-clorofenil)-4,5-difeniltiofeno (UBI-T 930), clorfentezina, cromafenozida (ANS-118), CG-216, CG-217, CG-234, A-184699, éster (2-naftilmetílico) del ácido ciclopropanocarboxílico (Ro12-0470), ciromazina, diaclodeno (tiametoxam), éster etílico del ácido *N*-(3,5-dicloro-4-(1,1,2,3,3,3-hexafluoro-1-propiloxi)fenil)carbamoil)-2-clorobenzocarboximídico, DDT, dicofol, *N*-(2,3-dihidro-3-metil-1,3-tiazol-2-iliden)-2,4-xilidina, dinobutón, dinocap, diofenolano, DPX-062, benzoato de emamectina (MK-244), etiprol (sulfetiprol), etofenprox, etoxazol (YI-5301), fenoxicarb, fluazurón, flumita (flufenzina, SZI-121), 2-fluoro-5-(4-(4-etoxifenil)-4-metil-1-pentil)difeniléter (MTI 800), fenpiroximato, fentiocarb, flubenzimina, flucicloxurón, flufenprox (ICIA5683), fluproxifeno, gamma-HCH, halofenozida (RH-0345), halofenprox (MTI-732), hexaflumurón (DE-473), hexitiazox, HOI-9004, hidrametilnona (AC 217300), indoxacarb (DPX-MP062), kanemita (AKD-2023), M-020, MTI-446, ivermectina, M-020, milbemectina, NC-196, Neemgard, nitenpiram (TI-304), 2-nitrometil-4,5-dihidro-6*H*-tiazina (DS 52618), 2-nitrometil-3,4-dihidrotiazol (SD 35651), 2-nitrometilen-1,2-tiazinan-3-ilcarbamaldehído (WL 108477), piriproxifeno (S-71639), NC-196, NC-1111, NNI-9768, OK-9701, OK-9601, OK-9602, propargita, pimetrozina, piridabeno, pirimidineno (SU-8801), RH-0345, RH-2485, RYI-210, S-1283, S-1833, SB7242, SI-8601, silafluofeno, silomadina (CG-177), SU-9118, tebufenpirad (MK-239), teflubenzurón, tetradifón, tetrasul, TI-435, tolfenpirad (OMI-88), triflumurón, verbutina, vertalec (Mykotal), YI-5301.

El contenido de principio activo de las formas de aplicación preparadas a partir de formulaciones comerciales puede encontrarse de 0,00000001 a 95% en peso, preferiblemente entre 0,00001 y 1% en peso de principio activo.

El procedimiento según la invención es adecuado preferiblemente para aplicación contra todos los estados de desarrollo de organismos dañinos (huevos, todos los estados de larva como, por ejemplo, L1, L2, L3, L4 hasta adulto), particularmente en el combate de homópteros, dípteros, lepidópteros y coleópteros.

Por el término "maíz Bt", se entiende en el sentido de la invención plantas o cultivos de maíz que están modificados genéticamente de modo que contienen y expresan uno o varios genes de *Bacillus thuringiensis* que codifican y expresan una proteína insecticida eficaz.

Se prefieren las proteínas cristalinas de *Bacillus thuringiensis* de la familia Cry (véase, por ejemplo, N. Crickmore y col., *Microbiol. Mol. Biol. Rev*. 1998, 62, 807-812), que son eficaces contra lepidópteros, coleópteros y dípteros.

Se prefieren especialmente los genes que codifican las proteínas cry1Aa1, cry1Aa2, cry1Aa3, cry1Aa4, cry1Aa5, cry1Aa6, cry1Aa7, cry1Aa8, cry1Aa9, cry1Aa10, cry1Aa11 cry1Ab1, cry1Ab2, cry1Ab3, cry1Ab4, cry1Ab5, cry1Ab6, cry1Ab7, cry1Ab8, cry1Ab9, cry1Ab10, cry1Ab11, cry1Ab12, cry1Ab13, cry1Ab14, cry1Ac1, cry1Ac2, cry1Ac3, cry1Ac4, cry1Ac5, cry1Ac6, cry1Ac7, cry1Ac8, cry1Ac9, cry1Ac10, cry1Ac11, cry1Ac12, cry1Ac13, cry1Ad1, cry1Ad2, cry1Ae1, cry1Af1, cry1Ag1, cry1Ba1, cry1Ba2, cry1Bb1, cry1Bc1, cry1Bd1, cry1Be1, cry1Ca1, cry1Ca2, crylCa3, cry1 Ca4, cry1Ca5, crylCa6, cry1Ca7, cry1Cb1, cry1Cb2, cry1Da1, cry1Da2, cry1Db1, cry1Ea1, cry1Ea2, cry1Ea3, cry1 Ea4, cry1Ea5, cry1Ea6, cry1Eb1, cry1Fa1, cry1Fa2, cry1Fb1, cry1Fb2, cry1Fb3, cry1Fb4, cry1Ga1, cry1Ga2, cry1Gb1, cry1Gb2, cry1Ha1, cry1Hb1, cry1Ia1, cry1Ia2, cry1Ia3, cry1Ia4, cry1Ia5, cry1Ia6, cry1Ib1, cry1Ic1, cry1Id1, cry1Ie1, similar a cry1L, cry1Ja1, cry1Jb1, cry1Jc1, cry1Ka1, similar a cry1, cry2Aa1, cry2Aa2, cry2Aa3, cry2Aa4, cry2Aa5, cry2Aa6, cry2Aa7, cry2Aa8, cry2Aa9, cry2Ab1, cry2Ab2, cry2Ab3, cry2Ac1, cry2Ac2, cry2Ad1, cry3Aa1, cry3Aa2, cry3Aa3, cry3Aa4, cry3Aa5, cry3Aa6, cry3Aa7, cry3Ba1, cry3Ba2, cry3Bb1, cry3Bb2, cry3Bb3, cry3Ca1, cry4Aa1, cry4Aa2, cry4Ba1, cry4Ba2, cry4Ba3, cry4Ba4, cry5Aa1, cry5Ab1, cry5Ac1, cry5Ba1, cry6Aa1, cry6Ba1, cry7Aa1, cry7Ab1, cry7Ab2, cry8Aa1, cry8Ba1, cry8Ca1, cry9Aa1, cry9Aa2, cry9Ba1, cry9Ca1, cry9Da1, cry9Da2, cry9Ea1, similar a cry9, cry10Aa1, cry10Aa2, cry11Aa1, cry11Aa2, cry11Ba1, cry11Bb1, cry12Aa1, cry13Aa1, cry14Aa1, cry15Aa1, cry16Aa1, cry17Aa1, cry18Aa1, cry18Ba1, cry18Ca1, cry19Aa1, cry19Ba1, cry20Aa1, cry21Aa1, cry21Aa2, cry22Aa1, cry23Aa1, cry24Aa1, cry25Aa1, cry26Aa1, cry27Aa1, cry28Aa1, cry28Aa2, cry29Aa1, cry30Aa1, cry31Aa1, cyt1Aa1, cyt1Aa2, cyt1Aa3, cyt1Aa4, cyt1Ab1, cyt1Ba1, cyt2Aa1, cyt2Ba1, cyt2Ba2, cyt2Ba3, cyt2Ba4, cyt2Ba5, cyt2Ba6, cyt2Ba7, cyt2Ba8, cyt2Bb1.

Se prefieren especialmente las subfamilias cry1, cry2, cry3, cry5 y cry9.

Se prefieren muy especialmente las subfamilias cry1Ab, cry1Ac y cry9C.

Se prefiere además utilizar plantas que contienen genes de varias proteínas Bt.

Las plantas de cultivo transgénicas pueden presentar, además de la expresión de toxinas de *Bacillus thuringiensis* (Bt) para resistencia a insectos, también una propiedad transgénica adicional, por ejemplo, otras resistencias a insectos (por ejemplo, mediante la expresión de un inhibidor de proteasa o peptidasa, véase el documento WO-A-95/35031), resistencias a herbicidas (por ejemplo, frente a glufosinato o glifosato mediante la expresión del gen pat o bar) o también resistencias a nematodos, hongos o virus (por ejemplo, mediante la expresión de una glucanasa o quitinasa)

o también modificarse genéticamente sus propiedades metabólicas, de modo que resulte una modificación cualitativa y/o cuantitativa de los constituyentes (por ejemplo, mediante modificaciones del metabolismo de energía, hidratos de carbono, ácidos grasos o nitrógeno o de flujos de metabolitos que influyen en estos). Se prefieren, por ejemplo, plantas de maíz Bt que presentan adicionalmente una resistencia a glufosinato o glifosato.

El maíz Bt es conocido e, incluyendo procedimientos para su preparación, se describe detalladamente, por ejemplo, en lshida, Y., Saito, H., Ohta, S., Hiei, Y., Komari, T. y Kumashiro, T. (1996). "High efficiency transformation of maize (Zea mayz L.) mediated by Agrobacterium tumefaciens". *Nature Biotechnology* 4: 745-750.

El maíz Bt es obtenible comercialmente además en distintas variaciones, por ejemplo con los siguientes nombres (compañía/compañías respectivamente entre paréntesis): Knock-Out® (Novartis Seeds), NaturGard® (Mycogen Seeds), Yieldgard® (Novartis Seeds, Monsanto, Cargill, Goleen Harvest, Pioneer, DeKalb entre otras), Bt-Xtra® (DeKalb) y StarLink® (Aventis CropScience, Garst entre otras).

Se prefieren para el procedimiento según la invención los siguientes tipos de maíz Bt: KnockOut®, NaturGard®, Yieldgard®, Bt-Xtra® y StarLink®.

Existen modos de preparación de plantas transgénicas que presentan propiedades modificadas en comparación con plantas de origen natural, por ejemplo, en la aplicación de procedimientos de ingeniería genérica (véanse, por ejemplo, Willmitzer L., 1993, "Transgenic plants". en: "Biotechnology, A Multivolume Comprehensive Treatise", Rehm y col. (eds.) Vol. 2, 627-659, VCH Weinheim, Alemania; D' Halluin y col., 1992, McCormick y col. *Plant Cell Reports*, 1986, 5, 81-84, EP-A-0221044, EP-A-0131624).

Son conocidas por el experto numerosas técnicas de biología molecular con las que pueden prepararse nuevas plantas transgénicas con propiedades modificadas; véanse, por ejemplo, Sambrook y col., 1989, "Molecular Cloning, A Laboratory Manual", 2. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; o Winnacker "Gene und Klone", VCH Weinheim 2ª ed. 1996 o Christou, "Trends in Plant Science" 1 (1996) 423-431).

Para dichas manipulaciones de ingeniería genética, pueden incorporarse en plantas o células vegetales moléculas de ácido nucleico adecuadas, por ejemplo, mediante vectores adecuados que permiten una mutagénesis o una modificación de secuencia mediante recombinación de secuencias de ADN. Con la ayuda del procedimiento estándar anteriormente citado, pueden realizarse también, por ejemplo, intercambios de bases, retirarse secuencias parciales o añadirse secuencias naturales o sintéticas. Pueden sustituirse también, por ejemplo, los genes de origen natural completamente por genes heterólogos o sintéticos, preferiblemente bajo el control de un promotor activo en células vegetales ("sustitución génica"). Para la unión de los fragmentos de ADN entre sí, pueden emplearse adaptadores o ligadores en los fragmentos.

La preparación de células vegetales con una actividad reducida de un producto génico puede conseguirse, por ejemplo, mediante la expresión de al menos un ARN no codificante correspondiente, un ARN codificante para la obtención de un efecto de cosupresión o la expresión de al menos una ribozima construida correspondiente que escinde transcritos específicos del producto génico anteriormente citado

Para ello, se usan por un lado moléculas de ADN que comprenden la secuencia codificante completa de un producto génico incluyendo las secuencias flanqueantes eventualmente presentes, así como moléculas de ADN que comprenden sólo partes de la secuencia codificante, en las que estas partes deben ser suficientemente largas para ejercer en las células un efecto no codificante. Es también posible el uso de secuencias de ADN que presentan un alto grado de homología con las secuencias de codificación de un producto génico, pero no son completamente idénticas.

En la expresión de moléculas de ácido nucleico en plantas, la proteína sintética puede localizarse en cualquier compartimento de la célula vegetal. Pero para alcanzar la localización en un compartimento determinado, puede ligarse, por ejemplo, la región codificante con secuencias de ADN que garanticen la localización en un compartimento determinado o en un momento determinado (en un estado determinado o inducido química o biológicamente) (por ejemplo, péptido de tránsito o señal, promotores específicos de tiempo o lugar). Dichas secuencias son conocidas por el experto (véanse, por ejemplo, Braun y col., *EMBO J*. 11 (1992), 3219-3227; Wolter y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 (1988), 846-850; Sonnewald y col., *Plant J*. 1 (1991), 95-106).

Las células vegetales transgénicas pueden regenerarse según técnicas conocidas hasta plantas enteras.

De este modo, son obtenibles plantas transgénicas que presentan propiedades modificadas mediante la sobreexpresión, supresión o inhibición de genes o secuencias génicas homólogos (es decir endógenos) o la expresión de genes o secuencias génicas heterólogos (o exógenos).

El procedimiento según la invención es adecuado para combatir una pluralidad de organismos dañinos que aparecen particularmente en maíz, particularmente insectos, arácnidos y helmintos, con muy especial preferencia insectos y arácnidos. Pertenecen a las plagas mencionadas:

Del orden de los *Acarina,* por ejemplo, *Acarus siro, Argas spp., Ornithodoros spp., Dermanyssus gallinae, Eriophyes ribis, Phyllocoptruta oleivora, Boophilus spp., Rhipicephalus spp., Amblyomma spp., Hyalomma spp., Ixodes spp.,*

Psoroptes spp., Chorioptes spp., Sarcoptes spp., Tarsonemus spp., Bryobia praetiosa, Panonychus spp., Tetranychus spp., Eotetranychus spp., Oligonychus spp., Eutetranychus pp..

Del orden de los *Isopoda*, por ejemplo, *Oniscus asselus, Armadium vulgar, Porcellio scaber*.

Del orden de los *Diplopoda*, por ejemplo, *Blaniulus guttulatus*.

Del orden de los *Chilopoda*, por ejemplo, *Geophilus carpophagus, Scutigera spp.*.

Del orden de los *Symphyla* por ejemplo, *Scutigerella immaculata*.

Del orden de los *Thysanura*, por ejemplo, *Lepisma saccharina*.

Del orden de los *Collembola*, por ejemplo, *Onychiurus armatus*.

Del orden de los *Orthoptera*, por ejemplo, *Blatta orientalis, Periplaneta americana, Leucophaea madeirae, Blatella germanica, Acheta domesticus, Gryllotalpa spp., Locusta migratoria migratorioides, Melanoplus differentialis, Schistocerca gregaria*.

Del orden de los *Isoptera*, por ejemplo, *Reticulitermes spp.*.

Del orden de los *Anoplura*, por ejemplo, *Phylloera vastatrix, Pemphigus spp., Pediculus humanus corporis, Haematopinus spp., Linognathus spp.*.

Del orden de los *Mallophaga*, por ejemplo, *Trichodectes pp., Damalinea spp.*.

Del orden de los *Thysanoptera*, por ejemplo, *Hercinothrips femoralis, Thrips tabaci*.

Del orden de los *Heteroptera*, por ejemplo, *Eurygaster spp., Dysdercus intermedius, Piesma quadrata, Cimex lectularius, Rhodnius prolixus, Triatoma spp.*.

Del orden de los *Homoptera*, por ejemplo, *Aleurodes brassicae, Bemisia tabaci, Trialeurodes vaporariorum, Aphis gossypii, Brevicoryne brassicae, Cryptomyzus ribis, Doralis fabae, Doralis pomi, Eriosoma lanigerum, Hyalopterus arundinis, Macrosiphum avenae, Myzus spp., Phorodon humuli, Rhopalosiphum padi, Empoasca spp., Euscelus bilobatus, Nephotettix cincticeps, Lecanium corni, Saissetia oleae, Laodelphax striatellus, Nilaparvata lugens, Aonidiella aurantii, Aspidiotus hederae, Pseudococcus spp., Psylla spp.*.

Del orden de los *Lepidoptera*, por ejemplo, *Pectinophora gossypiella, Bupalus piniarius, Cheimatobia brumata, Lithocolletis blancardella, Hyponomeuta padella, Plutella maculipennis, Malacosoma neustria, Euproctis chrysorrhoea, Lymantria spp., Bucculatrix thurberiella, Phyllocnistis citrella, Agrotis spp., Euxoa spp., Feltia spp., Earias insulana, Heliothis spp., Helicoverpa spp.,_Laphygma exigua, Mamestra brassicae, Panolis flammea, Prodenia litura, Spodoptera spp., Trichoplusia ni, Carpocapsa pomonella, Pieris spp., Chilo spp., Pyrausta nubilalis, Ephestia kuehniella, Galleria mellonella, Cacoecia podana, Capua reticulana, Choristoneura fumiferana, Clysia ambiguella, Homona magnanima, Tortrix viridana, Ostrinia nubilalis, Bombyx obsoleta*.

