

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 689 558**

51 Int. Cl.:

**A01P 7/02** (2006.01)

**A01N 43/90** (2006.01)

**A01N 63/02** (2006.01)

**C12N 1/20** (2006.01)

**A01N 25/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.10.2012 PCT/US2012/061503**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.05.2013 WO13062977**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.10.2012 E 12842863 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.08.2018 EP 2770836**

54 Título: **Formulaciones, composiciones y metabolitos de Chromobacterium y sus usos**

30 Prioridad:

**25.10.2011 US 201161551403 P**

**25.10.2011 US 201161551014 P**

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

**14.11.2018**

73 Titular/es:

**MARRONE BIO INNOVATIONS, INC. (100.0%)**

**1540 Drew Avenue**

**Davis, CA 95618 , US**

72 Inventor/es:

**ASOLKAR, RATNAKAR;**

**NAMNATH, JAMES y**

**MARRONE, PAMELA**

74 Agente/Representante:

**INGENIAS CREACIONES, SIGNOS E**

**INVENCIONES, SLP**

ES 2 689 558 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

Formulaciones, composiciones y metabolitos de *Chromobacterium* y sus usos

5 **Campo técnico**

Se proporciona un método para modular una infestación por plagas, en donde dicha plaga se selecciona entre *Acari*, *Anthomyidae*, *Triozidae*, *Tenebrionidae*, *Scarabaeidae*, en una ubicación donde se desea la modulación que comprende aplicar una cantidad de una composición obtenida de *Chromobacterium subtsugae* cepa Nov (NRRL B-30655), eficaz para modular dicha infestación.

En el presente documento también se divulga el uso de composiciones o formulaciones que comprenden especies de *Chromobacterium*, filtrado, sobrenadante, extracto, compuesto con actividad plaguicida o metabolito procedente del mismo como acaricida e insecticida, en particular contra la infestación de una más plagas pertenecientes a las familias *Acarina*, *Scarabeidae*, *Triozidae*, *Aphidae*, *Anthomyiidae* o *Tenebrionidae*. Además, se proporcionan formulaciones de plaguicida biológico (también citadas como bioplaguicida), particularmente aquellas que comprenden especies de *Chromobacterium*, filtrado, sobrenadante, extracto, metabolitos o compuestos con actividad plaguicida procedentes de los mismos, métodos para producirlos y métodos de uso para modular la infestación por plagas. Más específicamente, se proporcionan plaguicidas biológicos estabilizados que tienen una vida útil mejorada debido a que mantienen la uniformidad física y una actividad insecticida más duradera tras su uso debido a su mayor resistencia a la degradación cuando se exponen a la luz.

**Antecedentes**

Los productos naturales son sustancias producidas por microbios, plantas y otros organismos. Los productos microbianos naturales ofrecen una fuente abundante de diversidad química y existe un largo historial de uso de productos naturales con fines farmacéuticos. A pesar del énfasis en los productos naturales para agentes terapéuticos en seres humanos, donde más de un 50% proceden de productos naturales, solo un 11% de los plaguicidas proceden de fuentes naturales. No obstante, los plaguicidas de productos naturales tienen el potencial de desempeñar un papel importante para controlar plagas en granjas tanto convencionales como orgánicas. Los metabolitos secundarios producidos por microbios (bacterias, actinomicetos y hongos) proporcionan nuevos compuestos químicos que pueden usarse solos o en combinación con compuestos conocidos para controlar de manera eficaz plagas de insectos y para reducir el riesgo de desarrollo de resistencia. Existen varios ejemplos bien conocidos de productos microbianos naturales que son exitosos como insecticidas agrícolas (Thompson et al., 2000; Arena et al., 1995; Krieg et al. 1983).

El desarrollo de un plaguicida microbiano comienza con el aislamiento de un microbio en un cultivo puro. Después, continúa con la evaluación de su eficacia y espectro usando ensayos *in vitro*, *in vivo* o piloto a escala en un invernadero y en el campo. Al mismo tiempo, se aíslan e identifican los compuestos activos producidos por el microbio. Para la comercialización de un plaguicida microbiano, el microbio ha de producirse de manera económica mediante fermentación a escala industrial y se formula con aditivos biocompatibles y aprobados para aumentar la eficacia y maximizar la facilidad de aplicación, así como su estabilidad durante el almacenamiento en condiciones de campo.

El documento WO 2012/061082 A2 divulga composiciones bioactivas y metabolitos de *Chromobacterium*. El documento WO 97/15187 describe composiciones plaguicidas protegidas frente a la radiación ultravioleta. P. A. W. MARTIN ET AL. divulgan *Chromobacterium subtsugae* sp. nov., una betaproteobacteria tóxica para el escarabajo de la patata de Colorado y otras plagas de insecto. PHYLLIS A W MARTIN ET AL. divulgan la toxicidad de *Chromobacterium subtsugae* para la chinche verde del sur (*Heteroptera: Pentatomidae*) y para el gusano de la raíz del maíz (*Coleoptera: Chrysomelidae*).

***Chromobacterium***

En 2000, la Dra. Martin y sus colaboradores en la USDA aislaron una bacteria con pigmentación púrpura (PRAA4-1) de un suelo forestal en Maryland (Martin et al., 2007a). En la evaluación inicial, observaron que esta bacteria era tóxica para el escarabajo de la patata de Colorado y otras plagas de insectos (Martin et al., 2007b). Esta bacteria gramnegativa móvil se identificó como una nueva especie de *Chromobacterium*, *Chromobacterium subtsugae* sp. nov (Martin et al., 2007c). Es una betaproteobacteria gramnegativa, móvil, aeróbica facultativa con flagelos polares. Las colonias que se forman a los 2-3 días en una placa de L-agar a 25°C tienen inicialmente un color crema, que vira gradualmente de violeta claro a oscuro durante las 24 horas posteriores. Las colonias de PRAA4-1 crecen bien en medio a base de peptona con un punto óptimo a 25°C, pH 6,5-8,0 y con NaCl al 0-1,5 % (p/v) (Martin et al., 2007a).

Desde el descubrimiento de *C. subtsugae* por Martin y sus colaboradores, se han aislado y caracterizado al menos tres nuevas especies de *Chromobacterium*; Young et al. (2008) aislaron una nueva especie de *Chromobacterium*, *C. aquaticum*, de muestras de agua de manantial en Taiwán y Kampf et al. (2009) aislaron dos especies, *C. piscinae* y *C. pseudoviolaceum*, de muestras ambientales recogidas en Malasia.

De todas las especies de *Chromobacteria* conocidas, *C. violaceum*, un saprofito gramnegativo del suelo y el agua. La información publicada acerca de los metabolitos secundarios producidos por *Chromobacteria* se basa únicamente en estudios en *C. violaceum* (véase, por ejemplo, Durán y Menck (2001) para una revisión exhaustiva de las perspectivas farmacológicas e industriales de *C. violaceum*). Normalmente se considera no patógena para seres humanos, sino un patógeno oportunista, en ocasiones ha sido el agente causante de septicemia e infecciones letales en seres humanos y animales. Se sabe que *C. violaceum* produce un pigmento púrpura, la violaceína, que es una molécula de bisindol generada por una fusión de dos moléculas de L-triptófano en presencia de oxígeno (Hoshino et al., 1987; Ryan y Drennan; 2009). La biosíntesis de la violaceína está regulada por detección de quórum, un mecanismo común que regula diversas rutas metabólicas secundarias diferentes en bacterias gramnegativas (McClellan et al., 1997).

Otros metabolitos conocidos de *C. violaceum* recogidos por Durán y Menck (2001) incluyen cianuro de hidrógeno, ferrioxamina E, los glucopéptidos B-lactámicos SQ28.504 y SQ28.546, antibióticos, tales como aerocianidina, aerocarvina, 3,6-dihidroxi-indoxaceno y monobactam SB-26.180 y un depsipéptido antitumoral, FR901228. Según el artículo de revisión de Durán y Menck (2001), *C. violaceum* también produce compuestos de azúcar infrecuentes, tales como polisacáridos y lipopolisacáridos extracelulares.

La Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos n.º US20120100236 también divulga compuestos que pueden obtenerse o proceden de especies de *Chromobacterium*, más particularmente, *Chromobacterium substugae*.

### Ácaros y acaricidas

*Tetranychus urticae* (araña roja) es un miembro de la familia *Tetranychidae*. Las arañas rojas son quizá la plaga de ácaros más importante de las plantas ornamentales. También provocan un daño considerable en más de 180 especies de cultivos de invernadero y campo. Estos ácaros también se encuentran entre las plagas de artrópodos más difíciles de controlar y pueden desarrollar rápidamente resistencia a productos químicos (Stamps y Osborne, 2009, Osborne, Ehler y Nechols, 1999).

Los acaricidas son compuestos que eliminan a los ácaros (miticidas) y las garrapatas (ixodicidas). Esta clase de plaguicidas es extensa e incluye antibióticos, carbamatos, acaricidas de formamida, piretroides, reguladores del crecimiento de ácaros y acaricidas organofosforados. Aparte de los plaguicidas químicos, pueden usarse para controlar a los ácaros tierra de diatomeas y ácidos grasos. Normalmente actúan alterando la cutícula, lo que deseca al ácaro. Además, para controlar a los ácaros se usan algunos aceites esenciales, tales como el aceite de menta. A pesar de la gran variedad de compuestos acaricidas conocidos, los ácaros siguen siendo un grave problema en la agricultura, debido al daño que causan en los cultivos. Pueden producir varias generaciones durante una estación, lo que facilita un rápido desarrollo de resistencia a los productos acaricidas usados. Por lo tanto, se necesitan con urgencia nuevos productos plaguicidas con nuevos sitios diana y nuevos modos de acción.

### Moscas domésticas

*Musca domestica* (moscas domésticas) son miembros de la familia *Muscidae*. Se considera que esta familia es un problema económico tanto a nivel doméstico como en todo el mundo. Otros miembros de la familia *Muscidae* incluyen la mosca de cara, la mosca del establo y la mosca pailetera. Se consideran una molestia y son vectores para enfermedades en seres humanos y animales. Sus hábitos de deambulación y alimentación, sobre basura y excrementos y sobre los seres humanos y su comida las convierten en agentes ideales para transferir organismos causantes de enfermedades. Estas especies también pueden ser una plaga para animales y transmitirles enfermedades a través de heridas abiertas.

### Moscas que se alimentan de plantas - Mosca de alas manchadas

La mosca de alas manchadas, *Drosophila suzukii* es un invasor reciente en las áreas de cultivo de fruta y vegetales en los Estados Unidos. Es mucho más destructiva que la conocida especie relacionada, *Drosophila melanogaster* y otras *Drosophila* debido a que *D. suzukii* puede alimentarse y dañar a frutos y vegetales intactos, mientras que otras *Drosophila* solo se alimentan de material vegetal en proceso de putrefacción.

### Gusanos de las raíces

Los gusanos de las raíces de la familia *Anthomyidae* se alimentan de las raíces de varias plantas distintas. El gusano de la raíz del repollo afecta al repollo, la coliflor, el brécol y las coles de Bruselas. (A este grupo de vegetales también se le conoce como "cultivos de col"). También existen diferentes tipos de gusanos de las raíces que afectan a las zanahorias, cebollas y otros cultivos de hortalizas. Ya que los cultivos de coles son vegetales de estaciones frías, los gusanos de la raíz del repollo son mucho más prominentes en las zonas del norte de los Estados Unidos. Son difíciles de controlar, debido a que eclosionan y se alimentan bajo el suelo, por lo que solo se percibirá su presencia cuando se aprecie retraso en el crecimiento o follaje marchito.

### Pulgón verde del melocotonero

*Myzus persicae*, (pulgón verde del melocotonero) es un miembro de la familia *Aphididae* (véase el documento US20110054022). Tal como resulta evidente por su nombre común, los pulgones verdes del melocotonero son plagas de una gran variedad de frutales, vegetales y plantas ornamentales y tienen una presencia mundial. Estos insectos son particularmente dañinos, ya que no solo provocan un daño directo alimentándose de la savia del floema, sino que también son vectores potenciales para el virus de la viruela del ciruelo, el agente causante de la enfermedad de la Sharka, que provoca la deformación y decoloración de la fruta. Como resultado, los árboles infectados han de arrancarse de raíz. Se ha tratado de controlar estas plagas con diversos plaguicidas. Sin embargo, a menudo desarrollan resistencia.

### Psílido de la patata

*Bactericera cockerelli*, (psílido de la patata) es un miembro de la familia *Triozidae* y es un agente causante de la enfermedad de la patata rayada por una infestación de bacterias gramnegativas. Aunque es nativo de Norteamérica, también se ha encontrado en Nueva Zelanda ([www.biosecurity.govt.nz/files/pests/potato-tomato-psyllid/psyllid-factsheet.pdf](http://www.biosecurity.govt.nz/files/pests/potato-tomato-psyllid/psyllid-factsheet.pdf)). El psílido de la patata normalmente cría en hospedadores de solanáceas (tales como los tomates y las patatas). Sin embargo, se han encontrado en otras plantas, así como en pimientos, chiles, berenjena, kumara, poroporo, tamarillo y estramonio.

### Escarabajos del estiércol

*Alphitobius diaperinus* es una grave plaga en la industria de las aves de corral y es un miembro de la familia *Tenebrionidae*. La cepa de *Bt* PS86B1 tiene según se ha comunicado actividad contra *Alphitobius* (Patente de los Estados Unidos n.º 5.100.665 de Hickle et al.). *Bt tenebrionis* también puede tener actividad contra larvas de este escarabajo (Patente de los Estados Unidos n.º 5.244.660). Los escarabajos del estiércol y algunas especies más de coleópteros actúan como vectores para enfermedades causadas por protozoos, bacterias y virus en pollos y pavos, causando una pérdida económica significativa. Los escarabajos del estiércol actúan como un significativo reservorio para especies patógenas de *Salmonella*, incluyendo las variedades más patógenas, tales como *S. enterica* serotipo *enteritidis*. El problema es que las aves de corral contaminadas con organismos patógenos, tales como *Salmonella*, amenazan a la salud humana. Estos escarabajos habitan en el estiércol, madera, espuma de poliestireno, fibra de vidrio y paneles aislantes de poliestireno de los corrales. Las larvas y los escarabajos adultos prosperan tanto sobre las heces de las aves como en los granos que se usan como alimento para los pollos. Estas grandes poblaciones de escarabajos y sus diversos hábitats dentro de los corrales hacen que sea más difícil erradicar la *Salmonella* que portan. En medio de una fuerte infestación por el escarabajo del estiércol o antes de establecer una nueva población de pollos, ni la retirada frecuente de los desechos ni el espolvoreado con múltiples insecticidas químicos resultan completamente eficaces para controlar esta plaga.

