

FORMULACIÓN BIOLÓGICA OBTENIDA A PARTIR DE *Beauveria bassiana* y *Trichoderma viride* PARA EL CONTROL DE LA HORMIGA ARRIERA (*Atta cephalotes*)

5 RESUMEN DE LA INVENCIÓN

La presente invención divulga un insecticida de tipo biológico para el control de la infestación de de la hormiga arriera (*Atta cephalotes*), que comprende esporas aisladas de presentaciones comerciales (2×10^9 esporas/mL) de *Beauveria bassiana* y *Trichoderma viride* suspendidas en solución acuosa que contiene
10 Twen20, sorbitol, Sacarina sódica, Benzoato de sodio, Ácido cítrico, Metilparabeno y Ciclamato de sodio.

15

20

25

30

35

FORMULACIÓN BIOLÓGICA OBTENIDA A PARTIR DE *Beauveria bassiana* y *Trichoderma viride* PARA EL CONTROL DE LA HORMIGA ARRIERA (*Atta cephalotes*)

5 CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se relaciona con el campo del control biológico de las plagas e infestaciones causadas por insectos, en particular de la especie himenóptera *Atta cephalotes*.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Las hormigas cortadoras de hojas (*Atta cephalotes*) están consideradas entre las plagas más destructivas en Colombia, por sus hábitos alimenticios destruyen cultivos maderables y foliares generando grandes pérdidas económicas. Por las condiciones del suelo y la práctica agrícola en Colombia se propician los ataques de la hormiga arriera, principalmente en los departamentos de Santander, Antioquia, Cundinamarca, Cauca y Valle del Cauca, en donde se cultiva yuca, cítricos, café, frutales, pastos y árboles forestales, entre otros,

Las actividades para el control de la hormiga arriera han tenido serios inconvenientes debido al hábito alimenticio de los insectos, el cual, está basado en láminas foliares que trasladan a sus hormigueros. Los últimos estudios revelan que un hormiguero adulto puede consumir entre 50 y 150 kilos de hojas por día y las pérdidas podrían exceder los 1000 millones de dólares anuales en Norte y Sur América.

Tradicionalmente, el empleo de plaguicidas químicos ha solucionado los problemas causados por las infestaciones. Su uso, aunque efectivo, concibe ciertos inconvenientes como la baja especificidad contra las plagas, hecho éste que conlleva al favorecimiento del desarrollo de poblaciones de insectos resistentes. Esta situación ha alentado a los investigadores a buscar productos cada vez más sofisticados, los cuales generalmente resultan más tóxicos para el hombre y el medio ambiente donde se aplican.

La creciente necesidad de reducir el uso de agroquímicos para el control de plagas en la agroindustria hace cada vez más necesario desarrollar alternativas de control compatibles con el medio ambiente y que aseguren la sostenibilidad del mismo, entre las que se encuentra el uso de hongos entomopatógenos para el control de la hormiga cortadora de hojas.

Una alternativa al uso de pesticidas es el control biológico de plagas. El control biológico, o biocontrol, se vale de los enemigos naturales de la peste para el control de sus poblaciones. Por ejemplo, se han usado hongos que son patógenos de insectos para el control de insectos indeseados, tales como se divulga en las solicitudes de patente W09102051 , W09424871 WO9525430, WO0228189, WO2006121350 y WO2004052103, y en las patentes US7951389 y US6403085. La utilización de hongos que son patógenos de otros hongos se discute en WO016974 y WO09618722 A2, las cuales usan cepas de *Trichoderma* para combatir hongos fitopatógenos. Sin embargo, el control biológico requiere normalmente la exposición repetida del organismo blanco a su patógeno, y el mecanismo de rechazo retardado hace particularmente inadecuado el uso de cebos como portadores en los métodos de control biológico de hormigas cortadoras por su capacidad asociativa y de memoria.

