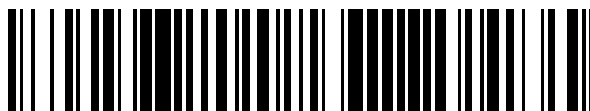


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 525 717**

51 Int. Cl.:

A01N 63/04 (2006.01)

A01N 25/00 (2006.01)

A01G 1/00 (2006.01)

A01P 7/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.09.2008** **E 08831226 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.11.2014** **EP 2200445**

54 Título: **Composición de hongos entomopatógenos y procedimiento de producción y aplicación, para el control de los insectos**

30 Prioridad:

13.09.2007 US 901547

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

29.12.2014

73 Titular/es:

**THE UNITED STATES OF AMERICA, AS
REPRESENTED BY THE SECRETARY OF
AGRICULTURE (100.0%)
1400 INDEPENDENCE AVENUE SW
WASHINGTON, DC 20250-0302, US**

72 Inventor/es:

**JACKSON, MARK A. y
JARONSKI, STEFAN T.**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 525 717 T3

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

Composición de hongos entomopatógenos y procedimiento de producción y aplicación, para el control de los insectos

Antecedentes y trasfondo de la invención

Sector de la invención

La presente invención, se refiere a la formación de propágulos microescleróticos, mediante hongos entomopatógenos y al uso de tales tipos de microesclerotia para el control de los insectos.

Descripción del arte anterior de la técnica

Los pesticidas químicos, se han venido utilizando para el control de los insectos y para el control de la maleza o malas hierbas, durante un transcurso de tiempo de más de 60 años. El interés en el uso de medidas de base biológica, para el control de las plagas, se ha producido debido al desarrollo de la resistencia de las plagas, a muchos pesticidas químicos, conjuntamente con las inquietudes o preocupaciones a raíz del impacto desfavorable de la utilización generalizada de productos químicos, en la salud humana, en la seguridad de los productos alimenticios y en el entorno medioambiental (véase, a dicho efecto, los siguientes trabajos: Gillespie y Moorhouse, 1989, *Biotechnology of Fungi for Improving Plant Growth*, - Biotecnología de los hongos para la intensificación del crecimiento de plantas -, páginas 85 - 125; Hajek, 1993, *New options for insect control using fungi*, In, *Pest Management: Biologically Based Technologies*, - Nuevas opciones para el control de los insectos, mediante la utilización de hongos, en el control de las plagas: Tecnologías de base Biológica (R.D. Lumsden y J. Vaugn, eds.) Amer. Chem. Soc., Washington, D.C.; Leathers et al., 1994, *J. Industrial Microbiology* 12: 69 - 75). En el pasado siglo 19, Metchnikoff, fue la primera persona en describir las infecciones provocadas por el hongo "green muscardine" *Metarhizium anisopliae*, en los ronrones o abejorros de mayo de los cereales, y que sugirió el uso de los microorganismos como una gente de control biológico para los insectos (Zimmermann et al., 1995, *Biological Control Science and Technology*, - La ciencia y la tecnología del biocontrol -, 5: 527 - 30). Subsiguientes estudios realizados con posterioridad, mostraban el hecho de que, una aplicación de las esporas de *M. anisopliae*, podían aniquilar a los abejorros de mayo o ronrones de los cereales, y el gorgojo de la remolacha azucarera, vía una infección directa. Los procedimientos iniciales de producción para este hongo, se centralizaron en el uso de insecto huésped del medio artificial, como vehículo de crecimiento para la producción de conidias del patógeno.

La elección de la búsqueda de los insectos que habitan en el suelo, como objetivo para el control biológico, versus insectos en el fitoplasma, es tentadora. Entre estos objetivos o dianas, se encuentran los gorgojos de las raíces, las larvas del suelo, los gusanos de las raíces o gusanos blancos, la mosca de la fruta, y las lombrices de las raíces (Bruck, 2005, *Biological Control*, - Control Biológico -, 32: 155 - 163; Krueger y Roberts, 1997, *Biological Control*, 9: 67 - 74; Chandler y Davidson, 2005, *Journal of Economic Entomology*, 98: 1856 - 1862; Vanninen et al., 1999, *Journal of Applied Entomology*, 123: 107 - 113; Kabaluk et al., 2005, *IOBC / wprs Bulletin*, 28: 109 - 115). Se evita la radiación UV, la cual puede tener como resultado una persistencia muy corta sobre las superficies de las plantas. Las precipitaciones lluviosas, las cuales lavan a las conidias infecciosas, hacia fuera del follaje, corto tiempo después de la aplicación, no es pre ocupante. Las temperaturas del suelo, son moderadas, debido a su valor aislante, y las humedades del suelo, por encima de punto de marchitamiento permanente de las plantas, se encuentran asimismo, también, dentro del rango óptimo, para los microorganismos.

El hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae*, se ha registrado como un insecticida biológico, para el control de las plagas de los insectos que habitan en el suelo y enigmáticos o crípticos, en los Estados Unidos de América, y muchos otros países. El hongo *Metarhizium anisopliae*, según se ha reportado, infecta a más de 100 insectos, incluyendo a los insectos que habitan en el suelo, de la siguiente lista: las termitas subterráneas (*de las especies biológicas Reti culitermes y Coptotermes*), los gusanos de las raíces del maíz (*especie biológica Diabrotica*), el gorgojo negro de la vid (*Otiorynchus sulcatus*), el gorgojo de las raíces de los cítricos (*Diaprepes abbreviatus*), los escarabajos japoneses (*Popillia japonica*), y el abejorro europeo (*Rhizotrogus majalis*) (Krueger et al., 1992, *Journal of Invertebrate Pathology*, - Diario de la patología de los invertebrados -, 59: 54 - 60; Schwarz, 1995, *Metarhizium anisopliae for soil pest control*, - *Metarhizium anisopliae* para el control de las plagas del suelo. En *Biorational Pest Control Agents; Formulation and Delivery*, - En Agentes de control de las plagas bio-racionales -, F.R. Hale y J.W. Barry, eds., ACS Symposium Series 595, American Chemical Society, Washington, D.C. páginas 183 - 196; Krueger y Roberts, 1997, *antes citados*; Bruck, 2005, *antes citado*). El interés comercial en la utilización del hongo *M. anisopliae* para el control de los insectos que habitan en el suelo, ha dado como resultado el desarrollo de las formulaciones granulares para el control de las plagas, a base de gránulos miceliales producidos en cultivos líquidos, o de conidias producidas en substratos sólidos, sobre un portador o soporte nutritivo o no nutritivo, u hongo, en el substrato sólido utilizado, en sí mismo (Schwarz, 1995, *antes citado*; Storey et al., 1990, *Conidiation kinetics of the microsclerotial granules of Metarhizium anisopliae*, - La cinética de conidiación de los gránulos microescleróticos de *Metarhizium anisopliae* (Bio 1020) y su actividad biológica contra diferentes insectos del suelo. *Proceedings of the Vth International Colloquium on Invertebrate Pathology and Microbial Control*, - Debates del 5º Coloquio Internacional

sobre las patologías de los invertebrados y el control microbiano -, Adelaide, Australia. páginas 320 - 325; Andersch et al., 1995, Patente estadounidense U S nº 5. 418. 1 64), siendo, la formulación más práctica, el gránulo micelial. Los hongos, en estas formulaciones granulares, deben necesariamente crecer hacia fuera de portador o soporte y reesporular, para producir la conidia infecciosa. Puesto que, los propágulos (conidia) del hongo *M. anisopliae*, deben contactar con insecto huésped, el número, la distribución y la persistencia de las conidias, de la forma que éstas se producen mediante los hongos, sobre un portador o soporte granular, en el suelo, es de la máxima importancia (Bruck, 2005, anteriormente citado; Hu y St. Ledger, 2002). La aplicación práctica de estas formulaciones, se ha visto limitada, debido al hecho de la características físicas del producto, las cuales imposibilitan el uso en los equipos agrícolas convencionales, los altos costos de producción, y / o un escaso tiempo de vida de conservación, en la práctica. Los gránulos miceliales, tales como los que se dan a conocer en la patente estadounidense U S 5. 418 164, tienen, de una forma general, un escaso tiempo de vida de conservación, a la temperatura ambiente, o éstos deben liofilizarse, lo cual representa un proceso caro. Las conidias (producidas en una fermentación de sustrato sólido, unida a un portador o soporte granular tienen, de una forma general, un escaso tiempo de vida de conservación. Los gránulos de fermentación en sustratos sólidos, usados (tratándose éstos, de una forma típica, de granos de arroz, de granos de cebada, y de granos de trigo), los cuales contienen hongos residuales, después de la cosecha de las conidias, no pueden aplicarse mediante la utilización de equipos agrícolas convencionales, ni éstos tampoco pueden molerse fácilmente al tamaño apropiado, sin matar el hongo, incluso a pesar de que, esta formulación, se encuentre fácilmente disponible, como producto subproducto o producto secundario de la producción de las conidias.

Para la persistencia en el suelo y en el material de las plantas en descomposición, muchos hongos de patógenos de las plantas, producen esclerotias; a saber, los agregados hifálicos compactos, melanizados, los cuales son altamente resistentes a la desecación. Estos propágulos, sirven, a menudo, como la estructura de hibernación para los hongos (véanse, a dicho efecto los siguientes trabajos: Cooke, 1983, Morphogenesis of sclerotia, Morfogénesis de las esclerotias. En "Fungal Differentiation: A Contemporary Synthesis", - "Diferenciación fúngica: Una síntesis contemporánea" -, Smith, J.E., editores. Páginas 397 - 418. Marcel Dekker, Inc., New York, NY, U.S.A.; Coley-Smith y Cooke, 1971, Survival and germination of fungal sclerotia, - Supervivencia y germinación de esclerotias fúngicas -. En "Annual Review of Phytopathology", - "Revista anual de fitopatología" -, J. G., Baker, K. F., Zentmyer, G. A., editors. páginas 65 - 92. Annual Reviews Inc., Palo Alto, CA, U.S.A.). Se han producido Microesclerotias (pequeñas partículas escleróticas, de 200 - 600 µm) de patógenos de plantas, fúngicos, tales como los consistentes en el *Colletotrichum truncatum* y el *Mycoleptodiscus terrestres*, en una alta concentración, en una fermentación de cultivo sumergida (Jackson y Schisler, 1995, Mycological Research, 99: 879 - 884; Shearer y Jackson, 2003, Patente estadounidense U S nº 6. 569. 807). Las Microesclerotias de estos patógenos de plantas consistentes en malas plantas o maleza, han mostrado un valor, como propágulos infecciosos persistentes, en los entornos medioambientales del suelo y acuáticos (Shearer y Jackson, 2006, Biological Control. 38 : 298 - 306; Boyette et al., 2007, BioControl 52: 413 - 426). No obstante, hasta el momento actual, las microesclerotias, no se ha mencionado, para cualesquiera patógenos fúngicos de los insectos.