### Larvas y escarabajos

Se ha observado que las larvas, tales como las larvas blancas (*Cyclocephala lurida*), el escarabajo enmascarado del sur (*Rhizotrogus majalis*), las larvas del escarabajo japonés (*Popillia japonica*), las larvas de gorgojo de la vid negra (*Otiorynchus sulcatus*), las larvas del escarabajo oriental (*Anomala orientalis*), miembros de la familia *Scarabaeidae*, infestan el césped y las hierbas de pasto. Se ha observado que los escarabajos adultos infestan plantas ornamentales y numerosos cultivos por todo el mundo. Se han probado diversos plaguicidas que incluyen plaguicidas químicos, nematodos (véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos n.º 7.641.573) y *Bacillus thuringiensis* (véase la Patente de los Estados Unidos n.º 5.185.158), feromonas y repelentes naturales, tales como hierba gatera y cebollino.

### Polihidroxicanoatos (PHA)

El bioplástico se define como una forma de plástico sintetizada a partir de fuentes renovables, tales como almidón vegetal y especies microbianas. Algunos de los materiales plásticos degradables en desarrollo incluyen polihidroxicanoato (PHA), polilactida, poliésteres alifáticos, polisacáridos y los copolímeros y/o las mezclas de estos. Los PHA, en particular, incluyen varios ésteres poliméricos, tales como polihidroxitiratos, co-hidroxicanoatos de polihidroxitirato (PHBV), co-hidroxihexanoato de polihidroxitirato (PHBHx) y co-hidroxiocanoato de polihidroxitirato (PHBO). El poli-ácido 3-hidroxi-butírico (PHB) es el PHA microbiano natural más común. Los polihidroxicanoatos son polímeros 100% biodegradables. Ya que tienen propiedades similares a las de diversos termoplásticos sintéticos, tales como el polipropileno, los PHA pueden usarse en su lugar. También se degradan totalmente en agua y dióxido de carbono en condiciones aerobias y en metano en condiciones anaerobias por los microorganismos del suelo, el agua lacustre, las aguas residuales y el agua marina. Dependiendo del número de átomos de carbono en la cadena, los PHA se han dividido en dos grupos: longitud de cadena corta (SCL), que consiste en 3-5 átomos de carbono y longitud de cadena media (MCL), que consiste en 6-14 átomos de carbono (Khanna S, Srivastava AK. 2005). Estas diferencias se deben principalmente a la especificidad de sustrato de las PHA sintetas que pueden aceptar 3HA de un cierto intervalo de átomos de carbono. El otro PHA bien conocido es el copolímero, poli (3-hidroxitirato-co-3-hidroxicanoato) P(3HB-co-3HV), cuyo SCL está formado por unidades

monoméricas de cuatro y cinco carbonos. La proporción de estas unidades monoméricas puede variar y esto afecta a las propiedades físicas del polímero, es decir, menos frágil a medida que aumenta la proporción de unidades de 3HV.

5 En algunas especies microbianas, la acumulación de PHA se produce durante la presencia de un exceso de carbono y una limitación de las fuentes de nitrógeno (Verlinden et al., 2007). Los PHA producidos en respuesta a condiciones estresantes sirven como moléculas de almacenamiento de energía que se usan cuando escasean las fuentes de energía convencionales (Solaiman y Ashby, 2005). Los polímeros plásticos se acumulan intracelularmente como gránulos de almacenamiento amorfos que refractan la luz en estos organismos (Mukhopadhyay et al., 2005). El PHB se sintetiza a partir de acetyl-CoA usando tres etapas enzimáticas (Krans et al., 1997). Desde un punto de vista biotecnológico, esta capacidad de biodegradación de los bioplásticos los convierte en un sustituto deseable para los plásticos a base de petroquímicos, un contaminante ambiental (Lee, 1996). El aumento de la producción de bioplásticos puede reducir significativamente las emisiones de dióxido de carbono, recortar la generación de residuos plásticos y reducir el consumo de combustibles fósiles.

15 Los PHA pueden obtenerse mediante los tres métodos siguientes: biosíntesis por microorganismos, fotosíntesis por plantas transgénicas y biosíntesis *in vitro* usando enzimas adecuadas (véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos n.º 7.455.999, documento WO9914313). En la mayoría de bacterias, las células sintetizan PHA en sustratos que limitan el crecimiento distintos de fuentes de carbono, tales como nitrógeno, fósforo u oxígeno.

20 La acumulación de PHA sirve como fuente tanto de carbono como de energía durante los periodos de escasez. El PHA también sirve como sumidero para reducir la energía y por tanto, podría considerarse como un regulador redox dentro de la célula. Los PHA también son útiles como compuestos estereo regulares, que pueden servir como precursores químicos para la química sintética de compuestos ópticamente activos. Dichos compuestos se usan en particular como vehículos biodegradables para la dosificación a largo plazo de fármacos, medicinas, hormonas, insecticidas y herbicidas (Reddy, 2003). También se usan como materiales osteosintéticos en la estimulación del crecimiento óseo debido a sus propiedades piezoeléctricas, en placas óseas, suturas quirúrgicas y reemplazos de vasos sanguíneos (Schaefer et al., 2000). Además, se ha divulgado un método de producción de copolímeros mediante procesos biológicos usando diversas bacterias, por ejemplo, *Alcaligenes eutrophus* NCIMB 40124 (documento EP. 0431883A2) y Patente de los Estados Unidos n.º 7.455.999. El documento EP n.º 2236089A1 divulga usos de estos polímeros en implantes multizona para dispositivos de reparación ortopédica y dispositivos de fijación de tejidos blandos. El documento WO 91/00917A1 divulga un método para controlar y modificar un nuevo biopolímero de poliéster mediante la manipulación de la genética y la enzimología de síntesis de poliésteres de polihidroxibutirato (PHB) y polihidroxialcanoato (PHA) a nivel molecular en células procariontas y eucariotas, especialmente en plantas. El documento WO 2005/030482A1 divulga métodos y usos de materiales de empaquetado compostables. El documento WO2008/110541 divulga un método de estabilización de los polihidroxibutiratos frente a la degradación térmica.

#### 40 Lignina

La lignina es un constituyente principal de la estructura leñosa de las plantas superiores. La lignina procesada se obtiene como subproducto de las reacciones de pulpa de la madera. Los productos de la lignina incluyen, por ejemplo, sulfonatos de lignina, ligninas alcalinas y oxiligninas que pueden obtenerse a partir de licores de desecho de sulfitos, sulfatos y álcalis (Snook, 1982, Handbook for Pulp & Paper Technologists, TAPPI, Atlanta).

45 Se ha observado que la lignina tiene diversos usos comerciales. Por ejemplo, la lignina alcalina soluble se ha usado como agente dispersante. La Patente de los Estados Unidos n.º 3.726.850 divulga el uso de un producto de lignina alcalino soluble tratado con ozono, que está esencialmente libre de azufre unido de manera orgánica, como agente dispersante para arcillas, colorantes, plaguicidas, negro de carbono y otros materiales. La Patente de los Estados Unidos n.º 4.666.522 divulga el uso de productos de lignosulfato para preparar emulsiones de ceras, aceites, grasas, asfaltos y mezclas de los mismos. Se ha comunicado que el acetato de lignina es útil para aplicaciones, tales como actuar como aglutinante en composiciones de tinta de imprenta a base de agua. (Véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos n.º 4.612.051). La Patente de los Estados Unidos n.º 5.668.183 divulga el uso de productos de sulfonatos de lignina para dispersar sustancias liposolubles. Además, se ha divulgado la unión de complejos de lignina-plaguicida (véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos n.º 3.813.236, la Patente de los Estados Unidos n.º 3.929.453, reeditada como Re. n.º 29.238, la Patente de los Estados Unidos n.º 4.381.194, la Publicación de Solicitudes de Patente de los Estados Unidos n.º 20110015237, la Publicación de Solicitudes de Patente de los Estados Unidos n.º 2010136132, la Publicación de Solicitudes de Patente de los Estados Unidos n.º 20100278890, la Publicación de Solicitudes de Patente de los Estados Unidos n.º 20080113920, la Publicación de Solicitudes de Patente de los Estados Unidos n.º 2006247130, la Patente de los Estados Unidos n.º 7.867.507, el documento WO2003/005816, la Patente de los Estados Unidos n.º 5.994.266).

#### 60 Benzoato de sodio

El benzoato de sodio se ha usado en diversas formulaciones como antimicrobiano en preparaciones de alimentos. Por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos n.º 6.599.514 divulga composiciones antifúngicas sinérgicas que

comprenden un agente antifúngico y un aditivo alimentario, que produce un efecto sinérgico en la actividad antifúngica general de la composición antifúngica. Los aditivos alimentarios divulgados en la Patente de los Estados Unidos n.º 6.599.514 incluyeron ácido sórbico y sorbatos, ácido benzoico y benzoatos, hidroxibenzoatos, dióxido de azufre y sulfitos, bifenilo y derivados, nitritos, nitratos, ácido láctico, lactatos, ácido cítrico y citratos, ácido tartárico y tartratos, ácido ortofosfórico y ortofosfatos, malatos, ácido adípico, ácido succínico, 1,4-heptonolactona, ácido nicotínico, citrato de triamonio, citrato férrico de amonio, EDTA disódico y cálcico, glicerol, di, tri y polifosfatos, ácidos grasos (E470), mono y diglicéridos de ácidos grasos (E4 71), éteres de mono y diglicéridos de ácidos grasos, carbonatos, gluconatos, cloro (E92S), hexametafosfato de sodio, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT) (E321), hidroquinona de t-butilo (THBQ), galato de propilo, heptonato de calcio, fitato de calcio, éter dietílico, EDTA, EDTA disódico de dihidrógeno, acetato de etilo, mono, di y triacetatos de glicerol, glicina, oxiestearina, propano-1,2-diol y heptonato de propan-2-ol y de sodio.

El benzoato de sodio también se ha usado en formulaciones plaguicidas. Por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos 4.668.507 de SC Johnson enseña el uso de benzoato de sodio en plaguicidas contenidos en sistemas de suministro en aerosol en acero a presión donde el principal modo de estabilización es la inhibición de la corrosión. La Patente de los Estados Unidos n.º 5.620.678 divulga una formulación insecticida que incluye benzoato de sodio como inhibidor de la corrosión. La Patente de los Estados Unidos n.º 4.731.379 enseña composiciones insecticidas que contienen benzoato de sodio cuando se usan como champú para animales para eliminar pulgas. En esta patente, no se muestra que el uso del benzoato de sodio aumente la eficacia del insecticida o que estabilice el producto, sino que se cree que ayuda a curar las heridas del animal tratado. La Patente de los Estados Unidos n.º 5.017.620 enseña composiciones insecticidas que contienen benzoato de sodio y otros conservantes conocidos, cuando se usa como antimicrobiano, para estabilizar el producto durante su almacenamiento. La Patente de los Estados Unidos n.º 6.841.572 divulga una solución acuosa para tratar plantas vivas, cultivos, árboles, frutos antes de la cosecha, hortalizas, hojas, tallos, raíces y flores que tienen un pH de entre 4,0 y 6,5 y que consiste esencialmente en concentraciones eficaces desde el punto de vista fungicida y/o bactericida de uno o más compuestos conservantes seleccionados entre el grupo que consiste en ácido sórbico, benzoico y láctico; las sales de sodio, potasio, calcio y amonio del ácido benzoico, sórbico, hidroximetil glicínico, láctico y propiónico; y metil, etil, propil y butil parabeno, al menos un tensioactivo aniónico y opcionalmente un acidulante.

### 30 Sumario

Se proporciona un método para modular una infestación por plagas, en donde dicha plaga se selecciona entre *Acari*, *Anthomyidae*, *Triozidae*, *Tenebrionidae*, *Scarabaeidae*, en una ubicación donde se desea la modulación que comprende aplicar una cantidad de una composición obtenida de *Chromobacterium substugae* cepa Nov (NRRL B-30655), eficaz para modular dicha infestación.

Específicamente, se proporcionan composiciones y métodos para modular la infestación de una o más plagas de *Acari* (arácnidos), *Anthomyidae*, *Triozidae*, *Tenebrionidae* y/o *Scarabaeidae* que comprenden o usan un sobrenadante, filtrado y/o extracto y/o uno o más de los metabolitos de dicho sobrenadante, filtrado y/o extracto de una cepa de *Chromobacterium sp.*, en particular, una cepa productora de violaceína, incluyendo, pero sin limitación, *Chromobacterium piscinae*, *C. pseudoviolaceum*, *Chromobacterium substugae* y más particularmente, una cepa de *Chromobacterium substugae* sp. nov. y aún más particularmente, una cepa de *Chromobacterium substugae* sp. nov. que tenga las características identificativas de NRRL B-30655 descritas en la Patente de los Estados Unidos n.º 7.244.607.

También se divulgan en el presente documento infestaciones por plagas de *Muscidae*, *Drosophilidae* y/o *Aphididae*.

En una realización específica, la infestación por *Acari* es infestación por *Tetranychidae* (ácaros). En una realización más específica, la infestación por ácaros es infestación por *Tetranychus urticae*.

En otra realización específica, la infestación por plagas de insectos es una infestación por *Musca sp.*, *Myzus sp.*, *Bactericera sp.*, *Cyclocephala sp.* o *Alphitobius sp.* *Drosophila sp.* *Delia sp.*, *Rhizotrogus sp.* *Popillia sp.*, *Anomala sp.* o *Otiorhynchus sp.* En una realización aún más específica, la infestación por plagas de insectos es por *Delia radicum* (gusano de la raíz del repollo), *Myzus persicae* (pulgón verde del melocotonero), *Bactericera cockerelli* (psilido de la patata), *Alphitobius diaperinusxi* (escarabajo del estiércol), *Cyclocephala lurida* (larva blanca), *Rhizotrogus majalis* (escarabajo enmascarado del sur), *Popilla japonica* (escarabajo japonés), *Otiorhynchus sulcatus* (gorgojo de la vid negra), *Anomala orientalis* (escarabajo oriental). También se divulga en el presente documento una infestación por plagas de insectos, en donde la infestación por plagas de insectos es por *Musca domestica* (mosca doméstica) y/o *Drosophila suzukii* (mosca de alas manchadas).