Los hongos *Beauveria bassiana* y *Trichoderma* han sido utilizados como enemigos naturales de muchos patógenos causantes de enfermedades en las plantas entre ellos, los zompopos (hormigas cortadoras de hojas de los Géneros *Atta* y *Acromyrmex* pertenecen al Orden Hymenoptera familia: Formicidae).

Los patógenos de insectos son una alternativa posible al uso generalizado de insecticidas químicos de alta toxicidad para controlar plagas de insectos y el hongo *Beauveria bassiana* ha sido estudiada durante más de 100 años y no se conoce de ningún efecto tóxico sobre animales domésticos ni silvestres, aves y peces, con la excepción de su acción patogénica contra los insectos. Estudios realizados de inocuidad de este entomopatógeno sobre conejos y ratones fueron: irritación ocular y dermal, toxicidad aguda y dermal; toxicidad por inhalación y sensibilización. Su impacto contribuye a la disminución de las plagas. Entorno no se ve afectado debido a que no daña el medio ambiente. No es tóxico para los animales de sangre caliente. Puede cosecharse los productos agrícolas inmediatamente después de aplicado el medio biológico (Pérez s.f.).

Respecto a los hongos *Trichoderma*, son hongos que se encuentran en forma natural en casi todos los suelos y otros hábitats del planeta. Algunas cepas son componentes importantes de la rizosfera, incrementa la cantidad de micelio, aumenta la biomasa, actúa mediante la ruptura de paredes hifales del hongo parasitado, lo penetra con sus hifas y aprovechan los nutrientes de este y rompe sus hifas causando efecto micoparasítico. A su vez produce toxinas (trichodermin y harzianopiridona) causando antagonismo por fungistasis sobre el hongo y produce enzimas de tipo lítico que destruyen las paredes celulares de la estructura de resistencia del hongo (Harman 2003).

Hasta el momento, la mayoría de los trabajos de evaluación de hongos entomopatógenos para control biológico de plagas de insectos se ha concentrado en aplicaciones relativas a plagas de insectos y mosquitos de gran relevancia en la agricultura y los *Beauveria bassiana* y *Trichoderma* ha sido uno de los más estudiados.

Dentro de la literatura de patentes se encuentra el documento US 7,241,612 que describe métodos y materiales para el control de insectos y plagas tipo coleópteros. La publicación hace referencia a una composición biopesticida para el control de insectos como gorgojos que contiene un portador agrícolamente aceptable y una cantidad efectiva de un hongo capaz de inhibir y controlar el crecimiento de los insectos. El hongo con capacidad biopesticida se selecciona entre las especies *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* (cepa NRRL 30594) y contempla la incorporación de agentes que atraigan los insectos tales como feromonas que pueden enviar señales de interés sexual y otros estimulantes del apetito, como parte de los ingredientes de las formulaciones biopesticidas.

En el documento se señalan los resultados de los ensayos de virulencia con el fin de determinar el efecto causado por aislados de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* sobre la integridad de los insectos. En particular, se divulga un ensayo sobre larvas de gorgojo, en el cual cultivos del insecto fueron sometidos a la acción de soluciones de adiciones biopesticidas que contenían entre 0,5ml y 1,4 ml de agua y 0,05% de Tween 80 y aplicaciones del hongo a razón de 7,950 conidias por cm². No obstante, en la publicación se determina que dada la mortalidad elevada de las conidias, producto del medio y vehículo utilizado fue necesario aumentar su concentración a 15900 conidias por cm². Los resultados demostraron que en las copas sometidas a concentraciones de 10⁶ esporas se causó la mayor mortalidad de insectos y que la especie *Metarhizium anisopliae* generó numéricamente un mayor número de muertes que la especie *Beauveria bassiana*.

El documento US 4,925,663 hace referencia al control biológico de hormigas de fuego mediante la utilización de hongos patógenos de la especie *Beauveria bassiana* No 447, depósito ATCC 2087, la publicación revela un nuevo biopesticida usado para el control de plagas mediante pulverización o atomización sobre áreas infectadas. Se desarrolló una suspensión del hongo que contiene de 1,0 x 10⁷ a 1,0 x 10⁹ esporas por mililitro de agua y dos gotas de Tween® por litro de formulación, la suspensión fue aplicada sobre hormigas de laboratorio y el Tween® actuó como agente humectante. A varios grupos de 10 hormigas se les aplicó la suspensión por atomización en intervalos de 1 a 2 segundos a una presión de 15 psi, la suspensión aplicada de esta manera eliminó del 90 al 100%

de las hormigas dentro de un periodo subsecuente de aplicación continua de 3 a 10 días.

OBJETOS DE LA INVENCION

En un primer aspecto, la invención proporciona un insecticida de tipo biológico, basado en la acción entomopatógena de los hongos *Beauveria bassiana* y *Trichoderma viride*.

En un segundo aspecto, la invención proporciona un método de control, amigable con el ambiente, el cual reduce los aspectos dañinos presentados por la utilización de agentes químicos, adicionalmente reduce la probabilidad de la aparición de resistencia al insecticida al emplear dos principios activos (*Beauveria bassiana* y *Trichoderma viride*).

DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

La Figura 1 enseña los resultados de viabilidad de las formulaciones evaluadas, en los cuales se observa la prueba de viabilidad para 24 y 48 horas de las diferentes formulaciones. Se puede observar el crecimiento (la colación verde), correspondiente a *Trichoderma viride*.

La Figura 2 muestra los resultados de la Prueba de viabilidad en Agar nutritivo, en vista microscópica, a un aumento de 40X, en donde se evidencia las esporas e hifas presentes en el medio, (a la derecha se observa la germinación).

La Figura 3 muestra los resultados de la Prueba de patogenicidad. Se observa la muerte e infección, ocurrida tras la exposición a las formulaciones, (nótese el crecimiento del hongo, visto como una estructura de aspecto algodonoso y de color blanco, el cual corresponde a las hifas de los hongos).

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención incorpora una novedosa formulación bioinsecticida que permite la aplicación coherente y comercialmente viable sobre las áreas afectadas por insectos, en especial de la hormiga arriera (*Atta cephalotes*), infectando las zonas ocupadas por la hormiga, lo cual, permite garantizar al momento de la inoculación del hongo, un mecanismo de dispersión ampliamente efectivo al interior de la población de hormigas que se encuentran en crecimiento, generando en consecuencia un control y manejo biológico seguro y permanente.

Teniendo en cuenta que las formulaciones de conidios consisten en formulaciones agrícolamente activas de un insecticida biológico a partir de los hongos *Beauveria bassiana* y *Trichoderma* para el control de la hormiga arriera (*Atta cephalotes*), se ha señalado que el punto crítico del control efectivo se debe a la selección del vehículo adecuado y a la formulación agrícolamente efectiva de los hongos. Este es el proceso mediante el cual el ingrediente activo, es decir las conidias de los hongos, se mezclan con materiales inertes, tales como vehículos, solventes, emulsificantes y otros aditivos que garantizan la permanencia del activo biológico sobre el área infestada.

En estas condiciones, la presente invención incorpora una formulación agrícolamente activa de los principios activos mediante una solución acuosa que contiene Twen20, sorbitol, Sacarina sódica, Benzoato de sodio, Ácido cítrico, Metilparabeno y Ciclamato de sodio, lo cual, permite la adherencia de las esporas al cuerpo de la hormiga, fijándose a la cutícula del blanco, segregando proteasas que digieren dicha cutícula, para luego infectar el hemocoele, produciendo la muerte del organismo por producción de toxinas como Beauvericina, entre otras.

El bioinsecticidad para el control de la hormiga arriera (*Atta cephalotes*) comprende esporas de los hongos *Beauveria bassiana*, American Type Culture Collection cepa ATCC-MYA#4886 y *Trichoderma viride*, American Type Culture Collection cepa ATCC 8751, los cuales están presentes en la solución, cada uno a una concentración de 2×10^9 esporas/mL, a una relación de 60% a 40% respectivamente.

Además, la solución contiene 5% de Twen20, 5% de sorbitol, 5% de Sacarina sódica, 5% de Benzoato de sodio, 1% de Ácido cítrico, 5% de Metilparabeno y 5% de Ciclamato de sodio.

El asilamiento se realizó a partir de soluciones a concentración de 5×10^7 conidios/ μ L y 4×10^3 conidias/ μ L, de *Beauveria bassiana* y *Trichoderma viride* respectivamente, en medio YPDA (Sigma aldrich ®), este medio contenía los siguientes reactivos en (500 mL):

- Peptona 10 gr
- Extracto de levadura 5 gr
- Glucosa 10 gr
- Agar 7.5 gr
- Agua destilada estéril 500 mL

El medio se calentó hasta ebullición y se sometió a esterilización en autoclave (SA232V Sturdy Zhongxing Rd., Wugu Dist., New Taipei). La solución se enfrió y se llevó a cabina de flujo laminar, donde se vertió 10 mL en cajas de petri, dejando solidificar.

Para *Beauveria bassiana* se sembraron 10 μ L, 20 μ L y 30 μ L, de la solución y para *Trichoderma viride* 250 μ L y 500 μ L, las soluciones se homogenizaron en la superficie del agar empleando asa de vidrio, sellándose con cinta parafilm. Cada muestra se sembró por triplicado y se empleó un control negativo (este consistió en el medio); seguidamente, las muestras se incubaron a 30°C (incubadora Thermo Scientific) colocándolas de forma invertida.

El crecimiento se evaluó cada 24 horas. Se observó crecimiento fúngico a partir del octavo día de incubación. Se presentaron crecimientos axenicos, donde el crecimiento fue más rápido en *Trichoderma viride* al ser comparado *Beauveria bassiana*.

El proceso de identificación se realizó a nivel macroscópico (detalles de la colonia) y a nivel microscópico (detalle del micelio). A nivel macroscópico los crecimientos fueron compatibles con la descripción morfológica que aparece en la literatura científica de referencia para cada especie (Figura 2). La identificación microscópica se realizó mediante la tinción con lactofenol, para esto se tomó una cinta adhesiva transparente y se colocó en la superficie de hongo, adhiriendo una gran cantidad de hifas y micelios propios del hongo filamentoso. Seguidamente se colocó en un portaobjetos que contenía 10 μ L de azul de lactofenol, dejando secar y observando a microscopio a 40X. A partir de la microscopía clásica se corroboró a partir de las estructuras fúngicas: micelio, tipos de hifas y esporangios, la identificación de los hongos empleados.

La colonia *Trichoderma viride* presentó un crecimiento rápido, presentando la colonia un aspecto polvoroso, de color inicial blanco, que se torna verde (como se observa en el centro de la fotografía A), la textura es blanda con gránulos y superficie plana.

La colonia de *Beauveria bassiana* presentó un crecimiento lento y de forma circular. Esta colonia presentó un aspecto felpudo, textura blanda y de superficie plana, se presenta de color blanco en su fase inicial de crecimiento, lo cual concuerda con lo descrito por Domsch et al, (1993).

Identificadas las especies fúngicas, se procedió a realizar crecimiento y obtención de esporas, para lo cual se tomó 1 cm², del medio y se depositó en medio YPD (previamente esterilizado), el cual contenía:

- Peptona 7 gr
- Extracto de levadura 3.5 gr
- Glucosa 7 gr
- Agua destilada estéril 350 mL

El medio se calienta hasta ebullición y se sometió a esterilización en autoclave (SA232V Sturdy Zhongxing Rd., Wugu Dist., New Taipei), la solución se enfrió. Se prepararon 4 viales de 350 mL, dos para cada hongo. El medio se incubó en baño maría con agitación constante 120 rpm (Memmert®), a 30°C durante 7 días.

Finalizado el crecimiento se realizó el conteo de conidios de los hongos *Beauveria bassiana* y *Trichoderma viride*. Finalizado el crecimiento, se tomó 10 µL del medio y se mezcló con 3 µL de azul de lactofenol, para su posterior conteo de conidios el cual fue realizado por conteo en cámara de Neubauer (Figura 3) empleando la formula $(cel / \mu L) = \frac{\#Células \times 4 \times 10^6}{\#Cuadros}$.

Las soluciones se depositaron en tubos falcon de 50 mL, centrifugándose a 7500 rpm por 10 min, para separar las esporas del medio. Este proceso se repitió con la totalidad del medio, seguidamente se adicionó agua estéril, agitando y realizando conteo y ajustando las soluciones a concentración de 2x10⁹ esporas/mL para cada especie fúngica.

Este procedimiento fue repetido con una modificación, la cual consistió en cambiar el fragmento de medio con el hongo crecido, con 1ml de la solución con esporas de cada hongo, para iniciar el crecimiento. En cada etapa de crecimiento se sembró las esporas en medio YPGA, con el objetivo verificar las especie fúngica y descartar contaminación.

Para el análisis de la formulación con mayor efectividad se planearon las siguientes formulaciones, donde cada hongo presento una concentración de 2x10⁹ conidios/mL:

- Formulación A: (50%:50%) *Trichoderma viride* : *Beauveria bassiana*
- Formulación B: (60%:40%) *Trichoderma viride*: *Beauveria bassiana*
- Formulación C: (40%:60%) *Trichoderma viride*: *Beauveria bassiana*
- Formulación D: (30%:70%) *Trichoderma viride*: *Beauveria bassiana*
- Formulación E: (20%:80%) *Trichoderma viride*: *Beauveria bassiana*

Cada formulación se presentó en un volumen de 30 mL, y cada una se le adicionó 5% de Twen20, 5% de sorbitol, 5% de Sacarina sódica, 5% de Benzoato de sodio, 1% de Ácido cítrico, 5% de Metilparabeno y 5% de Ciclamato de sodio

Con cada una de estas formulaciones se realizaron las pruebas que se detallan a continuación.

Prueba de viabilidad

La prueba se realizó una caja de petri de 10 cm de diámetro que contendrá Agar nutritivo, el cual contiene:

- Extracto de levadura 10 gr

- Peptona 2.5 gr
- CLNa 2.5 gr
- Agar-Agar 7.5 gr
- Agua destilada 500 mL

El medio fue calentado hasta ebullición, esterilizado en autoclave, llevado a cámara C4 y servido en caja de petri; en la superficie de este medio se depositó 5 µL de la formulación, en 9 puntos, los cuales consistirán en 20 (dilución de 1 en 20), 4 (dilución 1/4 en 4) y pura (formulación pura) (Figura 3)

La prueba de viabilidad en la caja de Petri dió como resultado el crecimiento a 24, horas de la totalidad de las formulaciones, en sus diferentes diluciones 20 (1 en 20), 4 (1 en 4) y formulación pura. No se observó crecimiento en la caja designada como control (Figura 1).

Adicionalmente en portaobjetos se adicionó 1 mL de Agar nutritivo, en el cual se inoculó 5 µL de las formulaciones, esta se incubó a 30°C por 24 h, seguidamente se observó el crecimiento y el porcentaje de germinación.

La viabilidad como germinación se observó a 40X, donde se puede identificar la germinación de la espora y la hifa saliente de ésta (Figura 2)

Al evaluar la viabilidad como porcentaje de germinación de la esporas , en un área escogida al azar de la placa se observó que en promedio el 90 % , el crecimiento a nivel macroscópico fue del 100%, ya que en todas las cajas petri y en las diferentes diluciones se observó crecimiento, tal como se detalla en la Tabla 1:

Formulación	Crecimiento 24 H en caja	Crecimiento en placa 24 H	%
A	Si	Si	90
B	Si	Si	92
C	Si	Si	90
D	Si	Si	90
E	Si	Si	90
Control	No	No	0

Tabla 1. Resultados de viabilidad de las formulaciones

Prueba de Patogenicidad.

Esta prueba se realizó mediante inmersión. Para esto, se tomaron 10 (hormigas) las cuales se desinfectaron en solución de Hipoclorito de sodio al 0,5% durante 5 minutos, posteriormente se lavaron con agua destilada. Seguidamente cada individuo se sumergió en cada una de las formulaciones, depositándoles en caja de vidrio con papel y fuente de humedad (agua destilada); se mantuvo una temperatura de 25°C y humedad relativa del 90%. Se tomó la temperatura diariamente al igual que la humedad relativa, se registraron el número de hormigas muertas diariamente.

Las formulaciones que presentaron mayor letalidad, medida como la muerte de la totalidad de los individuos en menor tiempo fueron las formaciones Ay B, seguidas en el orden por la formulación E, D y C, donde se observó la muerte de la totalidad de las hormigas a los días 6, 8, 10 y 11 respectivamente, también se presentaron decesos en el control, por lo cual , se dejaron en medio humedecidos para observar el crecimiento fúngico (Figura 5), el cual se presentó en la totalidad de la hormigas expuestas a las diferentes formulación pero no en las incluidas como grupo control, según se expone en la Tabla 2:

Formulaciones	N	Número de hormigas vivas por día											crecimiento fúngico
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
A	10	1	1	4	1	1	2						100%
B	10	1	1	1	2	3	2						100%
C	10	0	0	0	0	1	2	1	2	2	1	1	100%
D	10	0	0	2	2	1	1	1	0	1	2		100%
E	10	0	1	2	3	0	1	2	1				100%
Control	10	0	0	0	4	0	0	0	3	0	2	1	No

Tabla 2. Prueba de patogenicidad en laboratorio de las Formulaciones

Prueba de pureza.

Esta prueba se realizó en medio SDA, en el cual se depositaron diluciones de 10³ de cada una de las formulaciones, se incubaron a 30°C y se observó el crecimiento de las colonias fúngicas durante 10 días, el medio SDA está constituido por:

- Pluripeptona 5gr
- Glucosa 20gr
- Cloranfenicol 0.025gr
- Agar 7.5gr
- Agua destilada estéril 500mL

El medio fue calentado hasta ebullición, esterilizado en autoclave, llevado a cámara C4 y servido en caja de Petri. En cada caja se adicionó 100 µL de las formulaciones y se homogenizó sobre las superficie mediante haza de vidrio, en esta prueba se determinó la pureza de las formulaciones, evaluando la aparición de otras especies durante 10 días de observación.

La prueba de pureza se realizó en dos estancias; en la primera, a las soluciones de esporas de *Beauveria bassiana* y *Trichoderma viride* a partir de las cuales se realizaron las diferentes formulaciones, esto con el objetivo de observar de descartar contaminación en cada una de las fuentes, no se observó contaminación o crecimiento de otra especie en ninguno de los dos casos.

En la prueba de pureza, a partir de las soluciones iniciales de cada uno de los hongos, se realizaron las diferentes combinaciones que dieron origen a las diferentes formulaciones ya explicadas. No se observó contaminación en ninguna de las soluciones.

La segunda estancia se realizó para cada una de las formulaciones, en las cuales en términos de días, no se observó presencia de otra especie fúngica. Es de notar que, según la relación en los hongos, se observó el crecimiento mayor o menor de una especie en particular. Un caso es la formulación B, en la cual se observa la dominancia de la especie *Trichoderma viride* y pequeños bordes asociados a *Beauveria bassiana*, en el caso de las otras formulaciones se observa segmentos de color verde como es el caso de las formulaciones A,C,D y E, los cuales se reducen en relación a la relación de *Trichoderma viride* en la formulaciones.

En ninguna de las formulaciones se observó contaminación o crecimiento de otro agente fúngico, a los empleados en éstas.

Aunque la presente invención se ha descrito mediante las realizaciones preferentes mostradas no limitativas de la invención, queda entendido que las modificaciones y variaciones que conserven su contenido esencial y elemental se entienden dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