Resumen de la invención

Nosotros, los solicitantes, hemos descubierto, ahora, el hecho consistente en que, la hasta ahora no descrita formación de microesclerotias, mediante hongos entomopatógenos, los cuales son efectivos para el control de las plagas de insectos, así como las técnicas para la producción de estos propágulos micro escleróticos. En concordancia con este descubrimiento, la microesclerotia, puede producirse mediante hongos entomopatógenos, incluyendo a las especies de *Metarhizium* y a las especies de *Lecanicillium*. Estas microesclerotias, son tolerantes a la desecación, de un bajo coste de supervivencia, susceptibles de procesos de secado al aire con objeto de reducir los niveles de humedad, éstas exhiben un excelente tiempo de vida de conservación, a la temperatura ambiente, así como también a temperaturas refrigeradas, y pueden procesarse a tamaños de formulación, los cuales son compatibles con aplicadores de pesticidas granulares del tipo convencional. En el uso, las microesclerotias, esporulan de una forma abundante (produciendo así, de este modo, un gran número de conidias infecciosas de los insectos), al producirse su rehidratación, tal y como sucede en un suelo normal, y pueden exhibir unos niveles y unas tasas que son comparables o incluso mayores, de infectividad, contra las plagas de los insectos, en comparación con la formulaciones granulares a base de conidias, del tipo convencional.

En concordancia con este descubrimiento, es un objeto de la presente invención, el proporcionar hongos entomopatógenos, en forma de propágulos microescleróticos.

Otro objeto de la presente invención, es el de proporcionar propágulos de microesclerotia de hongos entomopatógenos, los cuales sean efectivos como agentes para el control biológico, contra las plagas de insectos de índole económicamente importante.

Un objeto adicional de la presente invención, es la consistente en proporcionar propágulos de microesclerotia de hongos entomopatógenos, los cuales sean tolerantes a la desecación y que sean estables a la almacenaje, al mismo tiempo que retengan la eficacia como agentes de control biológico contra las plagas de los insectos.

Es todavía otro objeto adicional de la presente invención, el proporcionar un procedimiento para la producción de propágulos de microesclerotia de hongos entomopatógeno, en unos altos rendimientos productivos, en cultivos líquidos sumergidos. Otros objetos y ventajas de la presente invención, resultarán fácilmente evidentes a raíz de la descripción la cual se facilita abajo, a continuación.

Descripción resumida de los dibujos

La figura 1, muestra la eficacia relativa de dos tipos de gránulos de *Metarhizium anisopliae* F52, contra las larvas de *Tetanops myopaeformis* (Gusano de la raíz de la remolacha azucarera) en el tercer estadio, en un ensayo de incorporación en un suelo, tal y como se describe en el Ejemplo 4. Los gránulos, consistían en gránulos que contenían o bien ya sea microesclerotias de un tamaño de malla correspondiente a 20 / 30 mesh, preparados a partir de una fermentación líquida, o bien ya sea un portador o soporte de harina o granulado de maíz de un tamaño de malla correspondiente a 15 / 30 mesh, recubierto con una capa de conidias, mediante la utilización de un porcentaje del 10 % de un ligante de monooleato de polioxietileno sorbitán (TWWN 80). Los gránulos, se incorporaron en un suelo de arcilla, a razón de una tasa correspondiente a 1,8 mg / g de suelo y, subsiguientemente, se procedió a humedecer los suelos, a los deseados puntos de humedad, mediante la utilización de agua. Las actividades del agua en el suelo, se determinaron después de un transcurso de tiempo de 24 horas, mediante la utilización de un medidor de la actividad del agua, siguiendo las instrucciones proporcionadas por parte del fabricante. Cada tratamiento, tuvo tres reproducciones de 10 larvas y, el test de ensayo en su totalidad, se repitió dos veces.

Descripción detallada de la invención

Tal y como se utiliza aquí, en este documento de solicitud de patente, el término "microesclerotia" (o microesclerotias, en plural), se refiere a los pequeños cuerpos escleróticos, los cuales son algunos estados en reposo de los hongos. Las microesclerotias, son agregados hifálicos compactos, estables, viables y, algunas veces, melanizados, de los hongos. Las microesclerotias, en sí mismas, no son infecciosas, pero, cuando éstas se rehidratan, tal como por ejemplo, mediante la exposición a la humedad, en suelo, o en las grietas o hendiduras de los árboles, las microesclerotias, germinarán de una forma hifálica, o de una forma esporogénica, para producir conidias, las cuales son infecciosas para los insectos objetivizados como diana. Las microesclerotias, son extremadamente tolerantes a la desecación, éstas son capaces de geminar, tanto de una forma esporogénica, como de forma vegetativa, y así mismo, también, retienen las capacidades insecticidas de sus formas nativa o normal (a saber, hifas, blastoesporas, y/o conidias de los mismos hongos entomopatógenos). Morfológicamente, las microesclerotias, pueden encontrarse presentes como un grupo de aglomerados de células. El término "insecticida", tal y como se utiliza aquí, en este documento de solicitud de patente, se refiere a un material, o a una mezcla de materiales, los cuales inducen la mortalidad, interrumpen o impiden el crecimiento, interfieren con la metamorfosis, u otras funciones morfológicas, efectúan una esterilización, o interfieren con la reproducción de los insectos los cuales se han objetivizado como diana. Los términos "que controla" o "que se efectúa un control del insecto objetivizado como diana", tal y como se utiliza aquí, en este documento de solicitud de patente, pretende dar a entender el hecho de que, la población de insecto, se reduce, principalmente, mediante la mortalidad, a un nivel el cual es significativamente mayor que el de una población no tratada. "Una significativa mortalidad" (o una significativa mortalidad), tal y como se define aquí, en este documento de solicitud de patente, pretende dar a entender el hecho de que, el porcentaje de los insectos que mueren, en período o transcurso de tiempo dado, después de haber entrado en contacto con el insecticida, es significativamente mayor que el correspondiente al número de insectos los cuales no han entrado en contacto con el insecticida y los cuales mueren, durante el mismo período o transcurso de tiempo, en base a los análisis estadísticos estándar.

La invención que se describe aquí, en este documento de solicitud de patente, es efectiva para producir microesclerotias de cualesquiera especies, cepas, o variedad de hongos entomopatógenos, del género *Metarhizium*, si bien, no obstante, se concibe así mismo, también, el hecho de que, la presente invención, pueda utilizarse para producir microesclerotias de las especies del género *Lecanicillium*. Las especies preferidas, para su uso aquí, en esta invención, incluyen a las especies de hongos consistentes en la especie *Metarhizium flavoviride*, y de una forma particular, en la especie *Metarhizium anisopliae*, sensu lato (en su amplio sentido).

La producción de microesclerotias en concordancia con la presente invención, se lleva a cabo, de una forma preferible, en un cultivo líquido, y la producción a gran escala, se lleva a cabo, de una forma preferible, mediante un proceso de fermentación de un cultivo líquido, en un depósito o tanque profundo. Se contempla así mismo, también, el hecho de que pueda utilizarse un medio de cultivo sólido. El medio líquido el cual se utiliza en la preparación de microesclerotias melanzadas, es crítica, debido al hecho de que, su formación y su rendimiento productivo, dependen del medio. De una forma general, se necesita un medio líquido, el cual tenga unas altas concentraciones de carbono y de nitrógeno, con objeto de que puedan obtenerse unos altos rendimientos productivos de las microesclerotias de *M. anisopliae*. Para su uso aquí, en esta invención, el medio, de una forma preferible, contiene una fuente de nitrógeno, a una concentración correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes situados entre los 8,1 gramos de fuente de nitrógeno / litro y menos de 50 gramos de fuente de nitrógeno / litro, y una fuente de carbono, a un valor de concentración correspondiente a un valor mayor de los 20 gramos de hidratos de carbono / litro, siendo dicha concentración, de una forma preferible, la correspondiente a un valor mayor de 30

gramos de hidratos de carbono / litro. Las fuentes de nitrógeno las cuales son apropiadas, incluyen, aunque no de una forma limitativa en cuanto a éstas, a la caseína hidrolizada, el extracto de levadura, la proteína de soja hidrolizada, la semilla de algodón hidrolizada, y la proteína de gluten de maíz, hidrolizada. Las fuentes de carbono las cuales son las apropiadas, incluyen, aunque no de una forma limitativa en cuanto a éstas, a los hidratos de carbono, incluyendo a la glucosa, a la fructosa y a la sacarosa, y a la glicerina. Los medios de cultivo líquidos, para uso aquí, en esta invención, se describen por parte de Jackson (Patente estadounidense U S nº 5. 968. 808, cuyos contenidos, se incorporan aquí, en este documento de solicitud de patente, a título de referencia). Nosotros, los solicitantes, hemos descubierto, de una forma sorprendente, el hecho de que, los hongos entomopatógenos anteriormente mencionados, arriba, producen microesclerotias, cuando éstos se hacen crecer en un cultivo sumergido, en el medio de Jackson. Estas microesclerotias, no se han descrito, hasta el momento presente, a partir de estos hongos. Como contraste de ello, las especies de los hongos entomopatógenos consistentes en la especie de hongo *Paecilomyces* y la especie de hongo *Beauveria* producen blastoesporas, en lugar de microesclerotias, cuando éstos se hacen crecer en el mismo medio y bajo las mismas condiciones (F. E. Vega et al., 2003, World J. Microbiology & Biotechnology, 19: 363 - 368.). La fermentación puede llevarse a cabo mediante la utilización de técnicas de cultivo en líquidos, aeróbicas, del tipo convencional, mediante agitación y aereación. Se prefiere la agitación, con objeto de inhibir el crecimiento micelial en la pared del receptáculo. Las temperaturas las cuales son las adecuadas, pueden ser las correspondientes a un rango comprendido dentro de unos márgenes que van desde los aprox. 20 °C hasta los aprox. 32 °C, y el pH puede ser el correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes que van desde un pH de aprox. 4 hasta un pH de aprox. 8. Una vez que se haya obtenido un crecimiento lo suficientemente intenso del hongo, de una forma usual, en un transcurso de tiempo de 2 - 4 días, las microesclerotias, empiezan a formarse y, la fermentación, se continúa, entonces, hasta que se haya obtenido una concentración lo suficientemente alta de las microesclerotias. Sin pretender vincularlo a ello, en una forma preferida de presentación de la presente invención, la fermentación, se continúa, hasta que una proporción mayor de los hongos viables, en el cultivo (a saber, una proporción mayor de un porcentaje correspondiente a un 30 %, en peso), se encuentre en forma de microesclerotias y, de una forma más preferible, hasta que una predominante proporción de los hongos viables en el cultivo (a saber, una proporción mayor de un porcentaje correspondiente a un 50 %, en peso) se encuentre en forma de microesclerotias. A continuación de haberse completado la fermentación, las microesclerotias, pueden recuperarse mediante la utilización de técnicas convencionales, tales como las consistentes en el filtrado o en la centrifugación. Las microesclerotias, pueden secarse, tal como por ejemplo mediante secado al aire, a un reducido nivel de temperatura, y almacenarse a la temperatura ambiente, o a una temperatura inferior. En una forma preferida de presentación, la biomasa recuperada de la fermentación, después de haberse procedido a su secado, contendrá una cantidad correspondiente a un valor de 1×10^6 microesclerotias por gramo de biomasa, o una cantidad mayor (en base al peso en seco de la biomasa), siendo dicha cantidad, de una forma particular, la correspondiente a un valor de por lo menos 9×10^6 microesclerotias por gramo de biomasa.

Las formulaciones comerciales para su uso como agente de control de los insectos, puede prepararse a partir de microesclerotias las cuales se hayan recolectado a partir de medios de cultivo tales como los que se han descrito anteriormente, arriba. Desde el punto de vista práctico, se prevé que, las formulaciones comerciales, puedan prepararse directamente a partir del cultivo, obviando, con ello, la necesidad de cualesquiera etapas de purificación. Mientras que, los cultivos líquidos pueden utilizarse directamente, en la forma preferida de presentación de la presente invención, el agua, se elimina de los cultivos, hasta la consecución de un secado parcial o de un secado substancial, de la forma que se ha descrito anteriormente, arriba y, el cultivo seco, se fractura o de muele, para su conversión en pequeñas partículas, las cuales sean apropiadas para su aplicación mediante aplicadores de gránulos del tipo convencional, mediante la utilización de técnicas convencionales correspondientes al arte especializado de la técnica. Con objeto de facilitar la aplicación y los subsiguientes crecimiento fúngico y conidiación, las microesclerotias recolectadas, pueden formularse, de una forma alternativa, en un portador (soporte) o vehículo nutricional o inerte, agronómicamente aceptable, para su aplicación como materias en polvo susceptibles de poderse humedecer o mojar, en materias polvorosas, en gránulos, en cebos o señuelos, en soluciones, en concentrados emulsionables, en emulsiones, en concentrados en suspensión, o en materias proyectables por pulverización (aerosoles o sprays). Así, por ejemplo, para las aplicaciones líquidas, las microesclerotias, pueden formularse como una suspensión o como una emulsión. En esta forma de presentación de la presente invención, los portadores o soportes preferidos, incluyen, aunque no de una forma limitativa en cuanto a éstos, al agua, a los tampones, o a los aceites vegetales o de plantas. De un modo alternativo, en una forma de presentación preferida y alternativa de la presente invención, la cual es particularmente apropiada para las aplicaciones granulares sólidas, las microesclerotias, pueden formularse con portadores (soportes) o diluyentes sólidos, tales como los consistentes en la tierra de diatomeas, el talco, la arcilla, la vermiculita, el CaCO_3 (carbonato de calcio), la sémola de la mazorca de maíz, los geles de alginatos, las matrices de almidón, o los polímeros sintéticos, o bien, éstas, pueden incorporarse en micropartículas de liberación controlada del tipo convencional, o en microcápsulas de liberación controlada del tipo convencional. El profesional experto en el arte especializado de la técnica, reconocerá el hecho de que, los hongos, pueden también formularse en combinación con los aditivos convencionales, tales como los consistentes en los agentes pegajosos o adhesivos, los agentes emulsionantes, los agentes surfactantes o tensioactivos, las espumas, los agentes humectantes o agentes hidratantes, los antioxidantes, los protectores de los rayos UV, los aditivos nutritivos, fertilizantes, los insecticidas, o incluso con fungicidas los cuales exhiban una baja toxicidad para los hongos objetivizados como diana. Para la aplicación en la corteza o en la canopia de los árboles o de las plantas, las microesclerotias, se formulan, de una forma preferible, con un adyuvante higroscópico o hidrofílico.

La cantidad absoluta de la microesclerotías y su concentración en la composición final, se seleccionan de tal forma que, éstas, proporcionen una reducción efectiva en la población del insecto objetivizado como diana, si se compara con un control no tratado. La cantidad real, no es crítica, y ésta es una función de las consideraciones prácticas, tales como las consistentes en las propiedades del vehículo o portador (soporte), la densidad de la población del insecto objetivizado como diana, y el procedimiento y el sitio de aplicación y, ésta, puede determinarse fácilmente, mediante tests de ensayo de rutina. Ya que, las microesclerotías de la presente invención, sirven para producir y para suministrar una alta concentración de las conidias infecciosas, con objeto de controlar los insectos objetivizados como diana, mediante su infección y su muerte, los propósitos de la formulación y de la aplicación, la frase "cantidad efectiva", se define como pretendiendo dar entender cualquier cantidad de microesclerotías, la cual sea suficiente como para producir, subsiguientemente, una cantidad suficiente de conidias, en el hábitat objetivizado como diana, como para infectar y para matar el insecto objetivizado como diana, con relación un control no tratado. A título de ejemplo y sin pretender que sea limitativo, se concibe el hecho de que, la formulaciones apropiadas, contengan, de una forma típica, una cantidad correspondiente a un valor de 1×10^6 , ó mayor, de microesclerotías por gramo de biomasa reconvertida a partir del líquido de cultivo (en base al peso en seco de la biomasa), siendo dicha cantidad, de una forma preferible, la correspondiente a un valor de por lo menos $1,5 \times 10^7$ microesclerotías por gramos de biomasa. Para la aplicación a los cultivos en hileras, típicos, y sin pretender que se encuentre limitado a ello, se concibe el hecho de que, las tasas apropiadas para la aplicación, sean las correspondientes a un valor de 1×10^9 microesclerotías por acre, aplicadas en los surcos.

En el uso, las microesclerotías de la presente invención, puede aplicarse en el locus o punto de control de los insectos objetivizados como diana, o en sus inmediaciones, o sobre las superficie de la planas a ser protegidas, tal como, por ejemplo, en la corteza de los árboles, o como capas de recubrimiento sobre las semillas, mediante la utilización de técnicas convencionales. En una forma preferida de representación de la presente invención, las microesclerotías, se aplican en el suelo, o mezclas de substratos exentos de tierra, tales como los que se utilizan en los invernaderos, en una forma granular. En dependencia de la plaga de los insectos objetivizada como diana, las microesclerotías, pueden aplicarse en los campos de agricultura, en los huertos, en los invernaderos o en los jardines o céspedes de éstos, o en las inmediaciones de las plantas ornamentales, en los árboles, o en las estructuras comerciales o residenciales.

Las microesclerotías de los hongos entomopatógenos de la presente invención, producen progámulos infecciosos (conidias aéreas), los cuales son efectivos para infectar y para matar a una amplia variedad de insectos los cuales son importantes desde el punto de vista económico, tratándose éstos, de una forma particular, de los insectos que nacen en el suelo, pero así mismo, también, incluyendo a algunos insectos los cuales habitan en la tierra y en las canopías. Sin pretender ligarlo a ninguna teoría, los insectos los cuales pueden controlarse con las microesclerotías de la presente invención, incluyen a los gorgojos de las raíces, a los gusanos de las raíces (gusanos blancos), a los gusanos laminadores, a las moscas de las frutas, a los gusanos o larvas del suelo, a los gusanos de las raíces, a las termitas, y a las hormigas, incluyendo, de una forma particular, al gusano de las raíces del maíz (de la especie *Diabrotica*), al gorgojo negro de la vid (*Othiorhynchus sulcatus*), al gorgojo de las raíces de cítricos (*Diaprepes abbreviatus*), al gorgojo de la patata dulce o boniato (*Cylas formicarius*), al gorgojo de las raíces de la remolacha azucarera (*Tetanops myopaeformis*), al gorgojo de la col o repollo (*Delia radicum*), al gorgojo de la cebolla (*Delia antiqua*), al gorgojo del nabo (*Delia floralis*), al gorgojo del maíz de siembra (*Delia platura*), a la mosca (del moho) de la zanahoria (*Psila rosae*), al escarabajo japonés (*Popillia japonica*), al abejorro europeo (*Rhizotrogus majalis*), a las termitas subterráneas (de las especies *Reticulitermes* y *Coptotermes*). De una forma adicional, ciertos insectos que habitan en las canopías, de una forma especial, ciertos insectos que habitan en la corteza, pueden controlarse mediante las microesclerotías de la presente invención. Estos insectos, incluyen a las especies de insectos consistentes en el escarabajo barrenador esmeralda del fresno (*Agrilus planipennis*), en la polilla o palomilla gitana (*Lymantria dispar*), y en el gorgojo de la pecana (*Curculio caryae*).

Los ejemplos los cuales de facilitan a continuación, pretenden únicamente ilustrar la invención de una forma adicional, y pretenden limitar el ámbito de la invención, la cual se define mediante las reivindicaciones anexas.

Ejemplo 1

Producción de Microesclerotías

En este ejemplo, nosotros, los solicitantes, hemos procedido a evaluar diferentes entornos medioambientales nutricionales de cultivos líquidos y a medir la acumulación de la biomasa y los rendimientos productivos de las blastoesporas y de las microesclerotías. La tolerancia a la desecación de las microesclerotías, se midió mediante la evaluación su capacidad para germinar de una forma vegetativa y / o de una forma esporogénica, después de la rehidratación.

Se utilizaron, en este estudio, tres cepas de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* (Metchnikoff) Sorokin: una cepa comercial F 52 (ATCC 90448, (de la firma Earth Biosciences, ahora, Novozyme Biologicals, Salem, VA, reaislada a partir de larvas de *Tetanopsmyopaeformis*), MA1200 (ATCC 62176, conducida mediante larvas de *T. myopaeformis*

larvae), y TM109 (ARSEF5520, reaislada a partir de larvas de *T. myopaeformis* larvae). Todos los aislamientos, se almacenaron a una temperatura de -80°C , en los laboratorios de investigación agrónoma consistentes en el centro USDA ARS NPRL y en el centro USDA ARS NCAUR. Se procedió a hacer crecer cultivos Stock de cada cepa de *M. anisopliae*, como aislamientos de esporas individuales, sobre agar de dextrosa de la patata (PDA – [del inglés, potato dextrose agar] -), durante un transcurso de tiempo de tres semanas, a la temperatura ambiente. Se procedió a cortar la placa esporulada en tampones de agar de 1 mm^2 , y los cultivos stock de estos tampones de agar, se almacenaron en glicerol al 10 %, a una temperatura de -80°C . Los inóculos de conidias para los experimentos de cultivos líquidos, se produjeron mediante la inoculación de placas de PDA (agar de dextrosa de la patata), con una suspensión de conidias, procedentes de los cultivos stock congelados, y procediendo a hacer crecer estos cultivos, a la temperatura ambiente ($\sim 22^{\circ}\text{C}$), durante un transcurso de tiempo de 2 – 3 semanas. Todos los cultivos líquidos, se inocularon a una concentración inicial correspondiente a un valor de 5×10^6 conidias ml^{-1} , en el caldo de cultivo.

Los seis medios de cultivo los cuales se sometieron a tests de ensayo, estaban compuestos por un medio de sales basales, suplementado con trazas de metales (oligoelementos), vitaminas (Jackson et al., 1997, Mycological Research, 101 : 35 - 41) y varias combinaciones de glucosa y de caseína hidrolizada ácida, y casaminoácidos. La solución de sales basales definida utilizada en la totalidad de los cultivos líquidos, contenía, por litro de agua desionizada, las siguientes cantidades de los compuestos citados KH_2PO_4 , 4,0 g; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,8 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,6 g; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,1 g; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 37 mg; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 16 mg; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 14 mg; tiamina, riboflavina, pantotenato, niacina, piridoxamina, ácido tiótico (lipóico), 500 microgramos de cada uno de ellos; y ácido fólico, biotina, vitamina B_{12} , 50 microgramos de cada uno de ellos. En la Tabla 1, se proporcionan, para cada medio expuesto a test de ensayo, las cantidades de glucosa y de caseína hidrolizada ácida, y la correspondiente concentración de carbono y de carbono con respecto a nitrógeno. Los cálculos de los factores de relación del carbono y del carbono con respecto a nitrógeno, estaban basados en unos valores correspondientes a un porcentaje del 40 % de carbono en glucosa y un porcentaje del 53 % de carbono, un porcentaje del 8 % de nitrógeno en caseína hidrolizada ácida.

Todos los cultivos, se hicieron crecer en cultivos de 100 ml en frascos (matraces) tamponados del tipo Erlenmeyer, de 250 ml de capacidad útil, a una temperatura de 28°C y a una velocidad angular de 300 r. p. m., en una incubadora de agitación rotativa. Los matraces, se agitaron manualmente, de una forma frecuente, con objeto de inhibir el crecimiento micelial en las paredes de los matraces. Se procedió a extraer las muestras, después de unos transcurso de tiempo correspondientes a dos días, a cuatro días y a ocho días, post inoculación, con objeto de mediar la acumulación de biomasa, las concentraciones de blastoesporas y las concentraciones de microesclerotas. Para cada experimento, se procedió a elaborar muestras por duplicado, procedentes de cada matraz, en cada fecha del muestreo, y se utilizaron tres matraces replicados, para cada medio. Todos los experimentos, se repitieron por lo menos dos veces.

Con objeto de llevar a cabo las mediciones de la acumulación de la biomasa, se procedió a recolectar un ml de caldo de cultivo entero, procedente de los matraces de cultivo y, la biomasa, se separó del medio usado, mediante filtrado al vacío, sobre los discos de filtro previamente pesados (de la firma Whatman GF / A, Maidstone, Inglaterra). Se procedió a determinar la acumulación del peso en seco, procediendo a secar la biomasa y el disco de filtro, a una temperatura de 60°C , a un peso constante, previamente a la medición. Con objeto de determinar las concentraciones de las microesclerotas, se procedió a diluir el caldo de cultivo, de una forma apropiada, y se emplazó una gota en un porta-objetos de vidrio de un microscopio, recubierto con un cubreobjetos, y se procedió a contar el número de microesclerotas, en un volumen de 100 microlitros. Se procedió a contar las microesclerotas, cuando los agregados hifálicos, algunas veces melanizados, eran mayores de un tamaño correspondiente a un valor de 200 micrómetros. Únicamente se procedió a contar las microesclerotas las cuales estaban bien formadas. El caldo de cultivo, se diluyó, de una forma apropiada, a efectos de facilitar el proceso de recuento. Durante el proceso de muestreo del caldo de cultivo, las suspensiones, se agitaron vorticialmente (formando remolinos), de una forma constante, con objeto de asegurar la homogeneidad.

Después de haber procedido a hacer crecer los cultivos de *M. anisopliae*, durante un transcurso de tiempo de ocho días, se procedió a añadir tierra de (de la firma HYFLO, Celite Corp., Lompoc, CA), a la biomasa fúngica combinada de los tres matraces, en cada uno de los tratamientos, a una concentración correspondiente a un valor de 5 g de tierra de diatomeas / 100 ml de caldo de cultivo. La mezcla de microesclerotas – tierra de diatomeas, se filtró, bajo la acción del vacío, en un embudo de Buchner, mediante la utilización de un filtro de papel del tipo Whatman N° 54. Se procedió, a continuación, a desmenuzar la torta de filtrado, procediendo a procesarla en una batidora – trituradora, (del tipo MINI PREP Plus, Cuisinart), y ésta se estratificó en bandejas de aluminio de muy poca profundidad, y se secó, durante el transcurso de toda la noche, en una campana de confinamiento biológico. El contenido de humedad de la preparación de microesclerotas – tierra de diatomeas, se determinó mediante la utilización de un analizador de humedad. Cuando las formulaciones de *M. anisopliae* se hubieron secado, a un contenido de humedad correspondiente a un porcentaje de aprox. un 5 %, éstas se envasaron al vacío, en bolsas sintéticas, de plástico, a base de polietileno, mediante una envasadora al vacío, y se almacenaron a una temperatura de 4°C . Después de la rehidratación, las microesclerotas de *M. anisopliae*, germinaron de forma hifálica (formación de tubos de gérmenes) y éstas conidiacionaron (produjeron masas de conidias sobre la superficie de las microesclerotas). La viabilidad de las microesclerotas (germinación hifálica), y la producción de esporas (germinación esporogénica), se determinaron

en preparaciones de microesclerotias secas, procediendo a rociarlas con 25 mg de una formulación de microesclerotias secas, sobre la superficie de placas de agar de agua. Se utilizaron dos placas de agar de agua, para cada tratamiento. Después de un período de incubación de 24 horas, a una temperatura de 28 °C, se procedió a examinar las microesclerotias, de una forma microscópica, sobre cada placa, para la germinación hifalica, como una medida de la viabilidad. Con objeto de enumerar la producción de esporas, se procedió a continuar con la incubación de placas de agar de agua, durante un transcurso de tiempo de ocho días, a una temperatura de 28 °C. Se procedió a inundar cada una de las placas de agar de agua, con 5 ml de agua estéril y, las conidias, se desalojaron de las microesclerotias, mediante un bucle o lazo estéril. Después de haber procedido a desalojar las conidias, el líquido disponible, se retiró mediante una pipeta, de cada una de las placas y se procedió a medir el volumen de líquido. Las conidias, se contaron mediante la utilización de un hemocitómetro. Con objeto de determinar el número de conidias de *M. anisopliae* producidas por gramo de formulación de microesclerotias secas, se procedió a dividir el número de conidias recolectadas por placa, por el peso de la preparación de microesclerotias añadidas a cada una de las placas (0,025 g).

Resultados

La acumulación de biomasa mediante las tres cepas de *M. anisopliae*, seguido de modelo patrón pronosticado, se hicieron crecer en un medio el cual contenía una cantidad correspondiente a un valor de 8 g / l de carbono, produjo una concentraciones menores de biomasa, si se compara con las que se hicieron crecer en un medio que contenía una cantidad correspondiente a 36 g / l de carbono (Tabla 2). Cuando se procede a comparar cultivos los cuales se han hecho crecer en un medio con factores de relación de carbono con respecto a nitrógeno, los cuales son diferentes, la acumulación de biomasa, no se veía afectada por el contenido de nitrógeno, para aquellos que se habían hecho crecer en un medio con una concentración de carbono correspondiente a un valor de 8 g / l, sugiriendo ello el hecho de que, el medio, se encontraba limitado en cuanto a lo referente al carbono. Para todas las cepas de *M. anisopliae* que se habían hecho crecer en un medio el cual contenía una cantidad de carbono, correspondiente a un valor de 36 g / l, la acumulación de biomasa, era significativamente mayor, después de unos transcurros de tiempo de crecimiento, correspondientes a 4 días y a 8 días, para los cultivos que se habían hecho crecer en un medio con un menor factor de relación de carbono con respecto a nitrógeno (es decir, con mayor contenido de nitrógeno), sugiriendo ello el hecho de que, el nitrógeno, era limitativo del crecimiento (Tabla 2).