También se divulga en el presente documento una combinación plaguicida que modula la infestación de al menos un arácnido y/o una o más plagas de insectos que pertenecen a las familias *Acari*, *Anthomyidae*, *Drosophilidae*, *Muscidae*, *Aphididae*, *Triozidae*, *Tenebrionidae* o *Scarabaeidae* que comprende, como componentes activos: (a) un sobrenadante, filtrado y/o extracto de *Chromobacterium sp.* y/o uno o más metabolitos de dicho sobrenadante, filtrado y/o extracto de *Chromobacterium sp.* y (b) otra sustancia plaguicida, particularmente, un acaricida y/o insecticida que pueda ser eficaz contra una o más plagas de insectos que pertenecen a las familias *Acari*,

*Anthomyidae, Drosophilidae, Muscidae, Aphididae, Triozidae, Tenebrionidae* o *Scarabaeidae*, en donde (a) y (b) pueden estar opcionalmente presentes en cantidades sinérgicas. La sustancia plaguicida puede (a) proceder de un microorganismo; (b) ser un producto natural y/o (c) un plaguicida químico y en particular, un insecticida químico.

5 En una realización, el metabolito puede ser un compuesto que (a) tiene actividad pesticida; (b) tiene un peso molecular de aproximadamente 840-900 según se determina mediante cromatografía líquida/espectrometría de masas (CL/EM) y (c) tiene un tiempo de retención de cromatografía líquida de alta presión (HPLC) de aproximadamente 7-12 minutos en una columna de HPLC C-18 de fase inversa usando un sistema disolvente de agua: acetonitrilo (CH<sub>3</sub>CN) con gradiente (0-20 min; 90-0% de CH<sub>3</sub>CN acuoso, 20-24 min; 100% de CH<sub>3</sub>CN, 24-27 min; 0-90 % de CH<sub>3</sub>CN acuoso, 27-30 min; 90% de CH<sub>3</sub>CN acuoso) a un caudal de 0,5 ml/min y detección UV de 210 nm y (d) se obtiene de manera opcional a partir de una especie de *Chromobacterium*. En una realización el compuesto puede ser un péptido.

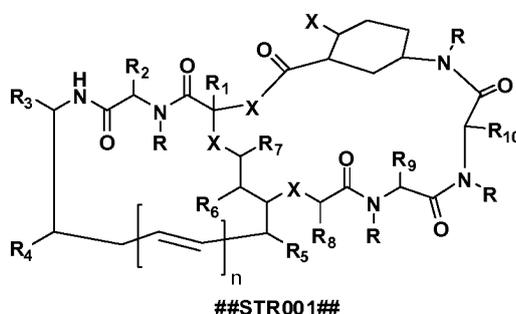
15 En una realización particular, el compuesto tiene 43 carbonos, siete metilos, diez carbonos metileno, doce metinos, 6 metinos olefínicos y ocho carbonos cuaternarios tal como se determina mediante RMN <sup>13</sup>C. En más realizaciones particulares, el compuesto incluye a los compuestos "A", "B", "C", "D", representados como ##STR001#, ##STR001a##, ##STR001b##, ##STR001c## respectivamente.

20 En una realización específica, el compuesto "A": (a) se obtiene a partir de una especie de *Chromobacterium*; (b) es tóxico para una plaga; (c) tiene un peso molecular de aproximadamente 840-890 y más particularmente, 860 según se determina por cromatografía líquida/espectrometría de masas (CL/EM); (d) tiene valores de RMN <sup>1</sup>H de δ 8,89, 8,44, 8,24, 8,23, 7,96, 7,63, 6,66, 5,42, 5,36, 5,31, 5,10, 4,13, 4,07, 4,05, 3,96, 3,95, 3,88, 3,77, 3,73, 3,51, 3,44, 3,17, 2,40, 2,27, 2,11, 2,08, 2,03, 2,01, 1,97, 1,95, 1,90, 1,81, 1,68, 1,63, 1,57, 1,53, 1,48, 1,43, 1,35, 1,24, 1,07, 1,02, 0,96, 0,89, 0,88, 0,87, 0,80 y tiene valores de RMN <sup>13</sup>C de δ 173,62, 172,92, 172,25, 172,17, 171,66, 171,28, 25 170,45, 132,13, 130,04, 129,98, 129,69, 129,69, 125,48, 98,05, 70,11, 69,75, 68,30, 68,25, 64,34, 60,94, 54,54, 52,82, 49,72, 48,57, 45,68, 40,38, 39,90, 38,18, 36,60, 31,98, 31,62, 31,58, 29,53, 28,83, 27,78, 24,41, 23,06, 22,09, 20,56, 19,31, 18,78, 17,66, 15,80 (e) tiene un tiempo de retención de cromatografía líquida de alta presión (HPLC) de aproximadamente 7-12 minutos, más específicamente de aproximadamente 9 minutos e incluso más específicamente de aproximadamente 9,08 min en una columna de HPLC C-18 de fase inversa (Phenomenex, Luna 5μ C18(2) 100 A, 100 x 4,60 mm) usando un sistema disolvente de agua: acetonitrilo (CH<sub>3</sub>CN) con gradiente (0-20 min; 90-0% de CH<sub>3</sub>CN acuoso, 20-24 min; 100% de CH<sub>3</sub>CN, 24-27 min; 0-90 % de CH<sub>3</sub>CN acuoso, 27-30 min; 90% de CH<sub>3</sub>CN acuoso) a un caudal de 0,5 ml/min caudal y detección UV de 210 nm.

35 En otra realización específica, el compuesto "B" tiene las siguientes características: (a) se obtiene a partir de una especie de *Chromobacterium*; (b) es tóxico para una plaga; (c) tiene un peso molecular de aproximadamente 850-900 y más particularmente, 874 según se determina por cromatografía líquida/espectrometría de masas (CL/EM); (d) tiene un tiempo de retención de cromatografía líquida de alta presión (HPLC) de aproximadamente 7-12 minutos, más específicamente de aproximadamente 9 minutos e incluso más específicamente de aproximadamente 9,54 min en una columna de HPLC C-18 de fase inversa (Phenomenex, Luna 5 μ C18 (2) 100 A, 100 x 4,60 mm) usando un sistema disolvente de agua:acetonitrilo (CH<sub>3</sub>CN) con gradiente (0-20 min; 90-0% de CH<sub>3</sub>CN acuoso, 20-24 min; 100% de CH<sub>3</sub>CN, 24-27 min; 0-90% de CH<sub>3</sub>CN acuoso, 27-30 min; 90% de CH<sub>3</sub>CN acuoso) a un caudal de 0,5 ml/min caudal y detección UV de 210 nm.

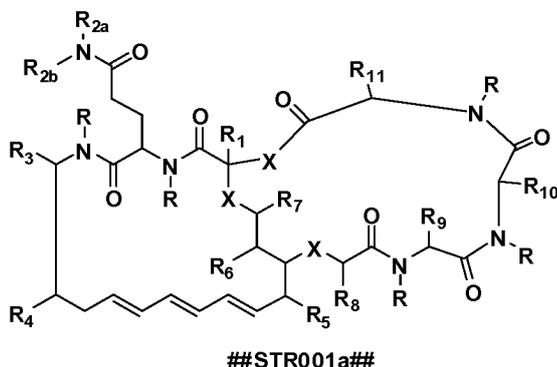
El metabolito también puede ser un compuesto que incluye, pero sin limitación:

45 (A) un compuesto que tiene la estructura ##STR001##



50 o una sal o estereoisómeros del mismo aceptables como pesticidas, donde R es -H, cadena de alquilo inferior que contiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 restos alquilo, resto arilalquilo o arilo, alquilo inferior sustituido; X es O, NH, NR o S; n es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9; R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub>, R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub>, R<sub>10</sub>, R<sub>11</sub> son cada uno independientemente H, son iguales o diferentes e independientemente un resto de cadena lateral de aminoácido o un derivado de cadena lateral de aminoácido, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico, heterocíclico sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, tioalquilo, tioalquilo sustituido, hidroxilo, halógeno,

amino, amido, carboxilo, -C(O)H, acilo, oxiacilo, carbamato, sulfonilo, sulfonamida o sulfurilo;  
 (B) un compuesto que tiene la estructura ##STR001a##

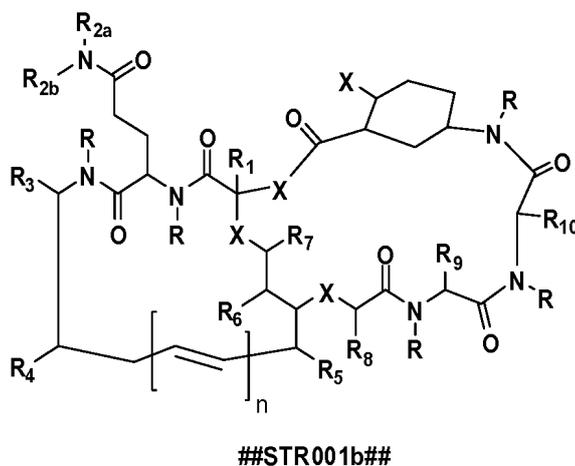


5

donde R es -H, cadena de alquilo inferior que contiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 restos alquilo, resto arilalquilo o arilo, alquilo inferior sustituido; X es O, NH, NR o S; R<sub>2a</sub>, R<sub>2b</sub> se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en -H, alquilo, alquilo inferior, alquilo sustituido y alquilo inferior sustituido; R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub>, R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub>, R<sub>10</sub>, R<sub>11</sub> son cada uno independientemente H, son iguales o diferentes e independientemente un resto de cadena lateral de aminoácido o un derivado de cadena lateral de aminoácido, alquilo, alquilo sustituido, alquenoilo, alquenoilo sustituido, alquinoilo, alquinoilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico, heterocíclico sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, tioalquilo, tioalquilo sustituido, hidroxilo, halógeno, amino, amido, carboxilo, -C(O)H, acilo, oxiacilo, carbamato, sulfonilo, sulfonamida o sulfurilo.

10

15 (C) un compuesto que tiene la estructura ##STR001b##

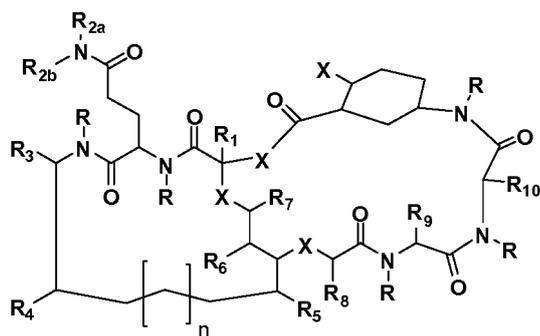


20

donde R es -H, cadena de alquilo inferior que contiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 restos alquilo, resto arilalquilo o arilo, alquilo inferior sustituido; X es O, NH, NR o S; n es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9; R<sub>2a</sub>, R<sub>2b</sub> se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en -H, alquilo, alquilo inferior, alquilo sustituido y alquilo inferior sustituido; R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub>, R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub>, R<sub>10</sub>, R<sub>11</sub> son cada uno independientemente H, son iguales o diferentes e independientemente un resto de cadena lateral de aminoácido o un derivado de cadena lateral de aminoácido, alquilo, alquilo sustituido, alquenoilo, alquenoilo sustituido, alquinoilo, alquinoilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico, heterocíclico sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, tioalquilo, tioalquilo sustituido, hidroxilo, halógeno, amino, amido, carboxilo, -C(O)H, acilo, oxiacilo, carbamato, sulfonilo, sulfonamida o sulfurilo.

25

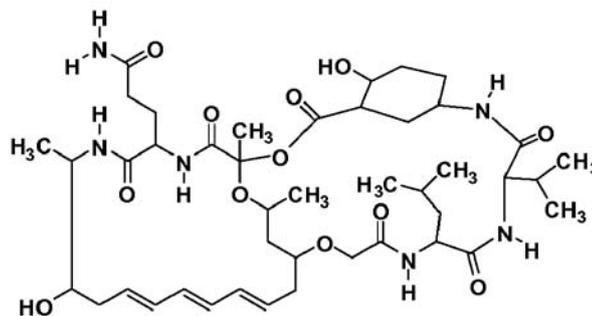
(D) un compuesto que tiene la estructura ##STR001c##



##STR001c##

donde R es -H, cadena de alquilo inferior, resto arilalquilo o arilo, alquilo inferior sustituido que contiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 restos alquilo; X es O, NH, NR o S; n es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9; R2a, R2b se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en-H, alquilo, alquilo inferior, alquilo sustituido y alquilo inferior sustituido; R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9, R10, R11 son cada uno independientemente H, son iguales o diferentes e independientemente un resto de cadena lateral de aminoácido o un derivado de cadena lateral de aminoácido, alquilo, alquilo sustituido, alquenoilo, alquenoilo sustituido, alquinoilo, alquinoilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico, heterocíclico sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, tioalquilo, tioalquilo sustituido, hidroxilo, halógeno, amino, amido, carboxilo, -C(O)H, acilo, oxiacilo, carbamato, sulfonilo, sulfonamida o sulfurilo.

En una realización más particular, el metabolito es cromamida A (1).

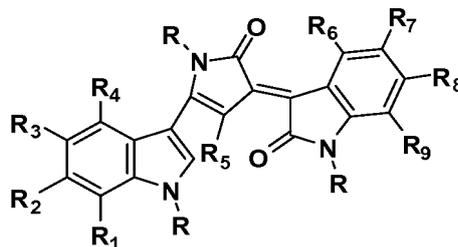


Cromamida A (1)

En una realización particular, el metabolito es el compuesto "C", tiene las siguientes características: (a) se obtiene a partir de una especie de *Chromobacterium*; (b) es tóxico para una o más plagas; (c) tiene un peso molecular de aproximadamente 325-360 y más particularmente, aproximadamente 343 según se determina mediante cromatografía líquida/espectrometría de masas (CL/EM); (d) tiene un tiempo de retención de cromatografía líquida de alta presión (HPLC) de aproximadamente 8-14 minutos, más específicamente de aproximadamente 10 minutos e incluso más específicamente de aproximadamente 10,88 min en una columna de HPLC C-18 de fase inversa (Phenomenex, Luna 5  $\mu$  C18 (2) 100 A, 100 x 4,60 mm) usando un sistema disolvente de agua:acetonitrilo (CH<sub>3</sub>CN) con gradiente (0-20 min; 90-0% de CH<sub>3</sub>CN acuoso, 20-24 min; 100% de CH<sub>3</sub>CN, 24-27 min; 0 - 90% de CH<sub>3</sub>CN acuoso, 27-30 min; 90% de CH<sub>3</sub>CN acuoso) a un caudal de 0,5 ml/min caudal y detección UV de 210 nm. En una realización particular, el compuesto "C" puede ser violaceína (2), un compuesto conocido aislado anteriormente de *Chromobacterium violaceum*.

En otra realización, otro metabolito usado en las composiciones y métodos expuestos anteriormente, es el compuesto "D", tiene las siguientes características: (a) se obtiene a partir de una especie de *Chromobacterium*; (b) es tóxico para una plaga; (c) tiene un peso molecular de aproximadamente 315-350 y más particularmente, aproximadamente 327 según se determina mediante cromatografía líquida/espectrometría de masas (CL/EM); (d) tiene un tiempo de retención de cromatografía líquida de alta presión (HPLC) de aproximadamente 10-15 minutos, más específicamente de aproximadamente 12 minutos e incluso más específicamente de aproximadamente 12,69 min en una columna de HPLC C-18 de fase inversa (Phenomenex, Luna 5  $\mu$  C18 (2) 100 A, 100 x 4,60 mm) usando un sistema disolvente de agua:acetonitrilo (CH<sub>3</sub>CN) con gradiente (0-20 min; 90-0% de CH<sub>3</sub>CN acuoso, 20-24 min; 100% de CH<sub>3</sub>CN, 24-27 min; 0 - 90% de CH<sub>3</sub>CN acuoso, 27-30 min; 90% de CH<sub>3</sub>CN acuoso) a un caudal de 0,5 ml/min caudal y detección UV de 210 nm. En una realización particular, el compuesto "D" puede denominarse deoxiviolaceína (3), un compuesto conocido aislado anteriormente de *Chromobacterium violaceum*.

En otra realización específica, el compuesto puede tener la siguiente estructura



- 5 donde R es -H, cadena de alquilo inferior que contiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 restos alquilo, resto arilalquilo o arilo, alquilo inferior sustituido, halógenos; R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub>, R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub> son cada uno independientemente H, son iguales o diferentes, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico, heterocíclico sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, tioalquilo, tioalquilo sustituido, hidroxilo, halógeno, amino, amido, carboxilo, -C(O)H, acilo, oxiacilo, carbamato, sulfonilo, sulfonamida o sulfurilo.

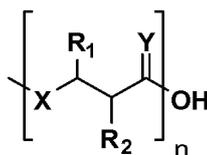
También se proporciona un método para (1) control de infestación de plagas (por ejemplo, nemátodos, insectos, bacterias transmitidas por el suelo) en una planta que comprende aplicar a la planta y/o sus semillas y/o sustrato usado para hacer crecer dicha planta o un método para controlar una bacteria transmitida por el suelo en el suelo que comprende aplicar a la planta, las semillas y/o el sustrato una cantidad de

(I) un compuesto que

- (a) tiene una actividad antimicrobiana y/o pesticida;  
 (b) tiene un peso molecular de aproximadamente 950 - 1450 según se determina mediante espectrómetro de masas por transformada de Fourier híbrido LTQ Orbitrap XL.  
 (c) tiene valores RMN <sup>1</sup>H δ de 5,22 (sext, 1H), 2,62 (dd, 1H), 2,53 (dd, 1H) y 1,31 (d, 3H) (d) tiene valores RMN <sup>13</sup>C δ de 169,2, 67,6, 40,9 y 19,8.  
 (d) comprende la estructura  $(-O-CHCH_3-CH_2-CO-)_n$ , donde n=6-50  
 (e) se obtiene a partir de una especie de *Chromobacterium*

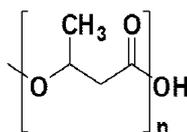
(II) opcionalmente otra sustancia pesticida eficaz para controlar las infestaciones en dicha planta.

El compuesto (I) puede tener la estructura:



En la que X, es independientemente -O, -NR o -S, donde R es H o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>; Y, es independientemente -O, -S; n = 6-50; R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> son cada uno independientemente H, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico, heterocíclico sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, tioalquilo, tioalquilo sustituido, hidroxilo, halógeno, amino, amido, carboxilo, -C(O)H, acilo, oxiacilo, carbamato, sulfonilo, sulfonamida o sulfurilo.

En particular, el compuesto (I) tiene la estructura:



en la que n = 10-25.  
 En una realización más específica, (I) es un ácido alfa-butírico.

Además, se proporciona un método para obtener los compuestos expuestos anteriormente. El método comprende cultivar una cepa de *Chromobacterium* sp. en caldo celular completo en condiciones suficientes para producir el

compuesto y aislar el compuesto producido del caldo celular completo.

En un aspecto relacionado, se divulgan métodos para estabilizar composiciones plaguicidas biológicas frente a la separación física y la pérdida de actividad a causa de la exposición a la luz del sol mediante la aplicación de un agente estabilizante a dicha composición plaguicida biológica, eficaz para estabilizar la composición de plaguicida biológico frente a la separación física y la pérdida de actividad a causa de la exposición a la luz del sol. También se proporcionan composiciones que comprenden dichos agentes. En una realización particular, la composición plaguicida comprende filtrado, sobrenadante, extracto o una sustancia con actividad plaguicida de *Chromobacterium* sp. procedente del mismo que puede estar presente en una cantidad de al menos aproximadamente el 0,5% y en particular, entre aproximadamente un 0,5% en peso basándose en el peso celular seco a aproximadamente un 30% en peso. El agente estabilizante puede ser, en una realización particular, una sal de ácido benzoico y/o una sal de lignina, en particular, sal de sulfonato de lignina, incluyendo, pero sin limitación, de sodio, potasio, calcio, magnesio, amonio y combinaciones de las mismas y puede estar presente en una cantidad de al menos aproximadamente el 2.5 % en peso y puede estar preferentemente presente en una cantidad de aproximadamente el 5%-15%.

### Breve descripción de las figuras

La figura 1 es una representación esquemática del esquema de purificación para obtener cromamida A (1), violaceína (2) y desoxiviolaceína (3) a partir de caldo de cultivo.

La figura 2 representa estructuras químicas para cromamida A (1), violaceína (2) y desoxiviolaceína (3).

La figura 3 muestra los resultados de los ensayos en discos foliares en TSSM con MBI-203. CFD representa células criodesecadas, que después se reconstituyeron en agua para representar una dosis de 1/2x, 1x y 2,5x del caldo celular completo.

La figura 4 muestra el número de huevos puestos por hembras de psílido de la patata expuestas a hojas de pimiento tratadas con MBI-203.

La figura 5 muestra el número medio de huevos ovipositados por hembras de psílido 5 días después de la exposición a discos foliares de pimiento tratados y no tratados con MBI-203.

La figura 6 muestra el número medio de ninfas y adultos de pulgón verde del melocotonero (GPA) en discos foliares tratados 24 horas después de la exposición de los adultos ( $P < 0,0001$ , LSD,  $\alpha = 0,05$ ). Las medias con la misma letra no son estadísticamente diferentes entre sí. dH<sub>2</sub>O - control negativo, 203 al 10% v/v - control positivo.

La figura 7 muestra el número medio de descendientes (ninfas) de pulgón verde del melocotonero en discos foliares de pimiento tratados con MBI-203 3 días después de la exposición de los adultos ( $P < 0,0001$ , LSD,  $\alpha = 0,05$ ). Las medias con la misma letra no son estadísticamente diferentes entre sí. dH<sub>2</sub>O - control negativo, Avid al 10% v/v - control positivo.

La figura 8 muestra el número medio de descendientes (ninfas) de pulgón verde del melocotonero en discos foliares de pimiento tratados con MBI-203 y DF2 (producto formulado de MBI-203) 3 días después de la exposición de los adultos ( $P < 0,0001$ , LSD,  $\alpha = 0,05$ ). Las medias con la misma letra no son estadísticamente diferentes entre sí. dH<sub>2</sub>O - control negativo, Avid al 10% v/v - control positivo.

La figura 9 es una representación esquemática del esquema de purificación para violaceína (2) y oligo-(ácido  $\beta$ -hidroxibutírico) (4) a partir de caldo de cultivo.

La figura 10 representa los resultados de bioensayos nematocidas de diversas fracciones y del compuesto oligo-ácido hidroxibutírico (1).

Las figuras 11A y 11B muestran el número medio de pulgón verde del melocotonero, *Myzus persicae* (ninfas y adultos) en discos foliares de pimiento tratados, 24 horas después de la exposición. Las medias con la misma letra no son estadísticamente diferentes entre sí (LSD,  $P < 0,0001$ ,  $\alpha = 0,05$ ). 203 Me - Extracto en bruto de MBI-203 en disolvente metanólico, Me - Metanol (tratamiento de blanco), 203, Ace - Extracto en bruto de MBI-203 en disolvente de acetona, Ace - Acetona (tratamiento de blanco), dH<sub>2</sub>O - control negativo, Avid al 10% - control positivo.

Las figuras 12A y 12B muestran el número medio de pulgón verde del melocotonero, *Myzus persicae* (ninfas y adultos) en discos foliares de pimiento tratados, 24 horas después de la exposición. Las medias con la misma letra no son estadísticamente diferentes entre sí. Ace - solo acetona (tratamiento de blanco), DCM -, EA -, Lavado -, MeOH -, dH<sub>2</sub>O - control negativo, 203 al 10% - Patrón de MBI-203 (control positivo).

La figura 13 muestra el número medio de descendientes (ninfas) de pulgón verde del melocotonero en discos foliares de pimiento tratados 3 días después de la exposición de los adultos ( $P < 0,0018$ , LSD,  $\alpha = 0,05$ ). Las medias con la misma letra no son estadísticamente diferentes entre sí. VL1 - violaceína a 0,5  $\mu\text{g/ml}$ , VL2 - violaceína a 1,0  $\mu\text{g/ml}$ , Acetona - tratamiento de blanco, dH<sub>2</sub>O - control negativo, Avid al 10% v/v - control positivo.

La figura 14 muestra el número medio de ninfas y adultos de pulgón verde del melocotonero (GPA) en discos foliares tratados 24 horas después de la exposición de los adultos ( $P < 0,0001$ , LSD,  $\alpha = 0,05$ ). Las medias con la misma letra no son estadísticamente diferentes entre sí. dH<sub>2</sub>O - control negativo, 203 al 10% v/v - control positivo.

La figura 15 muestra el número medio de ninfas y adultos de pulgón verde del melocotonero (GPA) en discos foliares tratados 24 horas después de la exposición de los adultos ( $P < 0,0001$ , LSD,  $\alpha = 0,05$ ). Las medias con la misma letra no son estadísticamente diferentes entre sí. dH<sub>2</sub>O - control negativo, 203 al 10% v/v - control positivo.

La figura 16 muestra la mortalidad antes de la exposición al sol frente a después de la exposición al sol de MBI-203 al 3%, puesto a cero para agua.

La figura 17 muestra MBI-203: pulverización en plantas de EP/EP + BenzNa para pulgón del repollo.

La figura 18 muestra la pulverización de MBI-203 EP +/- Benz Na en pulgones de la col, corregida.

5 La figura 19 muestra MBI-203: EP + CaCO<sub>3</sub>/BenzNa ANTES/DESPUÉS DE LA EXPOSICIÓN AL SOL, normalizado la control negativo.

La figura 20 muestra MBI-203 EP SDP después de la exposición al sol, ensayos de 3 y 6 días.

La figura 21 muestra MBI-203 EP con Benz Na + lignina en el sol, ensayo día 4, corregido.

10 La figura 22 muestra MBI-203 EP con Benz Na + lignina en el sol, porcentaje de pérdida de actividad, ensayo día 4.

La figura 23 muestra MBI-203: EP + lignina + sol, ensayo de CL en brécol, día 3.

### Descripción detallada de las realizaciones preferidas

15 Aunque las composiciones y métodos hasta ahora son susceptibles de diversas modificaciones y formas alternativas, en el presente documento se describirán en detalle realizaciones ejemplares. Debería entenderse, sin embargo, que no se pretende limitar la invención a las formas particulares divulgadas, sino al contrario, la invención ha de abarcar todas las modificaciones, equivalente y alternativas que se encuentren dentro del espíritu y el alcance de la invención como se define por las reivindicaciones adjuntas.

20 Cuando se proporciona un intervalo de valores, se entiende que se incluye en el mismo cada valor intermedio, hasta la décima parte de la unidad del límite inferior, a menos que el contexto indique claramente lo contrario, entre el límite superior e inferior de ese intervalo y cualquier otro valor indicado o intermedio en ese intervalo indicado. También se incluyen intervalos menores. También se incluyen en el mismo los límites superior e inferior de estos intervalos menores, sujetos a cualquier límite específicamente excluido en el intervalo indicado.

25 A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende comúnmente una persona normalmente experta en la técnica a la cual pertenece la presente invención. Aunque también pueden usarse en la puesta en práctica o el ensayo de la presente invención cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en el presente documento, a continuación, se describen los métodos y materiales preferidos.

30 Cabe destacar que tal como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "uno/a" y "el/la" incluyen las referencias en plural salvo que el contexto indique claramente otra cosa.

35 Como se define en el presente documento, "procedente de" significa aislado u obtenido directamente de una fuente particular o, como alternativa, que tiene características identificativas de una sustancia u organismo aislado u obtenido de una fuente particular.

40 Un "vehículo", como se define en el presente documento, es un material inerte, orgánico o inorgánico, con el que se mezcla o formula el principio activo para facilitar su aplicación a una planta u otro objeto que se vaya a tratar o su almacenamiento, transporte y/o manipulación.

45 El término "modular", como se define en el presente documento, se usa para referirse a alterar la cantidad de infestación por plaga o a la velocidad de dispersión de la infestación por plaga.

50 La expresión "infestación por plaga", como se define en el presente documento, es la presencia de una plaga en una cantidad que provoca un efecto dañino, incluyendo una enfermedad o infección en una población hospedadora o la aparición de una mala hierba no deseada en un sistema de crecimiento.

55 Un "plaguicida", como se define en el presente documento, es una sustancia procedente de un producto biológico o una sustancia química que aumenta la mortalidad o inhibe la velocidad de crecimiento de plagas de plantas e incluye, pero sin limitación, nematocidas, insecticidas, herbicidas, fungicidas para plantas, bactericidas para plantas y viricidas para plantas.

Un "plaguicida biológico", como se define en el presente documento, es un microorganismo con propiedades plaguicidas.

### MÉTODOS DE PRODUCCIÓN

60 Como se ha señalado anteriormente, el plaguicida biológico puede comprender o proceder de un organismo que tiene las características identificativas de una especie de *Chromobacterium*, más particularmente, de un organismo que tiene las características identificativas de una cepa de *Chromobacterium substugae*, más particularmente, de una cepa de *Chromobacterium substugae* sp. nov. que puede tener las características identificativas de NRRL B-30655 o como alternativa, de cualquier otro microorganismo. Los métodos comprenden cultivar estos organismos y obtener los compuestos y/o composiciones de la presente invención aislando estos compuestos del cultivo de estos

organismos.

En particular, los organismos se cultivan en medio nutriente usando métodos conocidos en la técnica. Los organismos pueden cultivarse mediante cultivo en matraces de agitación, fermentación a pequeña escala o a gran escala (incluyendo, pero sin limitación, a fermentaciones continuas, discontinuas, discontinuas alimentadas o en estado sólido) en fermentadores de laboratorio o industriales, llevadas a cabo en un medio adecuado y en condiciones que permitan el crecimiento celular. El cultivo puede producirse en medio nutriente adecuado que comprende fuentes de carbono y nitrógeno y sales inorgánicas, usando procedimientos conocidos en la técnica. Los medios adecuados pueden estar disponibles de fuentes comerciales o prepararse de acuerdo con composiciones publicadas.

Tras el cultivo, los compuestos y/o las composiciones de la presente invención pueden extraerse del caldo de cultivo. El extracto puede fraccionarse mediante cromatografía.

## 15 Composiciones

Las sustancias expuestas anteriormente usadas en las composiciones y métodos divulgados en el presente documento pueden formularse de cualquier modo. Los ejemplos no limitantes de formulación incluyen, pero sin limitación, concentrados emulsionables (EC), polvos humectables (WP), líquidos solubles (SL), aerosoles, soluciones concentradas de volumen ultra-bajo (ULV), polvos solubles (SP), microencapsulación, gránulos dispersos en agua, fluidos (FL), microemulsiones (ME), nanoemulsiones (NE), etc. En cualquier formulación descrita en el presente documento, el porcentaje del principio activo se encuentra dentro de un intervalo del 0,01% al 99,99%.

Las composiciones pueden estar en forma de un líquido, gel o sólido. Las composiciones líquidas comprenden compuestos plaguicidas procedentes de una cepa de *Chromobacterium*, por ejemplo, una cepa que tiene las características identificativas de *Chromobacterium substugae* sp. Nov y más particularmente, que tienen las características identificativas de NRRL B-30655 (véase la Patente de los Estados Unidos n.º 7.244.607).

Puede prepararse una composición sólida suspendiendo un vehículo sólido en una solución de compuestos plaguicidas y secar la suspensión en condiciones suaves, tales como evaporación a temperatura ambiente o evaporación al vacío a 65°C o menor.

Una composición puede comprender compuestos encapsulados en gel procedentes de la cepa de *Chromobacterium*. Dichos materiales encapsulados en gel pueden prepararse mezclando un agente formador de gel (por ejemplo, gelatina, celulosa o lignina) con un cultivo o suspensión de *Chromobacterium* vivo o inactivado, o un filtrado sin células o una fracción celular de un cultivo o suspensión de *Chromobacterium* o un cultivo, célula o fracción celular secado por pulverización o congelación o en una solución de compuestos plaguicidas usados en el método de la invención; e inducir la formación de gel del agente.

La composición puede comprender adicionalmente un tensioactivo para usarlo con el fin de emulsificación, dispersión, humectación, dispersión, integración, control de la disgregación, estabilización de principios activos y mejora de la fluidez o inhibición del óxido. En una realización particular, el tensioactivo es un tensioactivo no iónico y no fitotóxico que pertenece preferentemente a la lista 4B de inertes de la EPA. En otra realización particular, el tensioactivo no iónico es monolaurato de polioxietileno (20). La concentración de tensioactivos puede variar entre el 0,1-35% de la formulación total, siendo el intervalo preferido del 5-25%. La elección de agentes dispersantes y emulsionantes, tales como agentes dispersantes y emulsionantes no iónicos, aniónicos, anfóteros y catiónicos y la cantidad empleada se determina dependiendo de la naturaleza de la composición y la capacidad del agente para facilitar la dispersión de las composiciones de la presente invención.

La composición como se ha expuesto anteriormente también comprende un agente estabilizante, que estabiliza una composición plaguicida biológica frente a la separación física y la pérdida de actividad debido a la exposición a la luz solar. Este agente estabilizante puede ser una sal del ácido benzoico o una sal de sulfonato de lignina.

La composición expuesta anteriormente puede combinarse con otro microorganismo y/o plaguicida (por ejemplo, agente nematocida, fungicida, insecticida, antibiótico o antimicrobiano). El microorganismo puede incluir, pero sin limitación, un agente procedente de *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Brevibacillus* sp., *Lecanicillium* sp., *no-Ampelomyces* sp., *Pseudozyma* sp., *Streptomyces* sp., *Burkholderia* sp., *Trichoderma* sp., *Gliocladium* sp. Como alternativa, el agente puede ser un aceite natural o un producto oleoso que tiene actividad fungicida y/o insecticida (por ejemplo, aceite parafínico, aceite del árbol del té, aceite de hierba de limón, aceite de clavo, aceite de canela, aceite de cítrico, aceite de romero). Además, el plaguicida puede ser un agente antifúngico de un solo sitio que puede incluir, pero sin limitación, bencimidazol, un inhibidor de la desmetilación (DMI) (por ejemplo, imidazol, piperazina, pirimidina, triazol), morfolina, hidroxipirimidina, anilino pirimidina, fosforotiolato, inhibidor fuera de quinona, quinolina, dicarboximida, carboximida, fenilamida, anilino pirimidina, fenilpirrol, hidrocarburo aromático, ácido cinámico, hidroxianilida, antibiótico, polioxina, acilamina, ftalimida, bencenoide (xililalanina), un inhibidor de la desmetilación seleccionado entre el grupo que consiste en imidazol, piperazina, pirimidina y triazol (por ejemplo, bitertanol, miclobutanilo, penconazol, propiconazol, triadimefón, bromuconazol, ciproconazol, diniconazol,

fenbuconazol, hexaconazol, tebuconazol, tetraconazol), miclobutanilo y un inhibidor fuera de quinona (por ejemplo, estrobilurina). La estrobilurina puede incluir, pero sin limitación, azoxiestrobina, kresoxima-metoilo o trofloxiestrobina. En otra realización particular más, el agente antifúngico es una quinona, por ejemplo, quinoxifeno (4-fluorofenil éter de 5,7-dicloro-4-quinolilo). El agente antifúngico también puede proceder de un extracto de *Reynoutria*.

5 El fungicida también puede ser un fungicida químico multisitio no inorgánico seleccionado entre el grupo que consiste en cloronitrilo, quinoxalina, sulfamida, fosfonato, fosfito, ditiocarbamato, cloralquiltios, fenilpiridinamina, ciano-acetamida oxima.

10 La composición, como se ha indicado anteriormente, puede comprender además un insecticida. El insecticida puede incluir, pero sin limitación, avermectina, Bt, aceite de neem, espinosads, *Burkholderia* sp. tal como se expone en la Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos n.º 2011-0207604, hongos entomopatógenos, tales como *Beauveria bassiana* e insecticidas químicos, incluyendo, pero sin limitación, compuestos de organocloro, compuestos organofosforados, carbamatos, piretroides y neonicotinoides.

15 Como se ha señalado anteriormente, la composición puede comprender además un nematicida. Este nematicida puede incluir, pero sin limitación, avermectina, productos microbianos, tales como Biome (*Bacillus firmus*), *Pasteuria* spp y productos orgánicos, tales como saponinas.

## 20 Usos

Las composiciones, cultivos y sobrenadantes y compuestos plaguicidas expuestos anteriormente pueden usarse como plaguicidas. En particular, los compuestos o composiciones expuestos anteriormente pueden usarse como insecticidas, bactericidas (contra bacterias presentes en el suelo) y nematicidas. Específicamente, los nematodos que pueden controlarse usando el método expuesto anteriormente incluyen, pero sin limitación, nematodos parásitos, tales como nematodos formadores de agallas, quistes y lesiones, incluyendo, pero sin limitación, *Meloidogyne* sp., *Tylenchorhynchus* sp., *Hoplolaimus* sp., *Helicotylenchus* sp., *Pratylenchus* sp., *Heterodera* sp., *Globodera*, sp., *Trichodorus* sp. *Paratrachodorus* sp., *Xiphinema* sp., y *Criconema* sp.; en particular, *Meloidogyne incognita* (nematodos agalladores), así como *Globodera rostochiensis* y *Globodera pallida* (nematodos del quiste de la patata); *Heterodera glycines* (nematodo del quiste de la soja); *Heterodera schachtii* (nematodo del quiste de la remolacha); y *Heterodera avenae* (nematodo del quiste de los cereales).

Como se ha señalado anteriormente, los principios activos y las composiciones expuestas anteriormente también pueden aplicarse a ubicaciones que contienen *Acarí* (arácnidos), tales como ácaros, incluyendo, pero sin limitación, *Panonychus* sp., tales como *Panonychus citri* (araña roja de los cítricos) y *Panonychus ulmi* (arañuela roja), *Tetranychus* sp., tales como *Tetranychus kanzawi* (araña de Kanzawa), *Tetranychus urticae* (araña roja), *Tetranychus pacificus* (araña del pacífico), *Tetranychus turkestanii* (araña de la fresa) y *Tetranychus cinnabarinus* (araña del carmín), *Oligonychus* sp., tales como *Oligonychus panicae* (araña parda del aguacate), *Oligonychus perseae* (ácaro perseae), *Oligonychus pratensis* (ácaro de la hierba de los bancos) y *Oligonychus coffeae*, *Aculus* sp., tales como *Aculus cornatus* (araña plateada del melocotonero), *Aculus fockeni* (ácaro de la ciruela) y *Aculus lycopersici* (ácaro pardo del tomate), *Eotetranychus* sp., tales como *Eotetranychus wilametti*, *Eotetranychus yumensis* (araña de Yuma) y *Eotetranychus sexmaculatis* (araña de 6 puntos), *Bryobia rubrioculus* (ácaro pardo), *Epitrimerus pyri* (ácaro de la pera), *Phytoptus pyri* (ácaro de la ampolla de la hoja del peral), *Acalitis essigi* (ácaro rojo de las bayas), *Polyphagotarsonemus latus* (araña blanca), *Eriophyes sheldoni* (ácaro de los brotes de los cítricos), *Brevipalpus lewisi* (ácaro plano de los cítricos), *Phyllocoptruta oleivora* (ácaro de la roya de los cítricos), *Petrobia lateens* (ácaro pardo del trigo), *Oxyenus maxwelli* (ácaro del olivo), *Rhizoglyphus* spp., *Tyrophagus* spp., *Diptacus gigantorhynchus* (ácaro cabezón de la ciruela) y *Penthalea major* (ácaro del grano del invierno), ácaro rojo del aguacate, ácaro plano, arañuela negra y roja del mango, araña enrolladora del borde de la hoja de la papaya, araña de los cítricos de Texas, ácaro rojo europeo, ácaro del eriné de la uva (ácaro ampollador), arañuela del pacífico, arañuela de Willamette; ácaro rosado del moho de los cítricos. Dichas ubicaciones pueden incluir, pero sin limitación, cultivos que se infestan por dichos ácaros u otros arácnidos (por ejemplo, afénidos). Dichas ubicaciones pueden incluir, pero sin limitación, cultivos que se infestan por dichos ácaros u otros arácnidos (por ejemplo, afénidos).

55 Los insectos fitopatógenos controlados mediante el método expuesto anteriormente incluyen, pero sin limitación, larvas de insectos *no-Culicidae* del orden *Lepidoptera*, por ejemplo, *Acleris* spp., *Adoxophyes* spp., *Aegeria* spp., *Agrotis* spp., *Alabama argillaceae*, *Amylois* spp., *Anticarsia gemmatalis*, *Archips* spp., *Argyrotaenia* spp., *Autographa* spp., *Busseola fusca*, *Cadra cautella*, *Carposina nipponensis*, *Chilo* spp., *Choristoneura* spp., *Clysis ambiguella*, *Cnaphalocrocis* spp., *Cnephasia* spp., *Cochylys* spp., *Coleophora* spp., *Crociodolomia binotalis*, *Cryptophlebia leucotreta*, *Cydia* spp., *Diatraea* spp., *Diparopsis castanea*, *Earias* spp., *Epehstia* spp., *Eucosma* spp., *Eupoecilia ambiguella*, *Euproctis* spp., *Euxoa* spp., *Grapholita* spp., *Hedya nubiferana*, *Heliothis* spp., *Hellula undalis*, *Hyphantria cunea*, *Keiferia lycopersicella*, *Leucoptera scitella*, *Lithocolletis* spp., *Lobesia botrana*, *Lymantria* spp., *Lyonetia* spp., *Malacosoma* spp., *Mamestra brassicae*, *Manduca sexta*, *Operophtera* spp., *Ostrinia nubilalis*, *Pammene* spp., *Pandemis* spp., *Panolis flammea*, *Pectinophora gossypiella*, *Phthorimaea operculella*, *Pieris rapae*, *Pieris* spp., *Plutella xylostella*, *Prays* spp., *Scirpophaga* spp., *Sesamia* spp., *Sparganothis* spp., *Spodoptera* spp., *Synanthedon* spp., *Thaumetopoea* spp., *Tortrix* spp., *Trichoplusia ni* e *Yponomeuta* spp.; (b) *Coleoptera*, por

ejemplo, *Agriotes spp.*, *Alphitobius sp.*, *Anomola spp.*, por ejemplo, *Anomala orientalis*; *Anthonomus spp.*, *Atomaria linearis*, *Chaetocnema tibialis*, *Cosmopolites spp.*, *Curculio spp.*, *Cyclocephala spp.*, por ejemplo, *Cyclocephala lurida*, *Dermestes spp.*, *Diabrotica spp.*, *Epilachna spp.*, *Eremnus spp.*, *Leptinotarsa decemlineata*, *Lissorhoptrus spp.*, *Melolontha spp.*, *Oryzaephilus spp.*, *Otiorynchus spp.*, *Otiorynchus sulcatus*, *Phlyctinus spp.*, *Popillia spp.*,  
 5 por ejemplo, *Popilla japonica*, *Psylliodes spp.*, *Rhizopertha spp.*, por ejemplo, *Rhizotrogus majalis*, *Sitophilus spp.*, *Sitotroga spp.*, *Tenebrio spp.*, *Tribolium spp.* y *Trogoderma spp.*; (c) Orthoptera, por ejemplo, *Blatta spp.*, *Blattella spp.*, *Grylotalpa spp.*, *Leucophaea maderae*, *Locusta spp.*, *Periplaneta spp.* y *Schistocerca spp.*; (d) Isoptera, por ejemplo, *Reticulitermes spp.*; (e) Psocoptera, por ejemplo, *Liposcelis spp.*; (f) Anoplura, por ejemplo, *Haematopinus spp.*, *Linognathus spp.*, *Pediculus spp.*, *Pemphigus spp.* y *Phylloxera spp.*; (g) Mallophaga, por ejemplo, *Damalinea spp.* y *Trichodectes spp.*; (h) Thysanoptera, por ejemplo, *Frankliniella spp.*, *Hercinotrips spp.*, *Taeniothrips spp.*, *Thrips palmi*, *Thrips tabaci* y *Scirtothrips aurantii*; (i) Heteroptera, por ejemplo, *Cimex spp.*, *Distantiella theobroma*, *Dysdercus spp.*, *Euchistus spp.*, *Eurygaster spp.*, *Leptocoris spp.*, *Nezara spp.*, *Piesma spp.*, *Rhodnius spp.*, *Sahlbergella singularis*, *Scotinophara spp.* y *Tiatoma spp.*; (j) Homoptera, por ejemplo, *Aleurothrix usflocosus*, *Aleyrodes brassicae*, *Aonidiella spp.*, *Aphididae*, *Aphis spp.*, *Aspidiotus spp.*, *Bactericera spp.*, *Bemisia tabaci*,  
 15 *Ceroplaster spp.*, *Chrysomphalus aonidium*, *Chrysomphalus dictyospermi*, *Coccus hesperidum*, *Empoasca spp.*, *Eriosoma larigerum*, *Erythroneura spp.*, *Gascardia spp.*, *Laodelphax spp.*, *Lecanium corni*, *Lepidosaphes spp.*, *Macrosiphus spp.*, *Myzus spp.*, *Nephotettix spp.*, *Nilaparvata spp.*, *Paratoria spp.*, *Pemphigus spp.*, *Planococcus spp.*, *Pseudaulacaspis spp.*, *Pseudococcus spp.*, *Psylla spp.*, *Pulvinaria aethiopica*, *Quadraspidiotus spp.*, *Rhopalosiphum spp.*, *Saissetia spp.*, *Scaphoideus spp.*, *Schizaphis spp.*, *Sitobion spp.*, *Trialeurodes vaporariorum*,  
 20 *Triozidae spp.*, *Trioza erytraeae* y *Unaspis citri*; (k) Hymenoptera, por ejemplo, *Acromyrmex*, *Atta spp.*, *Cephus spp.*, *Diprion spp.*, *Diprionidae*, *Gilpinia polytoma*, *Hoplocampa spp.*, *Lasius spp.*, *Monomorium pharaonis*, *Neodiprion spp.*, *Solenopsis spp.* y *Vespa spp.*; (l) Diptera, por ejemplo, *Aedes spp.*, *Antherigona soccata*, *Bibio hortulanus*, *Calliphora erythrocephala*, *Ceratitis spp.*, *Chrysomyia spp.*, *Cuterebra spp.*, *Dacus spp.*, *Delia spp.*, *Delia radicum*, *Drosophila spp.*, por ejemplo, *Drosophila suzukii*; *Fannia spp.*, *Gastrophilus spp.*, *Glossina spp.*, *Hypoderma spp.*,  
 25 *Hyppobosca spp.*, *Liriomyza spp.*, *Lucilia spp.*, *Melanagromyza spp.*, *Musca spp.*, *Oestrus spp.*, *Orseolia spp.*, *Oscinella frit*, *Pegomyia hyoscyami*, *Phorbia spp.*, *Rhagoletis pomonella*, *Sciara spp.*, *Stomoxys spp.*, *Tabanus spp.*, *Tannia spp.* y *Tipula spp.*; (m) Siphonaptera, por ejemplo, *Ceratophyllus spp.* y *Xenopsylla cheopis*; (n) del orden *Thysanura*, por ejemplo, *Lepisma saccharina*; (o) Hemiptera, por ejemplo, *Bactericera sp.*, por ejemplo, *Bactericera cockerelli*.

30 Los principios activos pueden aplicarse a ubicaciones que contienen plagas de *Scarabaeidae*. Estas incluyen, pero sin limitación, suelo, hierba y diversas plantas ornamentales, árboles y hortalizas.

35 Los principios activos y las composiciones expuestas anteriormente también pueden aplicarse a ubicaciones que contienen la plaga de *Muscidae*. Estos incluyen, pero sin limitación, ambientes interiores, basura, animales, vallas, corrales, graneros, salas de ordeño, corrales de parto, etc. que contienen animales (ganado bovino, cerdos, ovejas, caballos, etc.).

40 Los principios activos y las composiciones expuestas anteriormente pueden aplicarse además a ubicaciones que contienen los principios activos y composiciones que contienen una plaga de *Tenebrionidae*. Estas incluyen, pero sin limitación, granos, aves de corral y acorralamientos (vallas, corrales, graneros, salas de ordeño, corrales de parto, etc.) que contienen animales (ganado bovino, cerdos, ovejas, caballos, etc.).

### 45 Ejemplos

Las composiciones y métodos expuestos anteriormente se ilustrarán adicionalmente en los siguientes ejemplos no limitantes. Los ejemplos son meramente ilustrativos de diversas realizaciones y no limitan la invención reivindicada en lo referente a los materiales, las condiciones, las relaciones en peso, los parámetros de procesos y similares citados en el presente documento.

50 **También se divulga un ensayo que describe (anterior ejemplo 1): Extracción de cromamida, desoxiviolaceína y violaceína de *Chromobacterium substugae***

55 El siguiente procedimiento se usa para la purificación de compuestos extraídos del cultivo de *Chromobacterium substugae*:

Se extrajo el caldo de cultivo procedente de la fermentación de 10 l de *C. substugae* en caldo L con resina Amberlite XAD-7 (Asolkar et al., 2006) agitando la suspensión celular con resina a 225 rpm durante dos horas a temperatura ambiente. La resina y la masa celular se recogen por filtración a través de estopilla y se lavan con agua DI para retirar las sales. La resina, la masa celular y la estopilla se empapan durante 2 h en acetona/metanol (50/50) tras lo que la acetona/metanol se filtra y seca al vacío usando un evaporador rotatorio para proporcionar el extracto en bruto. Después, se fracciona el extracto en bruto usando cromatografía de exclusión por tamaños Sephadex LH 20 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>OH; 50/50) para dar 7 fracciones (figura 1). Después, se concentraron estas fracciones a sequedad usando un evaporador rotatorio y se evalúa en los residuos secos resultantes su actividad biológica usando un ensayo de alimentación con oruga de la col (*Trichoplusia ni*) o la gardama (*Spodoptera exigua*). Después, se sometió a las fracciones activas a HPLC en fase reversa (Spectra System P4000 (Thermo Scientific)) para proporcionar compuestos puros, que después se evaluaron en los bioensayos anteriormente mencionados para

localizar/identificar los compuestos activos. Para confirmar la identidad del compuesto, se registraron datos espectroscópicos adicionales, tales como CL/EM y RMN.

5 La cromamida A (1) y el compuesto B se obtuvieron de las fracciones 1 y 2, respectivamente, mientras que la violaceína (2) y la desoxiviolaceína (3) se purificaron de la fracción 5 obtenida mediante cromatografía Sephadex LH 20.

#### **Purificación de compuestos**

10 La purificación de la cromamida A (1) se realizó usando una columna HPLC C-18 (Phenomenex, Luna 10 u C18 (2) 100 A, 250 x 10), sistema disolvente de agua:acetonitrilo con gradiente (0-10 min, 80-75% de CH<sub>3</sub>CN acuoso; 10-45 min, 75-60 % de CH<sub>3</sub>CN acuoso; 45-55 min, 60-50 % de CH<sub>3</sub>CN acuoso; 55-65 min, 50-100 % de CH<sub>3</sub>CN acuoso; 65-70 min, 100% CH<sub>3</sub>CN; 55-70 min, 0-80% de CH<sub>3</sub>CN acuoso) a un caudal de 2,5 ml/min y detección UV de 210 nm. El compuesto activo cromamida A (1), tiene un tiempo de retención de 23,19 min.

15 La purificación del compuesto B de la invención se realizó usando una columna de HPLC C-18 (Phenomenex, Luna 10 u C18 (2) 100 A, 250 x 10), sistema disolvente de agua:acetonitrilo con gradiente (0-10 min, 80-75% de CH<sub>3</sub>CN acuoso; 10-45 min, 75-60 % de CH<sub>3</sub>CN acuoso; 45-55 min, 60 - 50% de CH<sub>3</sub>CN acuoso; 55-65 min, 50-100% de CH<sub>3</sub>CN acuoso; 65-70 min, 100% CH<sub>3</sub>CN; 55-70 min, 0-80% de CH<sub>3</sub>CN acuoso) a un caudal de 2,5 ml/min y detección UV de 210 nm, el compuesto activo B, tiempo de retención 26,39 min.

20 La purificación de la violaceína (2) y la desoxiviolaceína (3) se realizó usando una columna de HPLC C-18 (Phenomenex, Luna 10 u C18 (2) 100 A, 250 x 10), sistema disolvente de agua:acetonitrilo con gradiente (0-10 min, 70-60 % de CH<sub>3</sub>CN acuoso; 10-40 min, 60 - 20% de CH<sub>3</sub>CN acuoso; 40-60 min, 20 - 0 % de CH<sub>3</sub>CN acuoso; 60-65 min, 100% CH<sub>3</sub>CN; 65-75 min, 0-70 % de CH<sub>3</sub>CN acuoso) a un caudal de 2,5 ml/min y detección UV de 210 nm, los compuestos activos de violaceína (2), tuvieron un tiempo de retención de 7,86 min y los de desoxiviolaceína (3) un tiempo de retención de 12,45 min.

#### **Análisis de los compuestos por espectroscopía de masas**

30 El análisis por espectrometría de masas de los picos activos se realiza en un instrumento de electronebulización (ESI) Thermo Finnigan LCQ Deca XP Plus usando los modos de ionización tanto positivo como negativo en un modo de escaneo completo (m/z 100-1500 Da) en un espectrómetro de masas LCQ DECA XP<sup>plus</sup> (Thermo Electron Corp., San José, CA). Instrumento de cromatografía líquida de alto rendimiento térmico (HPLC) equipado con detector Finnigan Surveyor PDA plus, autosampler plus, bomba MS y una columna 4,6 mm x 100 mm Luna C18 5 μ 100 A (Phenomenex). El sistema disolvente consiste en agua (disolvente A) y acetonitrilo (disolvente B). La fase móvil comienza al 10 % de disolvente B y se incrementa de forma lineal hasta el 100% de disolvente B durante 20 min y después se mantiene durante 4 min y finalmente se vuelve al 10% de disolvente B durante 3 min y se mantiene durante 3 min. El caudal es de 0,5 ml/min. El volumen de inyección fue de 10 μl y las muestras se mantienen a temperatura ambiente en un automuestreador. Los compuestos se analizaron mediante CL-EM utilizando la LC y cromatografía de fase inversa. El análisis por espectroscopía de masas de los presentes compuestos se realiza en las siguientes condiciones: El caudal del gas nitrógeno se fijó a 30 y 15 arb para el caudal del gas de impulsión y del aux/de barrido, respectivamente. La ionización por electronebulización se realizó con un voltaje de pulverización ajustado a 5000 V y un voltaje capilar a 35,0 V. La temperatura capilar se ajustó a 400 °C. Los datos se analizaron con un programa informático Xcalibur. La cromamida A (1) tiene una masa molecular de 860 en modo positivo de ionización. El cromatograma CL-EM para otro compuesto B activo sugiere una masa molecular de 874 en modo positivo de ionización. La violaceína (2) y la desoxiviolaceína (3) tenían masas moleculares de 313 y 327 respectivamente en modo positivo de ionización.

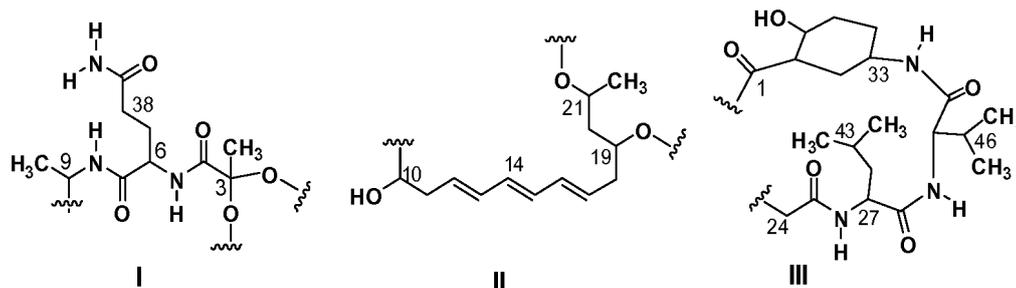
#### **Análisis de los compuestos por espectroscopía de RMN**

Los espectros RMN-RMN se midieron en un espectrómetro de gradiente de campo Bruker 600 MHz. La referencia se ajusta al patrón interno tetrametilsilano (TMS, 0,00 ppm). Los análisis de aminoácidos se llevaron a cabo en un analizador de aminoácidos Hitachi 8800.

55 Para la elucidación de la estructura, la cromamida A purificada con peso molecular 860 se volvió a analizar usando un instrumento de RMN de 600 MHz y tiene valores RMN <sup>1</sup>H δ a 8,89, 8,44, 8,24, 8,23, 7,96, 7,63, 6,66, 5,42, 5,36, 5,31, 5,10, 4,13, 4,07, 4,05, 3,96, 3,95, 3,88, 3,77, 3,73, 3,51, 3,44, 3,17, 2,40, 2,27, 2,11, 2,08, 2,03, 2,01, 1,97, 1,95, 1,90, 1,81, 1,68, 1,63, 1,57, 1,53, 1,48, 1,43, 1,35, 1,24, 1,07, 1,02, 0,96, 0,89, 0,88, 0,87, 0,80 (véase la FIG. 4) y tiene valores RMN <sup>13</sup>C de 173,62, 172,92, 172,25, 172,17, 171,66, 171,28, 170,45, 132,13, 130,04, 129,98, 129,69, 129,69, 125,48, 98,05, 70,11, 69,75, 68,30, 68,25, 64,34, 60,94, 54,54, 52,82, 49,72, 48,57, 45,68, 40,38, 39,90, 38,18, 36,60, 31,98, 31,62, 31,58, 29,53, 28,83, 27,78, 24,41, 23,06, 22,09, 20,56, 19,31, 18,78, 17,66, 15,80. La cromamida A se aisló en forma de un sólido de color blanco, el cual se analizó para la fórmula molecular C<sub>43</sub>H<sub>68</sub>N<sub>6</sub>O<sub>12</sub> (13 grados de insaturación), mediante espectrometría de masas de alta resolución ESI (obs. M<sup>+</sup> m/z 861,5376, calc. M<sup>+</sup> m/z 861,5343). Los datos espectrales de la RMN <sup>1</sup>H de la cromamida A en DMSO-d<sub>6</sub> exhibieron 68 señales de protones, en las que nueve protones [δ<sub>H</sub>: 8,89, 8,44, 8,23, 8,22, 7,96, 7,64, 6,65, 5,10, 4,13], se

asignaron como NH u OH debido a la falta de correlación de carbono en un análisis de RMN de correlación heteronuclear (HMQC). El espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ , mostró siete señales de carbonilo [ $\delta_{\text{C}}$ : 173,62, 172,92, 172,25, 172,17, 171,66, 171,28, 170,45] y en el espectro de RMN  $^1\text{H}$ , se observaron seis señales características de protones  $\alpha$ -amino [ $\delta_{\text{H}}$ : 4,07, 4,06, 3,96, 3,95, 3,88, 3,72] lo que demuestra que la cromamida A es un péptido.

5 La interpretación de los datos de la RMN 2D RMN condujo a la asignación de tres unidades de aminoácidos de los seis, una leucina (Leu), una valina (Val) y una glutamina (Gln). La presencia de estos aminoácidos se confirmó mediante los resultados de análisis de aminoácidos, que también mostraron la presencia de los anteriores tres aminoácidos. Otros análisis de DEPT y datos espectrales de la RMN 2D (COSY, HSQC y HMBC) establecieron la presencia de tres subestructuras I, II y III tal como se muestra a continuación.



15 Las conexiones de las tres subestructuras en **1** se lograron mediante análisis de RMN HMBC rutinarios usando correlaciones entre el protón  $\alpha$ -amino y/o el protón de amida secundaria y las resonancias de carbono carbonilo y la consideración de cambio químico. El enlace de C-9 de la subestructura I con C-10 de la subestructura II se estableció mediante correlaciones HMBC de  $\text{CH}_3$ -40 [ $\delta_{\text{H}}$ : 1,00] y el protón  $\alpha$ -amino de alanina [ $\delta_{\text{H}}$ : 3,42] con el carbono C-10 [ $\delta_{\text{C}}$ : 70,11]. Esto se volvió a confirmar mediante correlación HMBC de hidroxilo en [ $\delta_{\text{H}}$ : 5,10] con C-9 en [ $\delta_{\text{C}}$ : 49,78]. El metileno en [ $\delta_{\text{H}}$ : 3,50] de la subestructura III mostró una correlación HMBC de tres enlaces a C-19 [ $\delta_{\text{C}}$ : 68,31] que conectó las subestructuras I y II. El carbono cuaternario en C-3 [ $\delta_{\text{C}}$ : 98,09] se conectó con C-21 [ $\delta_{\text{C}}$ : 64,40] a través de una correlación débil de H-21 [ $\delta_{\text{H}}$ : 3,95] junto con sus valores de cambio químico para formar un sistema de anillo. Por último, el enlace de cierre del anillo se aseguró mediante una correlación HMBC de tres enlaces de H-36 [ $\delta_{\text{H}}$ : 1,43] a C-1 [ $\delta_{\text{C}}$ : 172,17], lo que permitió asignar la estructura de la cromamida A (**1**).

25 El compuesto B con un peso molecular de 874 mostró datos similares de RMN y UV que sugieren que este compuesto B también pertenece a la clase de los péptidos.

30 La estructura de la violaceína (**2**) y la deoxiviolaceína (**3**) se asignaron por comparación de los datos de estos compuestos con los publicados en la bibliografía. Las estructuras de la cromamida A, la violaceína y la deoxiviolaceína son como se muestran en la figura 2.

### Ejemplo 2: Análisis de aminoácidos de cromamida A

35 La cromamida A (0,05 mg) se hidrolizó usando hidrólisis en fase líquida (HCL 6N, fenol al 1%, 110°C, 24h, al vacío). Tras enfriar, se secó la mezcla de reacción y el producto hidrolizado se disolvió en tampón de dilución Norleu hasta un volumen de 1,0 ml. Se cargaron 50 $\mu\text{l}$  de la muestra en la columna de intercambio iónico para su análisis.

40 Para los patrones y la calibración, se usó la solución patrón de aminoácidos para hidrolizado de proteínas en el dispositivo Hitachi 8800 a base de Na (Sigma, A-9906) para determinar los factores de respuesta y de este modo calibrar el analizador Hitachi 8800 para todos los aminoácidos. Cada inyección contiene norleucina como patrón interno para permitir la corrección de los resultados respecto de variaciones en el volumen de la muestra y las variables de la cromatografía. El sistema utiliza tampones de Na de Pickerin, HCl de grado secuencial de Pierce (hidrólisis), una columna de intercambio iónico de Transgenomic y un método optimizado desarrollado por Molecular Structure Facility (MSF), UC Davis y se comunican los aminoácidos individuales presentes en la muestra. Se observó que los aminoácidos presentes en la muestra (cromamida A) eran Glx (glutamina/ácido glutámico), leu (leucina) y Val (valina).

### Ejemplo 3: Efecto de *Chromobacterium substugae* (MBI-203) contra la araña roja-Plantas de leguminosas

50 Se mezcló MBI-203 criodesecado con agua destilada a diversas concentraciones de equivalente de caldo celular completo. Se rociaron plantas de leguminosas sin tratar, *Phaseolus vulgaris*, con MBI-203. Después, se tomaron discos foliares de las plantas rociadas y se colocaron en una placa de Petri como fuente de alimento para arañas rojas, *Tetranychus urticae*. Se colocaron 10 arañas en cada placa y se incubó a 24°C (75°F), 12:12 (L:D). Las evaluaciones de arañas vivas y muestras se registraron 1, 3 y 7 días después de la infestación. 1x CFD es material criodesecado reconstituido a concentraciones celulares de caldo celular completo (0,0103 g criodesecado/ml de dH<sub>2</sub>O). En la figura 3 se muestran los resultados.

**Ejemplo 4: Efecto de *Chromobacterium substugae* (MBI-203) contra la araña roja-Caléndula**

Se infestó a plantas de caléndula, *Tagetes erecta*, con arañas rojas, *Tetranychus urticae*. Se aplicó producto formulado (MBI-203) o *Chenopodium ambrosioides* (comercializado como REQUIEM® por AgraQuest, Inc., Davis, CA) a plantas infestadas con intervalos de temperatura de aproximadamente 24-29°C (72-85°F). Para muestrear, se recogió una superficie foliar de 6 cm<sup>2</sup> y se contó el número de ninfas e inmaduras vivas y muertas. En la tabla 1 se muestran los resultados.

**Tabla 1: Comparación de MBI-203 con REQUIEM®**

		Día 0	Día 3	Día 5	Día 7	Día 14
Tratamiento	Estadio	Con vida				
Sin tratar	ninfa	155	165	180	181	200
MBI-203 al 1%	ninfa	146	74	144	218	216
MBI-203 al 5%	ninfa	142	92,8	143	170	175
REQUIEM® (+)	ninfa	142	145	147	158	153
Sin tratar	Adulto	48	60,8	75,3	77	115
MBI-203 al 1%	Adulto	61,3	84,3	94	88,8	105
MBI-203 al 5%	Adulto	35,5	72,3	93,8	113	111
REQUIEM® (+)	Adulto	36,5	44	68	94,5	91,5

**Ejemplo 5: Efecto de la exploración de *Chromobacterium substugae* (MBI-203) contra la araña roja (TSSM)-Judía verde**

Se rociaron judías verdes infestadas con TSSM o TSSM resistentes a abamectina con diluciones al 0,5%, 1%, 2% y 4% v/v de MBI-203 formulado a aproximadamente 935 litros/hectárea (100 gal/acre). La mortalidad se evaluó 9 días después de la aplicación. En la tabla 2 se muestran los resultados.

**Tabla 2: Efecto de MBI-203 en infestación por TSSM en judía verde**

	TSSM susceptibles			TSSM resistentes a abamectina		
	% de reducción			% de reducción		
Concentración	Huevos	Ninfas	Adultos	Huevos	Ninfas	Adultos
0,5%	0	0	0	n/a	n/a	n/a
1%	0	0	0	0	0	0
2%	8	15	25	0	0	0
4%	55	55	60	0	0	0

**Ejemplo 6: Exploración de MBI-203 contra arañas rojas en la fresa**

Se evaluó la eficacia de cinco compuestos tradicionales y los ingredientes de MBI-203 en el control de TSSM en trasplantes de fresa en campo en el Florida Gulf Coast Research and Education Center. Las plántulas se trasplantaron en el campo (día 0). Cada parcela de 3,8 m (12,5 pies) constaba de 20 plantas. Las parcelas se infestaron cuatro veces, desde el día 55 hasta el día 71 con 10 a 20 TSSM móviles por planta. Se replicaron diecisiete tratamientos de diversas tasas y pautas de aplicación de mitocidas, algunos combinados con un adyuvante y un control no tratado cuatro veces en un diseño RCB. Los tratamientos se aplicaron usando un pulverizador manual con una varilla pulverizadora con una boquilla que contenía un centro a 45 grados y un disco del número cuatro. El pulverizador se presurizó con CO<sub>2</sub>, a 275 kPa (40 psi) y se calibró para suministrar 935 litros por hectárea (100 galones por acre). Las muestras se recogieron semanalmente desde el día 90 antes de la pulverización hasta 2 semanas después de la última aplicación de los tratamientos (día 154). Las muestras consistían en diez hojuelas seleccionadas al azar y se recogieron del estrato del primer tercio de las plantas. Se recogieron con un pincel TSSM móviles y sus huevos de las hojuelas en discos rotatorios adherentes y se contaron. No se observó fitotoxicidad. Los resultados se muestran en las tablas 3 y 4.

Tabla 3. La eficacia de cinco principios activos químicos tradicionales y dos de origen biológico para el control de la TSSM

Tratamiento/ Formulación <sup>a</sup>	Tasa cantidad/ acre	Número de TSSM móviles/hojuela													
		día 90	día 98	día 105	día 111	día 118	día 125	día 132	día 139	día 146	día 154				
Sin tratar	--	8,8 a	2,0 a	7,3 a	4,8 a	14,3 a	47,5 a	89,8 a	150,5 a	277,5 a	319,0 a				
Abamectina como p.a. <sup>d</sup> (comercializada como AGRI-MEK® 0,15 EC, Syngenta Inc.)	0,47 l (16 fl. oz.)	8,5 a	4,5 a	6,3 a	5,3 a	0,5 e	0,5 h	3,0 d-f	6,3 fg	6,8 g-i	15,3 e-g				
Bifenazato como p.a. <sup>d</sup> (comercializado como ACRAMITE® 50WS, Chemtura) + INDUCE® <sup>b</sup> COHERE®	435 g (1 lb)	3,8 a	6,0 a	6,0 d	0,8 c	8,3 b-f	20,5 c-e	3,0 i	28,0 ef	66,5 de	128,3 b-f				
Espiromesifina como p.a. <sup>d</sup> + INDUCE® <sup>b</sup>	0,47 l (16 fl. oz.)	2,8 a	5,5 a	7,0 a	5,5 a	14,3 ab	34,3 ab	72,5 ab	121,3 ab	237,8 a	270,0 a				
Fenprosimato como p.a. <sup>d</sup> (comercializado como PORTAL® 5% EC, Nichino America)	0,35 l (12 fl. oz.)	2,8 a	2,3 a	2,0 a	2,3 a	0,5 e	0,8 gh	0,5 ef	2,5 gh	2,8 i	6,0 g				
Hexitiazox como p.a. <sup>d</sup> (comercializado como SAVEY® 50DF, Gowan)	0,94 l (32 fl. oz.)	4,5 a	3,8 a	6,5 a	2,8 a	2,0 c-e	7,3 c-f	5,3 de	10,0 e-g	34,3 d-f	145,3 a-c				
MBI-203 + INDUCE® <sup>b</sup>	0,17 l (6 oz)	2,0 a	1,8 a	2,8 a	6,0 a	13,8 ab	23,0 ab	57,5 ab	103,3 ab	196,0 ab	285,5 a				
MBI-203 + INDUCE® <sup>b</sup>	3,78 l (1 gal.)	4,3 a	-	9,5 a	7,8 a	10,3 a-d	18,0 a-d	54,5 ab	97,8 a-c	196,3 ab	218,0 ab				
MBI-203 + INDUCE® <sup>b</sup>	11,35 l (3 gal.)	2,8 a	-	4,5 a	5,3 a	16,0 ab	8,8 b-e	22,5 bc	38,8 b-d	87,5 b-d	156,0 a-c				
$F_{17,51}$		1,35	0,75 ( $F_{13,39}$ )	1,34	0,94	4,44	7,82	11,12	13,26	15,86	13,84				
Valor de P		0,20	0,70	0,21	0,53	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001				

Los datos se transformaron a  $\log_{10}(x+1)$  antes de la ANOVA; se comunican las medias no transformadas. Las medias dentro de una columna seguidas de la misma letra no son estadísticamente diferentes, según la LSD protegida de Fisher ( $P \leq 0,05$ ).

<sup>a</sup> Un signo '+' indica que se combinaron los productos.  
<sup>b</sup> INDUCE®, (Aquatic Ecosystems, Inc.), tensioactivo no iónico, aplicado a 2,33 l/ha (32 fl. oz./acre)  
<sup>c</sup> COHERE®, (Helena Chemical Company), adyuvante difusor-adherente no iónico, aplicado a 1,16 l/ha (16 fl. oz./acre)  
<sup>d</sup> p.a. es principio activo

**Tabla 4. La eficacia de cinco principios activos químicos tradicionales y dos de origen biológico para el control de la TSSM**  
**Número de huevos de TSSM/hojuela**

Tratamiento/ Formulación <sup>a</sup>	Tasa cantidad /acre	día 90	día 98	día 105	día 111	día 118	día 125	día 132	día 139	día 146	día 154
Sin tratar	-	15,5 a	10,0 a	27,5 ab	12,3 a	25,3 a	122,0 a	181,5 a	587,0 a	559,0 a	423,0 a
Abamectina como p.a. <sup>a</sup> (comercializada como AGRI-MEK® 0,15EC, Syngenta Inc.)	0,47 l (16 fl. oz.)	6,8 a	17,0 a	26,5 ab	12,0 ab	1,3 ef	2,3 gh	6,5 hi	3,5 f-h	3,5 gh	41,3 e-g
Bifentato como p.a. <sup>a</sup> (comercializado como ACRAMITE® 50WS, Chemtura) + INDUCE® <sup>b</sup>	435 g (1 lb)	3,8 a	6,0 a	6,0 d	0,8 c	8,3 b-f	20,5 c-e	3,0 i	28,0 ef	66,5 de	128,3 b-f
COHERE®	0,47 l (16 fl. oz.)	6,8 a	15,5 a	11,8 a-d	16,8 a	31,5 ab	148,3 a	114,0 ab	321,0 ab	525,3 a	377,0 a
Espiroesifina como p.a. <sup>a</sup> + INDUCE® <sup>b</sup>	0,35 l (12 fl. oz.)	7,3 a	5,3 a	7,3 d	5,0 bc	1,5 d-f	2,3 f-h	2,8 hi	0,8 h	4,5 f-h	25,5 fg
Fenproximoato como p.a. <sup>a</sup> (comercializado como PORTAL® 5% EC, Nichino America)	0,94 l (32 fl. oz.)	9,3 a	11,8 a	12,3 cd	12,5 ab	1,0 f	34,5 bc	20,8 de	28,5 d	97,3 cd	240,8 a-d
Hexitiazox como p.a. <sup>a</sup> (comercializado como SAVEY® 50DF, Gowan)	0,17 l (6 oz)	2,0 a	8,5 a	15,0 a-d	17,0 a	22,0 ab	71,5 ab	128,5 ab	281,5 ab	393,5 ab	533,0 a
MBI-203 + INDUCE® <sup>b</sup>	3,78 l (1 gal.)	8,0 a	-	27,3 ab	20,5 a	19,5 ab	56,3 ab	91,8 a-c	187,3 bc	304,5 ab	432,3 a
MBI-203 + INDUCE® <sup>b</sup>	11,35 l (3 gal.)	5,0 a	-	11,0 b-d	14,5 a	11,0 a-c	30,0 bc	35,5 c-e	57,8 cd	238,3 a-c	341,5 ab
<i>F</i> <sub>17,51</sub>		0,95	0,96 ( <i>F</i> <sub>43,39</sub> )	2,12	1,93	4,48	13,52	18,40	19,96	19,16	5,13
Valor de P		0,5194	0,5042	0,0201	0,0363	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001

Los datos se transformaron a log<sub>10</sub>(x+1) antes de la ANOVA; se comunican las medias no transformadas. Las medias dentro de una columna seguidas de la misma letra no son estadísticamente diferentes, según la LSD protegida de Fisher (*P*≤0,05).

<sup>a</sup>Un signo '+' indica que se combinaron los productos.

<sup>b</sup> INDUCE® (Aquatic Ecosystems, Inc.), tensioactivo no iónico, aplicado a 2,33 l/ha (32 fl. oz./acre)

<sup>c</sup> COHERE®, (Helena Chemical Company), adyuvante difusor-adherente no iónico, aplicado a 1,16 l/ha (16 fl. oz./acre)

<sup>d</sup> p.a. es principio activo

**También se divulga un ensayo que describe (anterior ejemplo 7): Efecto de *Chromobacterium substugae* (MBI-203) contra las moscas domésticas**

5 Se explora la eficacia del contacto de la sustancia de ensayo contra las moscas domésticas (adultos). Hay tres grupos de tratamiento para cada compuesto: concentración al 1,5%, 3% y 6% más un control sin tratar. Cada grupo contiene cinco replicados con aproximadamente 10 insectos cada uno. Los artrópodos se tratarán con un pulverizador de bomba manual hasta que se alcanza una "cobertura completa", en tazas de 0,47 l (16 oz.) con tapas para bebidas. A las cuatro horas, se proporcionó para las moscas una torunda de algodón con solución de sacarosa al 10% insertándola en la perforación en la tapa. Los datos se toman a los 5, 15, 30, 45, 60 minutos y 2, 4 y 24 horas o hasta el criterio de valoración. Se determinaron el aturdimiento y la mortalidad contando el número relativo de insectos propensos. Los insectos moribundos no se incluyeron en los totales de mortalidad. Los resultados se muestran a continuación en la tabla 5.

**Ejemplo 8: Efecto de *Chromobacterium substugae* (MBI-203) contra escarabajos del estiércol**

15 Se evaluaron tres grupos de tratamiento por cada compuesto: concentración al 1,5%, 3% y 6% más un control sin tratar. Cada grupo contenía cinco replicados con aproximadamente 10 insectos cada uno. Se trataron los artrópodos con un pulverizador de bomba manual hasta que se alcanzó una "cobertura completa", en tacitas de 0,29 o 0,47 l (8 o 16 oz) con tapas perforadas con papel de filtro al fondo para absorber cualquier exceso de material. Se observó aturdimiento y mortalidad a los 5, 15, 30, 45, 60 minutos y a las 2, 4, 24, 48 y 72 horas después del tratamiento. Se determinaron el aturdimiento y la mortalidad contando el número relativo de insectos propensos. Los insectos moribundos no se incluyeron en los totales de mortalidad. Los resultados se muestran a continuación en la tabla 6.

**Tabla 5**

	Tasa	Aturdimiento										Mortalidad		
		5 min	15 min	30 min	45 min	1 h	2hr	4hr	24 h	48 h	72 h			
Mosca doméstica (ZCS) <i>Musca domestica</i>	1,5%	10,0%	28,0%	54,0%	58,0%	64,0%	70,0%	76,0%	80,0%	80,0%	80,0%	80,0%		
	3%	14,9%	36,2%	59,6%	74,5%	80,9%	80,9%	80,9%	85,1%	89,4%	95,7%			
	6%	47,7%	68,2%	97,7%	97,7%	97,7%	97,7%	97,7%	97,7%	100,0%	100,0%			

Tabla 6

	Aturdimiento										Mortalidad		
	Tasa	5 min	15 min	30 min	45 min	1 h	2hr	4hr	24 h	48 h	72 h		
Escarabajos del estiércol - Larvas <i>Aphitobius diaperinus</i>	3%	33,3%	47,9%	50,0%	58,3%	68,8	75,0%	77,1%	85,4%	93,8%	85,4%		
	6%	45,1%	64,7%	72,5%	76,5%	76,5	82,4%	76,5%	86,3%	88,2%	86,3%		
	1,5%	40,0%	58,0%	62,0%	64,0%	74,0	78,0%	78,0%	72,0%	90,0%	86,0%		
	3%	70,0%	82,0%	92,0%	86,0%	88,0	92,0%	88,0%	94,0%	98,0%	100,0%		
	6%	84,3%	96,1%	98,0%	98,0%	100,0	100,0%	100,0	98,0%	100,0%	96,1%		
Escarabajos del estiércol - adultos <i>Aphitobius diaperinus</i>	1,5%	0,0%	12,0%	20,0%	22,0%	34,0	42,0%	50,0%	68,0%	70,0%	70,0%		
	3%	2,0%	2,0%	12,0%	14,0%	24,0	28,0%	28,0%	54,0%	54,0%	56,0%		
	6%	0,0%	8,0%	12,0%	22,0%	36,0	40,0%	40,0%	76,0%	80,0%	78,0%		
	1,5%	4,0%	6,0%	10,0%	12,0%	14,0	18,0%	22,0%	24,0%	30,0%	32,0%		
	3%	6,0%	24,0%	28,0%	32,0%	42,0	64,0%	72,0%	94,0%	94,0%	94,0%		
	6%	10,0%	22,0%	30,0%	38,0%	62,0 %	78,0%	86,0%	86,0%	94,0%	90,0%		

**Ejemplo 9: Efecto de MBI-203 en la capacidad de oviposición de psílidos de la patata, *Bactericera cockerelli***  
**Métodos**

Se determinó la capacidad de oviposición de hembras de psílido de la patata expuestas a hojas de pimiento tratadas con MBI-203. Las hojas de pimiento se cortaron a la altura del peciolo y se trataron con MBI-203 mediante empapado durante 1 minuto. Los tratamientos en el experimento fueron del siguiente modo: MBI-203 al 10% v/v en dH<sub>2</sub>O, dH<sub>2</sub>O como control negativo y Avid al 10% v/v como control positivo. Las hojas tratadas se mantuvieron en placas de Petri de plástico con los bordes hacia arriba, alineadas con espuma a medida con el diámetro cortado para exponer la hoja tratada.

Se colocaron cuatro hembras de 1 día de edad en el centro de la placa donde estaba expuesta la hoja tratada (porción cortada de la espuma a medida), se cubrieron con la tapa de la placa de Petri y se fijó el montaje con 2 clips de carpeta. Se dejó que las hembras adultas depositasen huevos y se llevó a cabo el recuento de huevos de 3 a 10 días después de la exposición.

Se llevó a cabo un bioensayo en disco foliar en hojas tratadas y no tratadas con MBI-203 para verificar el efecto de MBI-203 en la capacidad de oviposición de las hembras de psílido de la patata. En el ensayo se usó tratamiento con MBI-203 al 3% v/v en agua y un control no tratado, solo dH<sub>2</sub>O (control negativo). Se cortaron discos foliares de pimiento (de plantas de pimiento de 3-4 semanas de edad) en círculos usando un cortador de galletas de 23 mm, seleccionando una porción plana de la hoja para asegurarse de que el disco se podía colocar plano sobre la placa de agar tras el tratamiento con el compuesto. El fondo de las placas se cubrió con 30 µl de solución de agar al 1%, lo justo para cubrir el fondo de la placa para elevar los discos foliares y mantener la humedad. Se dejó que el agar se solidificase por enfriamiento a temperatura ambiente. El tratamiento del disco foliar se llevó a cabo vertiendo la solución de tratamiento en una placa de Petri. Con la solución en la placa, los discos foliares se trataron por empapado, removiendo la placa cuidadosamente para empapar completamente y recubrir los discos foliares. El tratamiento se llevó a cabo durante 1 minuto y después se dejaron secar los discos foliares tratados durante 10-15 minutos en una campana de bioseguridad o hasta que la solución se había secado completamente. En cada placa de agar solidificado, se pipetearon 20-30 µl de dH<sub>2</sub>O sobre el agar. Cada disco foliar tratado se colocó individualmente sobre la placa de agar, colocando el disco foliar abaxial boca abajo en agar humedecido, prensando cuidadosamente para aplanar completamente el disco en el agar. En cada placa con disco foliar tratado (tratamiento), se introdujeron 4 hembras de psílido. Después, se cubrieron las placas de Petri con hembras encinta con la tapa de la placa de Petri, agujereada con diminutos agujeros para airearla y evitar la condensación. Las placas se sellaron con parafilm y se mantuvieron a temperatura ambiente. Se contó a diario el número de huevos depositados, comenzando un día después de introducir las hembras. El experimento se efectuó el 3 replicados, y se repitió dos veces.

**Resultados**

Se observó una reducción significativa de los huevos procedentes de hembras expuestas a tratamiento con MBI-203. Fue evidente un ligero retraso en la oviposición de huevos en las hembras sobre los discos foliares tratados con MBI-203. Las hembras de psílido expuestas a discos foliares tratados con MBI-203 comenzaron a ovipositar huevos 3 días después de la exposición (figura 4). Los huevos depositados alcanzaron un máximo en el día 7 y se redujeron en el día 10. En el día 10, el recuento medio de huevos se redujo ya que los huevos depositados por las hembras comenzaron a eclosionar. Las hembras expuestas al tratamiento de control positivo (Avid al 10% v/v) estaban todas muertas en el día 3, sin deposición de huevos en los discos foliares tratados con Avid.

Los bioensayos de verificación en discos foliares confirmaron un resultado consistente con una reducción significativa de los huevos ovipositados por hembras en discos foliares tratados con MBI-203 al 3% v/v (figura 5). Se mostró una reducción del 65% en los huevos por hembras expuestas a discos foliares tratados con MBI-203 en comparación con hembras expuestas a discos foliares no tratados (solo dH<sub>2</sub>O). