

FORMULACIÓN PARA EL CONTROL BIOLÓGICO DE LA MOSCA BLANCA
(*ALEUROTRACHELUS SOCIALIS* Y *BEMISIA TABACI*) QUE COMPRENDE LOS
5 HONGOS *BEAUVERIA BASSIANA*, *TRICHODERMA VIRIDE* Y *METARHIZIUM*
ANISOPLIAE

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se relaciona con el campo técnico del control biológico de las
10 pestes e infestaciones causadas por insectos, en especial para el control biológico
de la mosca blanca (*Aleurotrachelus socialis* y *Bemisia tabaci*).

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Las moscas blancas son insectos diminutos de 2 a 3mm de longitud que se
15 asemejan a pequeñas polillas. Los adultos de ambos sexos son alados y las alas
están cubiertas con un polvillo blanco (Borrór *et al.* 1992), pertenecen al orden
Homóptera, suborden Sternorhyncha, familia Aleyrodidae, que se divide en 2
subfamilias: Aleurodicinae y Aleyrodinae (Borrór *et al.* 1992). La subfamilia
Aleurodicinae, es la más primitiva, sus individuos se caracterizan por la presencia
20 de secreciones de cera en forma de filamentos dorsales o algodonosas. Los adultos
son grandes, con tres o cuatro venas en las alas, se alimentan succionando savia
elaborada de árboles y arbustos. La subfamilia Aleyrodinae es la más evolucionada,
sus ninfas se caracterizan por presentar secreciones largas y dorsales, de color
transparente, amarillo o negro y se alimentan principalmente de plantas herbáceas
25 (Caballero, 1992). La familia Aleyrodidae, cuenta con 126 géneros que comprenden
1156 especies y es la más ampliamente distribuida (Castillo, 1996).

Otra característica importante es que son insectos diminutos con grandes alas
blancas, que ha vivido con los cultivos alimenticios durante siglos. Entre los cultivos
más afectados por esta plaga están la yuca, la batata, el fríjol, el tomate, el ají, la
30 papa, la berenjena, el calabacín y el melón, aunque se calcula en más de cincuenta
las cultivables a las que ataca esta plaga.

Una de las especies que causa mayores daños en el cultivo de la yuca en la parte
norte de Sudamérica es *Aleurotrachelus socialis* y *Bemisia Tabaci*, entre los
síntomas del daño que causa se encuentran los siguientes: encrespamiento de las
35 hojas apicales, amarillamiento y necrosis de las hojas basales y el retardo en el
desarrollo de la planta.

Los adultos de mosca blanca son con frecuencia observados sobre el envés de las hojas apicales, donde se alimentan de los fluidos de la planta y ovipositan. La miel excretada es un sustrato para el desarrollo de un hongo llamado “fumagina”, el cual interfiere con la fotosíntesis del vegetal.

- 5 Mcauslane, H. (2000), argumenta que en América, *B. tabaci* afecta al menos 23 cultivos, desde el sur de los Estados Unidos hasta Argentina y en todos los países del Caribe. En zonas neotropicales, estos incluyen frutales, hortalizas y ornamentales de gran importancia nutricional y económica tales como melón, sandía, uva, tomate, pepino, habichuela, frijol, papa, maní, algodón, soya, 10 crisantemo y poinsettia (p.5). Un análisis realizado por, Gerling, a. (s.f) en los Estados Unidos concluyo que “*B. tabaci* ha causado pérdidas anualmente por más de US \$ 500 millones en la producción agrícola de USA, durante los últimos 15 años” (p. 134). No obstante, a las pérdidas per se debe sumarse el aumento en los costos de producción, debidos 13 sobre todo al uso de insecticidas, según Rendón, 15 f.; Cardona, c.; bueno, j. M. (2001),