Del orden de los *Coleoptera*, por ejemplo, *Anobium punctatum, Rhizopertha dominica, Bruchidius obtectus, Acanthoscelides obtectus, Hylotrupes bajulus, Agelastica alni, Leptinotarsa decemlineata, Phaedon cochleariae, Diabrotica spp., Psylloides chrysocephala, Epilachna varivestis, Atomaria spp., Oryzaephilus surinamensis, Anthonumus spp., Sitophilus spp., Otiorrhynchus sulcatus, Cosmopolites sordidus, Ceuthorrynchus assimilis, Hypera postica, Dermestes spp., Trogoderma, Anthrenus spp., Attagenus spp., Lyctus spp., Meligethes aeneus, Ptinus spp., Niptus hololeucus, Gibbium psylloides, Tribolium spp., Tenebrio molitor, Agriotes spp., Conoderus spp., Melolontha melolontha, Amphimallon solstitialis, Costelytra zealandica*.

Del orden de los *Hymenoptera*, por ejemplo, *Diprion spp., Hoplocampa spp., Lasius spp., Monomorium pharaonis, Vespa spp.*

Del orden de los *Diptera*, por ejemplo, *Aedes spp., Anopheles spp., Culex spp., Drosophila melanogaster, Musca spp., Fannia spp., Calliphora erythrocephala, Lucilia spp., Chrysomyia spp., Cuterebra spp., Gastrophilus spp., Hypobosca spp., Stomoxys spp., Oestrus spp., Hypoderma spp., Tabanus spp., Tannia spp., Bibio hortulanus, Oscinella frit, Phorbia spp., Pegomyia hyoscyami, Ceratitis capitata, Dacus oleae, Tipula paludosa*.

Del orden de los *Siphonaptera*, por ejemplo, *Xenopsylla cheopsis, Ceratophyllus spp.*

Del orden de los *Arachnida*, por ejemplo, *Scorpio maurus, Latrodectus mactans*.

De la clase de los helmintos, por ejemplo, *Haemonchus, Trichostrongulus, Ostertagia, Cooperia, Chabertia, Strongyloides, Oesophagostomum, Hyostrongulus, Ancylostoma, Ascaris* y *Heterakis* así como *Fasciola*.

Es preferiblemente adecuado el procedimiento según la invención para combatir *Heliothis spp., Helicoverpa spp., Prodenia litura, Spodoptera spp., Chilo spp., Ostrinia nubilalis, Bombyx obsoleta* y *Diabrotica spp.*.

La invención se ilustra detalladamente mediante el siguiente ejemplo, sin limitarla por ello.

Ejemplo

Se prueba un efecto sinérgico pulverizando manualmente plantas de maíz Bt de dos semanas respectivamente con el principio activo deseado en dosificaciones que se encuentran por debajo de las dosificaciones recomendadas. El volumen de inyección corresponde en este sentido a 400 l/ha. Después del secado, se infectan las plantas con huevos del barrenador del maíz *Ostrinia nubilalis*, que ataca el tallo del maíz (edad de los huevos: 2 a 3 días). Se cultivan las plantas en invernadero a 23ºC. Se realiza la evaluación de los daños de la infestación cuatro semanas después de la aplicación de la inyección.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para combatir organismos dañinos en plantas de maíz modificadas por ingeniería genética que contienen un gen derivado de *Bacillus thuringiensis* que codifica una proteína insecticida eficaz y expresa ésta, **caracterizado** porque se aplica una cantidad insecticida eficaz sinérgica de metiocarb sobre las plantas, su producto de siembra o propagación y/o su superficie de cultivo.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque la proteína insecticida eficaz en la planta de maíz es una proteína cristalina de la subfamilia cry1, cry2, cry3, cry5 y/o cry9.

3. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, **caracterizado** porque se usan plantas de maíz que presentan resistencia a glufosinato o glifosato.

4. Procedimiento según una o varias de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** porque se utilizan además de metiocarb uno o varios compuestos insecticidas, fungicidas o herbicidas eficaces adicionales.

5. Procedimiento según la reivindicación 2, **caracterizado** porque la proteína insecticida eficaz en la planta de maíz es cry1Ab, cry1Ac y/o cry9C.

6. Uso de metiocarb para combatir organismos dañinos en sinergia con plantas de maíz modificadas por ingeniería genética que contienen un gen derivado de *Bacillus thuringiensis* que codifica una proteína insecticida eficaz y expresa ésta.