La formación, el rendimiento productivo y la melanización de las microesclerotias, mediante el hongo *M. anisopliae*, era dependiente de la cepa y dependiente del medio (véase, a dicho efecto, la Tabla 3). Mientras que, la formación de microesclerotias podía verse en todos los medios, y con todas las cepas de *M. anisopliae*, los más altos grados de concentración, se midieron en los días 4 y 8 post-inoculación, en un medio rico (correspondiente a una cantidad de carbono de 36 g / l), mediante la cepa F52 de *M. anisopliae*. En el día 8, los medios ricos con unos altos factores de relación de carbono con respecto a nitrógeno, correspondientes unos valores de 30 : 1 y de 50 : 1, proporcionaron, de una forma respectiva, unos rendimientos productivos de $2,7 \times 10^5$ microesclerotias / ml y de $2,9 \times 10^5$ microesclerotias / ml (véase, a dicho efecto, la Tabla 3). Las microesclerotias formadas por la cepa de *M. anisopliae* F52, en el medio con un factor de relación de carbono con respecto a nitrógeno, correspondiente a un valor de 50 : 1, se melanizaron de una forma mayor, en comparación con las microesclerotias formadas en el medio con más altos factores de relación de carbono con respecto a nitrógeno.

La tolerancia a la desecación de las microesclerotias secadas al aire, procedentes de cultivos de 8 años de edad, mostraron el hecho de que, todos los cultivos y todas cepas del hongo *M. anisopliae*, produjeron microesclerotias, las cuales sobrevivieron al proceso de secado, sin ninguna pérdida que fuera significativa en cuanto a lo referente a la viabilidad, y excepto en cuanto a lo referente a aquellos cultivos, los cuales se habían hecho crecer en un medio débil, con un bajo contenido de nitrógeno [8 g / l de carbono, con un factor de relación carbono con respecto a nitrógeno correspondiente a un valor de 50 : 1 (véase a dicho efecto, la Tabla 4)]. La producción de conidias, mediante las microesclerotias secadas al aire, era para todas las cepas de hongos de *M. anisopliae*, de una forma independiente del medio utilizado, la correspondiente a un valor mayor de 1×10^8 conidias / g de formulación (elaboración) seca (véase, a dicho efecto, la Tabla 4).

De una forma general, las formulaciones (elaboraciones) de las microesclerotias procedentes de los medios ricos (medio 4, medio 5 y medio 6), produjeron cantidades numéricas mayores de conidias, cuando se procedía a hacer una comparación con los formulados o elaboraciones de microesclerotias derivados de los medios con unas concentraciones más bajas de carbono. De una forma adicional, los cultivos de *M. anisopliae* que se habían hecho crecer en medios ricos, produjeron una mayor cantidad de biomasa (véase, a dicho efecto, la Tabla 2), lo cual dio como resultado unos rendimientos productivos más altos de las formulaciones o elaboraciones de microesclerotias.

Ejemplo 2

Valoración de la excrecencia fúngica y de la esporulación de microesclerotias en diferentes suelos

Se procedió a evaluar la excrecencia (extensión) fúngica y la esporulación de la cepa de *M. anisopliae* MA1200, a partir de gránulos microescleróticos producidos a partir de los medios consistentes en el medio 4, el medio 5 y el

medio 6, en placas de suelos húmedos. Los gránulos, se prepararon de la misma forma que la que se ha descrito anteriormente, arriba, éstos se tamizaron a un valor de 0,6 mm – 1,7 mm de tamaño de partícula, y se almacenaron en bolsas de plástico selladas, a una temperatura correspondiente a un valor comprendido dentro de unos situados entre 5 °C – 7 °C, durante un transcurso de tiempo de 9 meses, previamente a la utilización de éstos. Se procedió a secar, de una forma separada, un suelo de tipo arcilloso procedente de un campo de remolachas azucareras, situado en Sidney MT, un suelo arcilloso, limoso, recolectado de un campo de remolachas azucareras, situado en las cercanías de St. Thomas, ND, y un suelo arcilloso – limoso, procedente de Torrington, WY, secado por separado éste, el cual se reahizó al aire, a un contenido de humedad correspondiente un porcentaje inferior a un 2 %, procediéndose a pulverizar y tamizar los distintos suelos, a través de un tamiz de 20 mesh (U. S.), para la consecución de un rango de tamaño de partícula uniforme. La textura del suelo, se determinó mediante la utilización de procedimientos estándar (Véase, a dicho efecto, el trabajo de Sheldrick y Wang, 1993, Particle size distribution, - Distribución del tamaño de partícula -, en Soil Sampling and Methods of Analysis, - Muestreo de suelos y procedimientos de análisis -, M. R. Carter, Ed. Can. Soc. Soil Science, Lewis Publishers, Boca Raton, FL, páginas 499 - 512). Todos los suelos sometidos a tests de ensayo, resultaron ser no estériles. Se procedió a emplazar los tres sólidos, en placas de Petri, y éstos se humectaron, con agua sometida a ósmosis inversa, a una capacidad de campo correspondiente a un porcentaje del 20 % (según se había determinado previamente para cada suelo). Los gránulos que contenían las microescleróticas de *M. anisopliae* procedentes de cada medio de producción, se rociaron sobre la superficie de las tres placas de replicados de cada suelo. Se procedió, a continuación, a emplazar las placas en bolsas de plástico resellables, y éstas se incubaron a una temperatura de 25 °C. Los gránulos, se examinaron de una forma visual, en cuanto a lo referente a la excrecencia fúngica y a la conidiación, 3 días y 7 días después

Se procedió así mismo, también, a la evaluación de la excrecencia fúngica y a la esporulación de las cepas de *M. anisopliae* MA1200, F52 y TM109, producidas a partir del Medio 5 y de los gránulos a base de arenilla o sémola de maíz de la cepa de *M. anisopliae* F52 (véanse, a dicho efecto, los bioensayos que se facilitan abajo, a continuación), en placas de suelo arcilloso, húmedas. El suelo arcilloso estéril, era el mismo que el que se había utilizado anteriormente. El protocolo de la evaluación, era tal y como el que se ha descrito previamente, con observaciones visuales diarias, las cuales se iniciaron en el día 3.

Resultados

Medio 4 (factor de relación C : N = 10 : 1, 36 g de carbono / l), gránulos: En el día 3, se encontraba presente una excrecencia fúngica típica de *M. anisopliae*, en todos los gránulos de microescleróticos incubados en los tres suelos sometidos a test de ensayo. Se produjo una cantidad menor a un porcentaje del 10 %, indicativa de una conidiación inicial. En el día 7, los gránulos microescleróticos, se encontraban extensamente cubiertos por un himenio fúngico pero, la condición, no era prominente.

Medio 5 (factor de relación C : N = 30 : 1, 36 g de carbono / l), gránulos: En el día 3, se encontraba presente una excrecencia fúngica compacta y una conidiación, en la totalidad de los gránulos de los tres suelos. Existía así mismo, también, un pequeño crecimiento filamentoso más erecto. En el día 7, se encontraba presente una intensa conidiación de *M. anisopliae*, en todos los gránulos en la totalidad de los tres suelos.

Medio 6 (factor de relación C : N = 50 : 1, 36 g de carbono / l), gránulos: En el día 3, se encontraba presente una excrecencia fúngica, la cual era débil e irregular (con manchas irregulares), en los suelos arcillosos, limosos, y en los suelos arenosos, limosos. En el suelo de arcilla, la excrecencia fúngica, era muy escasa y dispersa. En el día 7, la excrecencia fúngica, y la conidiación verde típica, había acontecido en, esencialmente, la totalidad de los gránulos de los tres suelos. Mientras que, no se había procedido a cuantificar la extensión de la conidiación, los niveles de conidiación para los varios suelos sometidos a test de ensayo, siguieron el modelo patrón; suelo arcilloso limoso > suelo arenoso limoso > suelo arcilloso.

En el día 3, los gránulos microescleróticos de MA 1200, F52 y TM109, tenían excreciones fúngicas, de una forma distinta a los que sucedía con los gránulos de sémola de maíz la cepa de *M. anisopliae* F52. Los gránulos de la cepa TM109, tenían unos himenios compactos en sus superficies, con unas áreas de conidiación profusa. Las excrecencias, en gránulos de las cepas F 52 y MA1200, eran menos robustas; los gránulos de la cepa F52, tenían una conidiación más visible que la correspondiente a la cepa MA1200. Hubo una excrecencia muy pequeña, en los gránulos de sémola de maíz que tenían la cepa F 52, consistiendo, el mayor crecimiento, en capas de micelas simples, dispersas y diseminadas. En el día 4, la conidiación, era visible y se encontraba en curso, con las cepas de MA1200 y TM109, sobre los gránulos de sémola de maíz, pero ésta se encontraba ausente, en los gránulos de sémola de maíz inoculada con la cepa F52. En el día 5, todos los gránulos microescleróticos de *M. anisopliae*, tenían una conidiación verde, compacta y profusa. En comparación con los gránulos microescleróticos, los gránulos de sémola de maíz, de todas las cepas de *M. anisopliae* sometidas a test de ensayo, continuaron teniendo una excrecencia fúngica y una pequeña conidiación, hasta los días 7 – 8 (véase, a dicho efecto, la Figura 2). Subsiguientemente al día 8, la esporulación, se convirtió en más robusta, pero ésta, nunca logró alcanzar la misma extensión visual que la correspondiente a los gránulos microescleróticos.

Ejemplo 3Eficacia relativa de los gránulos microescleróticos producidos mediante el sexto Medio, en el Ejemplo 1

La eficacia biológica relativa de los gránulos microescleróticos producidos por la cepa F52, en los seis medios, se evaluó mediante la utilización de bioensayos a base de suelos, con larvas de gusanos de la raíz de la remolacha azucarera (SBRM - [del inglés, sugarbeet root maggots] -). Se procedió a incorporar gránulos (de 20 / 30 mesh), de la cepa F32, procedente de los seis medios, al interior de un suelo de arcilla, no estéril, tamizado, que se había utilizado previamente a una tasa correspondiente a un valor de 14 mg de gránulos / 50 g de suelo. Se evaluaron dos lotes de producción de gránulos, por separado. Los gránulos, se habían almacenado en bolsas de plástico, selladas, a una temperatura correspondiente a un valor de $5^{\circ}\text{C} - 9^{\circ}\text{C}$, durante un transcurso de tiempo de 7 meses, previamente a proceder a su uso. Los suelos, se humedecieron con agua sometida a osmosis inversa, a un punto final de un 15 % de Capacidad de Campo (el cual se había determinado previamente), y los potenciales de agua, se determinaron con la ayuda de medidor de humedad de la marca AQUALAB (de la firma Decagon products, Pullman, WA). Las mezclas de suelo resultantes, eran de $0,982 - 0,983 A_w$ ($-2,32$ a $-2,47$ MPa de potencial mátrico) (A_w = actividad de agua), humedades éstas, las cuales eran suficientes para la excrecencia fúngica y la esporulación. El punto de marchitación permanente, para la mayoría de las plantas, es el correspondiente a un valor de $0,989 A_w$. Se procedió a preparar un suelo de control, no tratado, simplemente, humectando (hidratando) un alícuoto adicional de suelo, sin ningún gránulo, con la misma cantidad de agua. Se procedió, a continuación, a dispensar el suelo tratado y el suelo de control, de una forma igualitaria, en tres copas de condimento, de plástico, provistas de tapa. Las capas, se sellaron y se emplazaron en un paño o toalla de una capa humedecida con agua (con objeto de mantener la humedad) en un recipiente contenedor de plástico, provisto de tapa, y éstas se incubaron, a una temperatura de 24°C . Después de un transcurso de tiempo de 1 semana, se procedió a infestar los suelos, con 10 larvas de SBRM (gusanos de la raíz de la remolacha azucarera) en el tercer estadio, por capa. Estas larvas, se recolectaron por campos, en estado de diapausa, todavía motil y no alimentándose y, éstas, se habían almacenado en arena estéril, húmeda, a una temperatura correspondiente a un valor situado en $3^{\circ}\text{C} - 4^{\circ}\text{C}$, durante un transcurso de tiempo de varios meses, previamente a su utilización. Cada uno de los tratamientos, se repitió un número de tres veces. La mortalidad de las larvas, se determinó semanalmente, durante un transcurso de tiempo de tres semanas. Cada semana, se procedió a retirar todos los cadáveres y, éstos, se emplazaron a una humedad relativa correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes situados entre un 95 % - 100 % de alta humedad, durante un transcurso de tiempo de tres días, con objeto de elicitar la presencia de micosis. Se procedió a evaluar, de esta misma forma, dos lotes separados de producción.

Para los análisis estadísticos de datos de biomasa, se procedió a ajustar todos los datos de mortalidad, para controlar la mortalidad, cuando fuera necesario, mediante la aplicación de la corrección de Abbott (Abbott, 1925) y, a continuación, éstos se sometieron a una transformación angular, antes de proceder a los análisis adicionales. Los datos, se sometieron, a continuación, a tests de ensayo de separación media de ANOVA y de HSD de Tukey (HSD = del inglés, diferencia honestamente significativa), cuando se hubieron identificado los efectos significativos del tratamiento.

Resultados

No hubieron diferencias significativas en cuanto a lo referente a la eficacia, entre los dos lotes de producción de gránulos microescleróticos, para cualesquiera de los medios tratados, en unos transcurso de tiempo correspondientes a 1 semana y a 3 semanas ($F = 0,06$, $p = 0,83$, para la semana 1; $F = 1,51$, $p = 0,34$ para la semana 3), y una diferencia apenas significativa en la semana 2 ($F = 23,94$, $p = 0,04$), debido a las mortalidades procedentes de los gránulos microescleróticos del Medio 1, las cuales eran significativamente diferentes entre los dos lotes. La mortalidad de control, para los SBRM (gusanos de la raíz de la remolacha azucarera), era de un porcentaje del 0 %, incluso después de un transcurso de tiempo de tres semanas. Los datos, se encuentran recopilados en la Tabla 5. Existían unas diferencias significativas, entre las mortalidades tempranas de los gránulos producidos en el medio seis, en ambos lotes, una semana después de que, los suelos, se hubieron infestado con larvas ($F = 6,41$, 5 df, $p = 0,004$ para el Lote E050509, y $F = 4,94$, 5 df, $p = 0,011$ para el Lote E050516). Cuando se procedió a agrupar los datos para ambos lotes, los gránulos del Medio 4, y del Medio 5, eran significativamente mejores que los correspondientes al resto (HSD de Tukey, $P = 0,05$). A los tres días de después de la infestación, las mortalidades de las larvas, habían alcanzado un porcentaje del 100 % en la mayoría de los tratamientos, desapareciendo las diferencias significativas entre los medios 2 - 6; los gránulos del Medio 1, proporcionaron unos rendimientos productivos más bajos que los correspondientes al resto.

Ejemplo 4Comparación de la eficacia de los gránulos microescleróticos con gránulos de portador (soportes) nutritivos convencionales, en dos suelos diferentes

Se procedió a llevar a cabo un bioensayo, con objeto de comparar los gránulos microescleróticos de la cepa F52, del Medio 5, con gránulos a base de semilla de maíz, del tipo más convencional, los cuales se habían utilizado en

trabajos de laboratorio y en ensayos de campo, contra el SBRM (gusano de la raíz de la remolacha azucarera) (Jaronski et al., 2006, Challenges in using *Metarhizium anisopliae* for control of Sugarbeet Root Maggot, *Tetanops myopaeformis*, - Retos en la utilización de *Metarhizium anisopliae* para el control del gusano de la raíz de la remolacha azucarera, *Tetanops myopaeformis* - Bull. ent. IOBC / wprs 30 (7) : 119 - 124; Campbell et al., 2006, Environmental Entomology, - Entomología medioambiental -. 35 (4) : 986 - 991; Jaronski & Campbell, 2006, 2005 Sugarbeet Research and Extension Reports, - Investigación de la remolacha azucarera y reportes de extensión - . 36 : 185 - 189; Majumdar et al., 2006, 2005 Sugarbeet Research and Extension Reports. 36 : 222 - 227). La evaluación, se llevó a cabo en dos suelos, un suelo arcilloso - limoso, recolectado de un campo de remolachas azucareras en las inmediaciones de St. Thomas, ND, y el suelo de arcilla utilizado anteriormente. Los gránulos de sémola de maíz, consistían en portador o soporte de sémola de maíz de un tamaño de partícula de 16 / 30 mesh, (Bunger Milling, St. Louis, MO), recubierto con conidias, mediante la utilización de un ligante acuoso de monooleato de polioxietileno sorbitán (TWEEN 80), al 10 %. La concentración objetivizada como diana de las conidias, en estos gránulos, era la correspondiente a un valor de $1 - 2 \times 10^5$ conidias / gránulo. Estos gránulos a base de sémola, se prepararon eficientemente, mediante la utilización de conidias secas, producidas mediante la fermentación de substratos sólidos, y se refrigeraron hasta su uso. Los gránulos microescleróticos secos del Medio 5, se tamizaron a un tamaño de 20 / 32 mesh, previamente a su utilización. Cuando éstos se emplazaron en un entorno medioambiental lo suficiente húmedo ($A_w > 0,95$), tal como el consistente en agar de agua, suelo húmedo, o papel de filtro húmedo, los gránulos de sémola de maíz, se cubrieron con una segunda generación de conidias, en un transcurso de tiempo de 7 - 10 días, mediante que, los gránulos microescleróticos, esporularon profundamente, en un transcurso de tiempo de 3 - 4 días. Los bioensayos, se llevaron a cabo de la forma que se ha descrito anteriormente, arriba, pero, con una tasa correspondiente a un valor de 112 mg de gránulos / 60 gamos de suelo seco. Los suelos, se hidrataron a un valor correspondiente a un porcentaje del 15 % de Capacidad de Campo, para cada uno de los suelos. Este nivel de humedad, tuvieron como resultado unos valores medidos de A_w de 0,983 y 0,984, para los dos suelos, según se determinó mediante un dispositivo de medición del tipo "Aqualab meter". Para cada tratamiento, se utilizaron tres copas de replicación, de 10 larvas, cada una de ellas. Las larvas de SBRM (gusano de la raíz de la remolacha azucarera), se añadieron después de que, los suelos, se hubieron incubado, durante un transcurso de tiempo de 1 semana, a una temperatura de 24 °C. Las mortalidades de las larvas, se determinaron después de unos transcurros de tiempo correspondientes a 1, 2, y 3 semanas, de la forma que se ha descrito anteriormente, arriba.

Resultados

En ambos tipos de suelos, el suelo de arcilloso - limoso y el suelo de arcilla, los gránulos microescleróticos procedentes del Medio 5, tenían una eficacia significativamente mayor que la correspondiente al gránulo de sémola de maíz, cubierto con conidia, más tradicional. La mortalidad del gránulo microesclerótico, era la correspondiente a un porcentaje correspondiente a un porcentaje del 100, dentro de un transcurso de tiempo de 1 semana de los suelos tratados, infestados con larvas (véase, a dicho efecto la Tabla 6). En el suelo de arcilla, los gránulos a base de sémola de maíz, provocaron únicamente una mortalidad correspondiente a un pequeño porcentaje de la mortalidad de las larvas.

Ejemplo 4

Comparación de la eficacia de los gránulos microescleróticos con gránulos de soportes nutritivos convencionales, a diferentes humedades del suelo

Se procedió a llevar a cabo bioensayos adicionales, con objeto de comparar los gránulos microescleróticos de sémola de maíz, a distintas humedades del suelo. Los gránulos, se incorporaron en un suelo de arcilla, a una tasa correspondiente a un valor de 1,8 mg / g de suelo, y subsiguientemente, éstos se humidificaron al deseado punto final de humedad, con agua. Estos ensayos, se llevaron a cabo de la forma que se ha descrito anteriormente, arriba, con 3 copas de replicado, con 10 larvas cada una de ellas, por tratamiento, excepto en cuanto al hecho consistente en que, el suelo de arcilla, se humedeció a unos porcentajes correspondientes a un valor del 7,5 % ($A_w = 0,919$), del 15 % ($A_w = 0,983$, ó del 20 % ($A_w = 0,991$) de Capacidad de Campo. Los niveles de humedad, se verificaron dos días después de la inoculación con conidias e hidratación, mediante la utilización de un dispositivo de medición de la actividad de agua, del tipo AQUALAB (Decagon Devices), Inc.). El ensayo en su totalidad, se replicó dos veces. La mortalidad de las larvas se determinó mediante muestreo destructivo, 3 semanas después. Se procedió a retirar cualesquiera cadáveres sin hongos de esporulación sobre sus exteriores, y éstos se incubaron a un alto porcentaje de humedad, durante un transcurso de tiempo de tres días, con objeto de evidenciar la presencia de micosis.

Resultados

Cuando se procedió a comparar la eficacia de los gránulos microescleróticos del Medio 5, con los gránulos de sémola de maíz, a diversos niveles de humedad del suelo, el primero, provocó una mortalidad de SBRM (gusanos de la raíz de la remolacha azucarera), la cual era significativamente mayor, a unos niveles correspondientes a un valor de 0,919 A_w y por encima (véase, a dicho efecto, la Figura 1). La mortalidad de las larvas, era la correspondiente a un porcentaje del 100 %, en comparación con la correspondiente a unos porcentajes del 20 % y

del 30 %, para los gránulos a base de sémola de maíz, a unos niveles de A_w , correspondientes a unos valores de 0,983 y de 0,991. A un nivel de la humedad correspondiente a un valor de 0,919 unidades de Actividad de Agua, la mortalidad de las larvas procedentes de la exposición a los gránulos microescleróticos, era la correspondiente a un porcentaje del 20 %, en comparación con la correspondiente a un porcentaje del 6 %, para los gránulos de sémola de maíz. La mortalidad de control, era la correspondiente a un porcentaje inferior a un 10 %, para todos los niveles de humedad. En total, los gránulos microescleróticos, provocaron un tan alto porcentaje de mortalidad, en estos suelos infrasaturados, debido al hecho de que, las microesclerotias, produjeron más conidias infecciosas, de una forma más rápida que la correspondiente a la formulación de gránulos convencionales. Estos datos, acentúan la superioridad de los gránulos microescleróticos, con respecto a los substratos nutritivos que contenían conidias.

Tabla 1

Concentración de carbono (g L^{-1}) y factor de relación de carbono con respecto al nitrógeno, en los cultivos líquidos utilizados para la valoración del crecimiento y los rendimientos productivos de diferentes cepas de *M. anisopliae*.

C (g L^{-1})	C : N	Glucosa (g L^{-1})	Casaminoácidos (g L^{-1})
8	10 : 1	10,6	10,0
8	30 : 1	16,6	3,4
8	50 : 1	18,0	2,0
36	10 : 1	45,0	45,0
36	30 : 1	75,0	15,0
36	50 : 1	81,0	9,0

Tabla 2

Comparación de varios medios en la producción de biomasa, mediante *Metarhizium anisopliae* en un cultivo líquido, después de 2 días, de 4 días y de 8 días de crecimiento.

<i>Metarhizium anisopliae</i> Aislamiento Medio		Concentración de carbono (g/l)	Factor de relación del carbono con respecto al nitrógeno	Biomasa (mg / l)		
				Día 2	Día 4	Día 8
Ma 1200	1	8	10 : 1	2,5 a	5,5 d	3,8 d
	2	8	30 : 1	2,5 a	4,5 d	5,0 d
	3	8	50 : 1	1,5 a	4,5 d	4,4 d
	4	36	10 : 1	2,7 a	22,2 a	26,6 a
	5	36	30 : 1	3,5 a	14,8 b	18,9 b
	6	36	50 : 1	2,1 a	10,0 c	13,3 c
F 52	1	8	10 : 1	1,1 c	8,2 d	3,2 c
	2	8	30 : 1	3,4 a	5,4 e	5,5 c
	3	8	50 : 1	1,7 c	4,0 e	3,5 c
	4	36	10 : 1	2,0 b, c	22,6 a	33,0 a
	5	36	30 : 1	3,8 a	19,7 b	21,6 b
	6	36	50 : 1	3,2 a, b	11,8 c	18,3 c
TM109	1	8	10 : 1	0,8 c	5,2 c	4,5 d
	2	8	30 : 1	0,7 c	3,1 c, d	3,8 d
	3	8	50 : 1	0,6 c	2,2 d	4,0 d
	4	36	10 : 1	1,0 b, c	12,7 a, b	30,5 a
	5	36	30 : 1	1,7 a	13,7 a	24,0 b
	6	36	50 : 1	1,5 a, b	10,6 b	14,0 c
Para cada uno de los aislamientos, los valores medios, seguidos por diferentes letras, son significativamente diferentes, mediante la utilización de HSD de Turkey – Kramer. Los valores medios, se derivan de 6 valores (3 experimentos por separado, llevados a cabo por duplicado, para cada tratamiento).						

Tabla 3

Comparación de varios medios en la producción de microesclerotias, mediante *Metarhizium anisopliae* en un cultivo líquido, después de 2 días, de 4 días y de 8 días de crecimiento.

<i>Metarhizium anisopliae</i> Aislamiento Medio		Concentración de carbono (g/l)	Factor de relación del carbono con respecto al nitrógeno	Biomasa (microesclerotas / ml x 10 ⁴)		
				Día 2	Día 4	Día 8
Ma 1200	1	8	10 : 1	3,1 a	10,6 a, b	15,3 a
	2	8	30 : 1	0,5 b	2,7 c	6,4 b, c
	3	8	50 : 1	0,5 b	2,4 c	4,9 c
	4	36	10 : 1	1,7 a, b	5,7 b, c	12,0 a, b
	5	36	30 : 1	2,3 a, b	7,7 b, c	9,3 a, b, c
	6	36	50 : 1	2,1 a, b	15,3 a	14,7 a
F 52	1	8	10 : 1	0,8 b	10,5 a	5,3 b
	2	8	30 : 1	1,7 b	6,4 a, b	11,7 b
	3	8	50 : 1	2,3 b	5,0 b	8,5 b
	4	36	10 : 1	8,0 a	10,3 a	9,3 b
	5	36	30 : 1	7,9 a	11,0 a	27,0 a
	6	36	50 : 1	9,5 a	6,8 a, b	29,0 a
TM109	1	8	10 : 1	0,0 a	2,0 a, b	1,2 a
	2	8	30 : 1	0,7 a	1,2 b,	1,8 a
	3	8	50 : 1	0,6 a	0,2 b	1,0 a
	4	36	10 : 1	0,2 a	1,9 a, b	5,3 a
	5	36	30 : 1	0,5 a	2,0 a, b	3,7 a
	6	36	50 : 1	0,3 a	4,9 a	3,9 a

Para cada uno de los aislamientos, los valores medios, seguidos por diferentes letras, son significativamente diferentes, mediante la utilización de HSD de Turkey – Kramer. Los valores medios, se derivan de 6 valores (3 experimentos por separado, llevados a cabo por duplicado, para cada tratamiento).

Tabla 4

- 5 Evaluación de la tolerancia a la desecación y de la capacidad de producción de conidias de microesclerotas de *Metarhizium anisopliae* secadas al aire.

<i>Metarhizium anisopliae</i> Aislamiento Medio		Concentración de carbono (g/l)	Factor de relación del carbono con respecto al nitrógeno	Geminación hifálica (% de microesclerotas))	Germinación esporogénica (conidias / g de formulado seco x 10 ⁷)
Ma 1200	1	8	10 : 1	100 a	24,0 b
	2	8	30 : 1	100 a	29,5 b
	3	8	50 : 1	87 b	28,0 b
	4	36	10 : 1	100 a	42,3 b
	5	36	30 : 1	100 a	97,5 a
	6	36	50 : 1	99 a	21,5 b
F 52	1	8	10 : 1	99 a	53,5 b
	2	8	30 : 1	96 a	64,5 b
	3	8	50 : 1	99 a	46,5 b
	4	36	10 : 1	100 a	114,5 a
	5	36	30 : 1	100 a	82,5 a, b
	6	36	50 : 1	97 a	82,3 a, b
TM109	1	8	10 : 1	85 a, b	18,1 b
	2	8	30 : 1	93 a, b	15,4 b
	3	8	50 : 1	46 b	16,0 b
	4	36	10 : 1	100 a	81,3 a, b
	5	36	30 : 1	100 a	94,3 a
	6	36	50 : 1	100 a	63,8 a, b

Para cada uno de los ensayos, los valores medios, seguidos por diferentes letras, son significativamente diferentes, mediante la utilización de HSD de Turkey – Kramer. Los valores medios, se derivan de 6 valores (3 experimentos por separado, llevados a cabo por duplicado, para cada tratamiento).

Tabla 5

- 5 Mortalidad de las larvas de *Tetanops myopaeformis* en el tercer estadio, expuestas a suelos tratados con gránulos microescleróticos, después de 1 u no s trans cursos de tiempo de 1 semana, de 2 semanas y de 3 semanas post-infestación. Gránulos de microescleróticas de la cepa F 52 de *Metarhizium anisopliae*, preparada a partir de cultivos líquidos producidos en los medios 1 – 6.

	1 semana		2 semanas		3 semanas	
Tratamiento	Mortalidad*	Micosis	Mortalidad* Micosis		Mortalidad* Micosis	
Test de ensayo 1 (Lote 050509)						
Medio 1	0 % b	-	23,3 % b	71,4 %	46,7 % b	71,4
Medio 2	6,7 % a b	50,0 %	50 % a b	100 %	96,7 % a	100 %
Medio 3	10,0 % a b	66,7 %	63,3 % a	100 %	100 % a	100 %
Medio 4	36,7 % a	100 %	76,7 % a	100 %	100 % a	100 %
Medio 5	26,7 % a	75 %	56,7 a	100 %	96,7 % a	100 %
Medio 6	6,7 % a b	100 %	70,0 % a	100 %	100 % a	100 %
Estadística ANOVA	F= 6,41, 5 d f 0,004 p =		F = 7, 55, 5 d f, P = 0,002		F = 19,9, 5 d f, P < 0,001	
Test de ensayo 2 (Lote 050516)						
Medio 1	0,0 % b		63,3 % a	94,5 %	86,7 % a	85,7 %
Medio 2	6,7 % b	100 %	76,7 % a	81 %	96,7 % a	100 %
Medio 3	0,0 %		53,3 % a	81,3 %	96,7 % a	100 %
Medio 4	26,7 % a	100 %	70 % a	100 %	100 % a	100 %
Medio 5	16,7 % a b	80 %	70 % a	100 %	90 % a	100 %
Medio 6	13,3 % a b	75 %	73 % a	100 %	96,7 % a	100 %
Estadística ANOVA	F= 4,94, 5 d f 0,011 p =		F = 0,66, 5 d f, P = 0,66		F = 0,93, 5 d f, P = 0,49	
Las mortalidades son la media de tres replicados y, si éstas se siguen de diferentes letras en una columna, éstas son significativamente diferentes (HSD de Turkey, p < 0,05).						

10

Tabla 6

- 15 Mortalidad de las larvas de *Tetanops myopaeformis* en el tercer estadio, expuestas a suelos tratados con gránulos microescleróticos, después de 1 u no s trans cursos de tiempo de 1 semana, de 2 semanas y de 3 semanas post-infestación. Las mortalidades son la media de tres replicados (SD) y, si éstas se siguen de diferentes letras en una columna, éstas son si gnificativamente diferentes (HSD de Turkey, p < 0,05). La micosis, era de un porcentaje del 100 %, entre la totalidad de los cadáveres.

Suelo	Tratamiento	Mortalidad		
		1 semana	2 semanas	3 semanas
Arcilla	No tratado	0 % a	0 % a	0 % a
Gránul	o micro-esclerótico	100 % b	100 % c	100 % c
	Gránulo de sémola de maíz	0 % a	23,3 % (15,3 %) b	26,7 % (15,3 %) b
Arcilloso – limoso	No tratado	0 % a	0 % a	0 % a
Gránul	o micro-esclerótico	100 % b	100 % c	100 % c
	Gránulo de sémola de maíz	0 % a	0 % a	0 % a

20

REIVINDICACIONES

- 1.- Microesclerotias aisladas de un hongo entomopatógeno seleccionado de entre el grupo consistente en las especies *Metarhizium*, tales como las consistentes en la *Metarhizium flavoviride* y la *Metarhizium anisopliae*, y las especies *Lecanicillium*.
- 2.- Las microesclerotias aisladas de la reivindicación 1, en donde, el citado hongo entomopatógeno, es substancialmente biológicamente puro.
- 3.- Una composición, la cual comprende una cantidad insecticidamente efectiva de microesclerotias secas de un hongo entomopatógeno, seleccionado de entre el grupo consistente en las especies *Metarhizium*, tales como las consistentes en la *Metarhizium flavoviride*, o la *Metarhizium anisopliae*, y las especies *Lecanicillium*, con un portador agrónomicamente aceptable, microesclerotias éstas, las cuales, germinan hifálicamente, o esporogénicamente, después de la rehidratación, para producir un conidia aérea, infectiva.
- 4.- La composición de la reivindicación 3, en donde, el citado hongo entomopatógeno, es substancialmente puro.
- 5.- La composición de la reivindicación 3, en donde, las citadas microesclerotias, se producen mediante cultivo líquido, y éstas se encuentran presentes en la biomasa recuperada, en una concentración de por lo menos aproximadamente 1×10^6 microesclerotias por gramo de biomasa.
- 6.- Un procedimiento para el control de los insectos, el cual comprende la aplicación al locus de los citados insectos, una cantidad insecticidamente efectiva de microesclerotias de un hongo entomopatógeno, seleccionado de entre el grupo consistente en las especies *Metarhizium*, tales como la *Metarhizium flavoviride* y la *Metarhizium anisopliae*, y las especies de *Lecanicillium*.
- 7.- El procedimiento de la reivindicación 6, en donde, los citados insectos, se seleccionan de entre el grupo consistente en los gorgojos de las raíces, los gusanos del suelo, los gusanos de las raíces, los gusanos laminadores, las moscas de la fruta, y los gorgojos de las raíces.
- 8.- El procedimiento de la reivindicación 6, en donde, los citados insectos, se seleccionan de entre el grupo consistente en las termitas subterráneas (especies *Reticulitermes* y *Coptotermes*), los gusanos de las raíces de la maíz (de las especies *Diabrotica*), a los gorgojos negros de la vid (*Otiorynchus sulcatus*), a los gusanos laminadores (larvas de la familia *Elateridae*), a los gorgojos de las raíces de los cítricos (*Diaprepes abbreviatus*), a los gorgojos de las raíces de la remolacha azucarera (*Tetanops myopaeformis*), a los gorgojos de la col o repollo / del nabo / de la cebolla / del maíz de siembra (especies *Delia*), a las moscas (del moho) de la zanahoria (*Psila rosae*), a los gorgojos de la patata dulce (*Cylas formicarius*), a los escarabajos japoneses (*Popillia japonica*), y a los abejorros europeos (*Rhizotrogus majalis*).
- 9.- El procedimiento de la reivindicación 7, en donde, la citada aplicación, comprende la aplicación de las citadas microesclerotias al suelo, o a una mezcla de cultivo sin suelo, de invernadero.
- 10.- El procedimiento de la reivindicación 6, en donde, los citados insectos, son insectos que habitan dentro del follaje de las plantas o en las cortezas de los árboles, seleccionados de entre el grupo consistente en el escarabajo barrenador meraldado del fresno (*Agrilus planipennis*), en la polilla o palomilla gitana (*Lymantria dispar*), y en el gorgojo de la pecana (*Curculio caryae*), de una forma preferible, en donde, las citadas microesclerotias, se aplican a la corteza y a la canopia de las plantas y de los árboles.
- 11.- Uso de una cantidad insecticidamente efectiva de microesclerotias secas procedentes de un hongo entomopatógeno seleccionado de entre el grupo consistente en las especies *Metarhizium*, tales como las consistentes en la especie *Metarhizium flavoviride*, o la especie *Metarhizium anisopliae*, para el control de los insectos, en donde, los citados insectos, se seleccionan, de una forma preferible, de entre el grupo consistente en los gorgojos de las raíces, los gusanos del suelo, los gusanos de las raíces, los gusanos laminadores, las moscas de la fruta, y los gorgojos de las raíces.
- 12.- El uso de la reivindicación 11, en donde, los citados insectos, se seleccionan de entre el grupo consistente en las termitas subterráneas (especies *Reticulitermes* y *Coptotermes*), los gusanos de las raíces del maíz (de las especies *Diabrotica*), a los gorgojos negros de la vid (*Otiorynchus sulcatus*), a los gusanos laminadores (larvas de la familia *Elateridae*), a los gorgojos de las raíces de los cítricos (*Diaprepes abbreviatus*), a los gorgojos de las raíces de la remolacha azucarera (*Tetanops myopaeformis*), a los gorgojos de la col o repollo / del nabo / de la cebolla / del maíz de siembra (especies *Delia*), a las moscas (del moho) de la zanahoria (*Psila rosae*), a los gorgojos de la patata dulce (*Cylas formicarius*), a los escarabajos japoneses (*Popillia japonica*), y a los abejorros europeos (*Rhizotrogus majalis*).

13.- El uso de la reivindicación 12, en donde, la citada aplicación, comprende la aplicación de las citadas microesclerotias al suelo, o a una mezcla de cultivo sin suelo, de invernadero.

14.- El uso de la reivindicación 11, en donde, los citados insectos, son insectos que habitan dentro del follaje de las plantas o en las cortezas de los árboles, seleccionados de entre el grupo consistente en el escarabajo barrenador esmeralda del fresno (*Agrilus planipennis*), en la polilla o palomilla gitana (*Lymantria dispar*), y en el gorgojo de la pecana (*Curculio caryae*), de una forma preferible, en donde, las citadas microesclerotias, se aplican a la corteza y a la canopia de las plantas y de los árboles.

15.- Un procedimiento para la producción, a partir de un hongo entomopatógeno, de una formulación la cual comprenda una alta concentración de microesclerotias fúngicas tolerantes a la desecación, el cual comprende las etapas de:

a) inocular un medio de cultivo líquido, el cual comprende una fuente de carbono y una fuente de nitrógeno con propágulos fúngicos de un hongo entomopatógeno seleccionado de entre el grupo consistente en las especies *Metarhizium*, tales como las consistentes en las especies *Metarhizium flavoviride*, ó *Metarhizium anisopliae*, y las especies *Lecanicillium*, teniendo, la citada fuente de nitrógeno, una concentración comprendida dentro de los márgenes situados entre 8,1 gramos / litro y 50 gramos / litro, y teniendo, la citada fuente de carbono, una concentración mayor de 20 gramos / litro;

b) incubar los propágulos durante un transcurso de tiempo suficiente como para permitir la producción de microesclerotias;

c) recolectar las microesclerotias resultantes; y

d) formular una formulación, la cual contenga una cantidad insecticidamente efectiva de aproximadamente 1×10^6 ó mayor, de microesclerotias por gramo de peso en seco de biomasa, recuperada del cultivo líquido

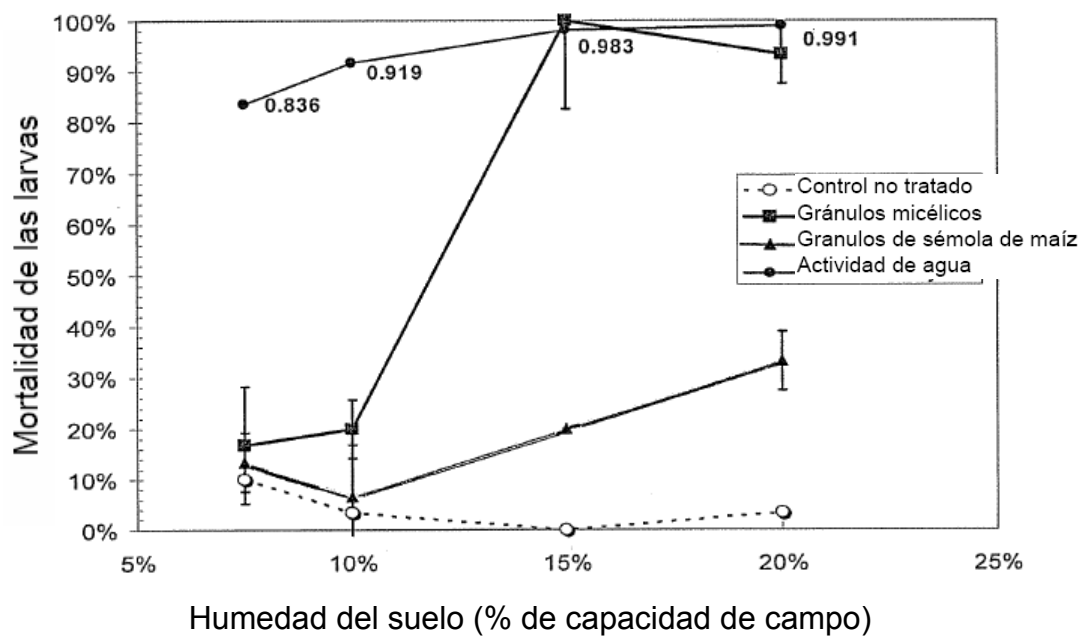


FIGURA 1