Un diagnóstico realizado en Colombia reveló que los productores hacen 12 o más aplicaciones de insecticidas, con 32 diferentes ingredientes activos (40% de organofosforados, 11% de carbamatos, 12% de piretroides y 29% de insecticidas de nueva generación). Así mismo, el 46% de los agricultores encuestados abandonó 20 su cultivo alguna vez, por las pérdidas, y cerca del 40% tuvo pérdidas de 50-100%.(p.39) Rendón, f.; & otros (2001), afirman que “*B. tabaci* ha demostrado en algunas zonas ser resistente a varios de los insecticidas usados para su control”(p.41), es así como el control biológico se presenta como una de las alternativas más promisorias dentro de los programas de Manejo Integrado de 25 Plagas (MIP), soportados por los éxitos hasta ahora logrados y en el avance en conocimiento básico sobre los tres principales grupos de enemigos naturales: parasitoides, depredadores y hongos entomopatógenos

El control de esta mosca sobre los cultivos ha sido sin duda uno de los retos más difíciles que han enfrentado los cultivadores. Los agricultores intensifican el uso de 30 insecticidas; sin embargo, la mosca blanca desarrolla resistencia a ellos (esta plaga tiene la capacidad de adaptarse a nuevos cultivos y de encontrar nuevos hospederos), lo que aumenta los costos de producción y genera un severo peligro para el medio ambiente y para la salud (www.cgiar.com.co).

El Applaud es uno de los agroquímicos más comúnmente usado por los agricultores 35 para el control de la mosca blanca, sin embargo este es de muy baja eficiencia ya que solo ataca algunos instares ninfales de la mosca, no teniendo algún efecto sobre los adultos. Además este insecticida es nocivo para organismos acuáticos y genera nubes altamente inflamables (www.agricola.espanet.com/applaud).

El manto es una técnica usada para el control del insecto, este consiste en tomar una gran manta de plástico y embadurnarla con melaza o aceite y luego pasearla entre el cultivo afectado esperando capturar en ella la mayor cantidad de moscas posible. Este es un método poco eficiente, que aunque disminuye un poco la población de insectos, no tiene algún efecto sobre los huevos o el hongo fumagina ubicada en el envés de las hojas (www.cepes.org.pe/revista/r-agra28/moscablanca).

Wraight, S.& otros (2000), argumentaron que los hongos *Paecilomyces* spp, *metharizum anisoplae*, *Beauveria bassiana* y *thicoderma lignorum*, han sido reconocidos como agentes de control biológico importantes para plagas de la familia Aleyrodidae, en cultivos tanto en campo como en invernadero, atacando principalmente estados ninfales.

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 su sostenibilidad. Dentro de dichas alternativas, se encuentra el uso de hongos entomopatógenos para el control biológico de plagas.

En la literatura de las patentes de invención, se observa divulgación contenida en el Documento 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 anisoplae* (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.

La patente US20100112060 revela composiciones insecticidas que comprenden esporas de un hongo entomopatógeno suspendidas en una emulsión de aceite en agua que comprende sales de ácidos grasos, alcoholes polihídricos y emulsificantes

adicionales, donde el hongo entomopatogénico se selecciona entre *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana*.

El punto crítico del control efectivo de plagas lo constituye, tanto la selección del vehículo adecuado, como la formulación agrícolamente efectiva de los hongos seleccionados.

Tomando como base los elementos del estado de la técnica expuestos con anterioridad, la presente invención revela un Bioinsecticida a partir de la acción conjunta de los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* y *Trichoderma viride*, los cuales son inocuos con el medio ambiente y no ofrecen peligro a los animales o al hombre, donde 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.

15 OBJETO DE LA INVENCION.

En un primer objeto, la presente invención revela una formulación agrícolamente activa para el control de plagas y pestes, especialmente, para el control de la mosca blanca *Aleurotrachelus socialis* y *Bemisia tabaci*, inocua con el medio ambiente y sin generar peligro a los animales o al hombre.

20 La formulación objeto de la invención se obtiene a partir de la acción conjunta de una concentración definida de esporas de los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* y *Trichoderma viride*.

Además de la concentración de esporas definida de los hongos entomopatógenos, la formulación presenta excipientes que comprenden un atrayente de la mosca, un detergente que permite la viabilidad de las esporas en el tiempo, al igual que un conservante.

Los objetos anteriormente descritos, al igual que los objetos adicionales a que hubiere lugar, serán expuestos al detalle y con la suficiencia necesaria en el capítulo descriptivo que se divulga a continuación, el cual constituirá el fundamento del capítulo reivindicatorio.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención surge como respuesta a la necesidad de proveer un insecticida biológico para el control de plagas, cuya aplicación no genere consecuencias adversas al medio ambiente o a la salud de los animales o el hombre.

La descripción de la realización de la presente invención no pretende limitar su alcance, sino servir como un ejemplo particular de la misma. Se espera que una persona versada en la materia comprenda que las modalidades equivalentes no se apartan del espíritu y alcance de la presente invención en su forma más amplia.

5 La presente invención revela una formulación agrícolamente activa para el control de plagas y pestes, en especial, para el control de la mosca blanca *Aleurotrachelus socialis* y *Bemisia tabaci*, la cual, se obtiene a partir de la acción conjunta de una concentración definida de esporas de los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisoplae* y *Trichoderma viride*.

10 Respecto a *Metarhizium anisoplae*, de acuerdo con los estudios adelantados por Amiri B, I.L., Butt TM. (1999), "M. anisoplae es un hongo imperfecto que pertenece a la subdivisión Deuteromycotina, clase Hyphomycetes, caracterizado por la formación de micelio septado con producción de conidias de aproximadamente 0.5 a 0.8 micras de diámetro o formas de reproducción asexual, en conidióforos que
15 nacen a partir de hifas ramificadas. Este hongo se encuentra en la naturaleza, en rastros de cultivos, estiércol, en el suelo, las plantas, etc., logra buen desarrollo en lugares frescos, húmedos y con poco sol. M. anisoplae ataca naturalmente más de 300 especies de insectos de diversos órdenes. El proceso infectivo que lleva al insecto atacado por el hongo a morir se cumple en tres etapas: La primera de
20 germinación de esporas y penetración de hifas al cuerpo del hospedero dura de 3 a 4 días. La penetración del hongo al hospedero ocurre a través de la cutícula o por vía oral. La segunda etapa es la invasión de los tejidos por parte del micelio del hongo hasta causar la muerte del insecto, dura de 2 a 3 días. Los síntomas de la enfermedad en el insecto son la pérdida de sensibilidad, incoordinación de
25 movimientos y parálisis. Cuando el insecto muere, se momifica. Finalmente sigue la tercera etapa, la esporulación y el inicio de un nuevo ciclo. El micelio del hongo se observa primero en las articulaciones y partes blandas de los insectos y en días posteriores se incrementa a todo el cuerpo hasta finalmente cubrirlo.". (Pg. 487).

A su vez, en relación con *Trichoderma viride* o *lignorum*, según estudios
30 adelantados por Solis, H., (1998), T.lignorum, es un hongo saprofito, antagonista de patógenos vegetales que se encuentra presente en la mayoría de los suelos. Activa el crecimiento radicular de las plantas, es capaz de colonizar y crecer en las raíces a medida que éstas se desarrollan y aumenta la resistencia del cultivo frente al ataque de posibles patógenos. El uso de T. lignorum, es fácil, pues puede
35 añadirse directamente a las semillas o al suelo, semilleros, trasplantes, bandejas y plantas, empleando cualquier método convencional. El hongo tiene excelentes propiedades para el control biológico, siendo especialmente efectivo contra *Rhizoctonia* spp, *Fusarium* spp, *Pythium* spp, *Botrytis* spp, *Alternaria* spp, *Phytophthora* spp, *Rosellinia* spp, *Armillaria* spp y *Sclerotium* spp, entre otras
40 (p.135).

Los hongos *Trichoderma* 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).

- 5 A efectos de la presente invención, la inclusión en la formulación de las esporas del hongo entomopatógeno *Trichoderma* se evidencia en el efecto antagonista sobre el hongo fumagina. Cuando la mosca blanca ataca al cultivo, genera como consecuencia, las condiciones biológicas para el desarrollo de un hongo denominado fumagina, el cual es un hongo saprófito que causa graves daños en los frutos y en la eficiencia de la producción vegetal.

El hongo *Beauveria bassiana* ha sido estudiado 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.).

- 20 La esporulación de los hongos filamentosos comprendidos dentro de la formulación objeto de la invención debe efectuarse en un medio acuoso.

En una modalidad particular, el medio acuoso para la esporulación, es el medio YPD (Yeast-peptone-Dextrose), el cual se compone por Dextrosa - 20g, Infusión papa - 4g-peptona 4g y Agua destilada 1L.

- 30 Los inóculos de las cepas fúngicas fueron introducidos en el medio YPD estéril y se colocaron a incubación a una temperatura aproximada de 28 Grados Centígrados durante un periodo de 8 días. En este periodo fueron tomadas muestras para determinar la máxima esporulación fúngica y la determinación del tiempo requerido para lograr la concentración final de esporas analizadas.
- 35 Para determinar la concentración de esporas se procede a sembrar en el medio de crecimiento expuesto (YPD), los hongos entomopatogenos (*M.anisopliae*, *Beauveria bassiana* y *T. lignorum*).

A estos hongos se les realizó un conteo mediante cámara de Neubauer cada dos horas para determinar el número de esporas presentes y se colocó a 20°C.

Con la concentración deseada de las esporas de los hongos entomopatógenos, se procedió a realizar las bioformulaciones experimentales, las cuales se desarrollaron

5 a partir de las siguientes concentraciones de esporas:

- *Beauveria bassiana*: Entre 6×10^6 esporas/ml y 6×10^{12} esporas/ml
- *Trichoderma lignorum*: Entre 6×10^4 esporas/ml y 6×10^9 esporas/ml.
- *Metarhizium anisopliae*: Entre 6×10^6 esporas/ml y 6×10^{12} esporas/ml.

10

Las formulaciones comprenden, además de las esporas de los hongos entomopatógenos, excipientes, tales como, un atrayente de la mosca, el cual
15 aumenta la efectividad de la formulación debido a la atracción que se ejerce sobre el insecto. En la modalidad preferida de la invención, el atrayente es ácido octadecenoico y ácido eicosatrienoico en proporción 50%-50%.

A su vez, dentro de los excipientes, la formulación presenta un detergente que permite la viabilidad de las esporas en el tiempo. En la modalidad preferida de la
20 invención, el detergente es tritón X-100 - Polietilenglicol-[4-(1,1,3,3-tetrametilbutil)fenil]-éter

La formulación comprende, además, un conservante que permite prolongar la vida útil del bioinsecticida. En la modalidad preferida de la invención, el conservante es Sorbato de sodio.

Los ejemplos que se describen a continuación son presentados con el objetivo de describir los aspectos preferidos de la invención, pero no constituyen una limitación al alcance de esta.

5 EJEMPLO 1.

Formulación 1 (Tratamiento 1): Correspondiente a 6x10⁹ esporas/ml de *Metarizhium anisopliae*, American Type Culture Collection ATCC® MYA-1376™

6x10⁹ esporas/ml de *Beauveria bassiana*, American Type Culture Collection ATCC®- MYA-4886™

10 6x10⁶ esporas/ml de *Trichoderma viride*, American Type Culture Collection, ATCC® 8751™ depositado con el nombre *Trichoderma lignorum*.

Donde en la modalidad particularmente preferida, las cepas con las concentraciones de esporas definidas fueron disueltas en 750 ml de agua destilada estéril, 100 ml de tritón X-100 100 (Polietilenglicol-[4-(1,1,3,3- tetrametilbutil)fenil]-éter), 50 ml de
15 agentes Conservantes, 50 ml de un atrayente.

Componente	Concentración
<i>Beauveria bassiana</i>	6 x 10 ⁹ esporas/ml (6 x 10 ⁶ esporas/ml y 6 x 10 ¹² esporas/ml
<i>Trichoderma Viride</i>	6 x 10 ⁶ esporas/ml (2 y 10) (6 x 10 ⁴ esporas/ml y 6 x 10 ⁹ esporas/ml
<i>Metarhizium anisopliae</i>	6 x 10 ⁹ esporas/ml (2 y 10) (6 x 10 ⁶ esporas/ml y 6 x 10 ¹² esporas/ml
Polietilenglicol-[4-(1,1,3,3-tetrametilbutil)fenil]-éter	80-120 g/l
50 ml Sorbato de sodio	Entre 0,1 y 0,5%
Atrayente No Natural (ácido octadecenoico y ácido eicosatrienoico, 1:1)	50 ml
Agua Destilada estéril	750 ml

El Atrayente utilizado fue ácido octadecenoico y ácido eicosatrienoico en proporción 50%-50%.

El Conservante utilizado fue Sorbato de sodio al 0,1 % en la modalidad particularmente preferida.

5

EJEMPLO 2.

Formulación 2: Correspondiente a 6×10^9 esporas/ml de *Beauveria bassiana*, American Type Culture Collection ATCC®- MYA-4886™ y 5×10^6 esporas/ml de *Trichoderma viride*, American Type Culture Collection, ATCC® 8751™, disueltas en
 10 750 ml de agua destilada estéril, 100 ml de tritón X-100 (Polietilenglicol-[4-(1,1,3,3-tetrametilbutil)fenil]-éter), 50 ml de agentes Conservantes, 50 ml de un atrayente no natural.

El Atrayente utilizado fue ácido octadecenoico y ácido eicosatrienoico en proporción 50%-50%.

15 El Conservante utilizado fue Sorbato de sodio al 0,1 %.

EJEMPLO 3.

Formulación 3: Correspondiente a 6×10^9 esporas/ml *Metarizhium anisopliae*, American Type Culture Collection ATCC® MYA-1376™ y 5×10^6 esporas/ml de
 20 *Trichoderma viride*, American Type Culture Collection, ATCC® 8751™, disueltas en 750 ml de agua destilada estéril, 100 ml de tritón X-100 (Polietilenglicol-[4-(1,1,3,3-tetrametilbutil)fenil]-éter), 50 ml de agentes Conservantes, 50 ml de un atrayente no natural.

25 El Atrayente utilizado fue ácido octadecenoico y ácido eicosatrienoico en proporción 50%-50%.

El Conservante utilizado fue Sorbato de sodio al 0,1 %.

EJEMPLO 4.

Las formulaciones 1, 2 y 3 se dispusieron en una casa de malla con ambiente
 30 controlado en presencia de 100 moscas *Aleuritrachelus socialis* y *Bemisia tabacia* con tres repeticiones cada uno.

Se presenta a continuación el cuadro experimental, donde las formulaciones de los Ejemplos 1, 2 y 3 fueron comparadas con un formulación química utilizada en la agroindustria para el control de plagas (Químico control), donde se desarrollaron varias repeticiones (R1-R2-R3), donde se obtuvieron los mismos resultados experimentales para cada formulación.

Formulación	Mosca	Repeticion
Formulación 1	<i>Aleurotrachelus socialis</i> (100 moscas)	R1-R2-R3
Formulación 1	<i>Bemisia tabaci</i> (100 moscas)	R1-R2-R3
Formulación 2	<i>Aleurotrachelus socialis</i> (100 moscas)	R1-R2-R3
Formulación 2	<i>Bemisia Tabaci</i> (100 moscas)	R1-R2-R3
Formulación 3	<i>Bemisia Tabaci</i> (100 moscas)	R1-R2-R3
Formulación 3	<i>Aleurotrachelus socialis</i> (100 moscas)	R1-R2-R3
Formulación 4 (Químico Control)	<i>Aleurotrachelus socialis</i> (100 moscas)	R1-R2-R3
Formulación 4 (Químico Control)	<i>Bemisia tabaci</i> (100 moscas)	R1-R2-R3

10 A partir de ese diseño experimental se observa que la Formulación detallada en el Ejemplo 1, la cual presentó en laboratorio un 91,3 % de efectividad. La mortalidad de las moscas fue del 80% entre los 5 y 7 días y de 91,3 % a los 9 días.

La formulación detallada en el Ejemplo 2 presentó en laboratorio una efectividad de 84 %.

15 La formulación detallada en el Ejemplo 3 presentó en laboratorio una efectividad de 86 %.

La formulación química utilizada en la agroindustria para el control de plagas (Químico control) presentó en laboratorio una efectividad de 87%.

Las moscas muertas fueron recolectadas y observadas al microscopio y estereoscopio observándose que todas poseían infección por los hongos filamentosos provenientes de la formulación y se encontraron hifas rodeando las moscas las cuales provocaron la muerte de los insectos, descartándose otro tipo de muerte.

Aunque la presente invención ha quedado descrita con las realizaciones preferentes mostradas, queda entendido que las modificaciones y variaciones que conserven el espíritu y el alcance de esta invención se entienden dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

5

10

15

20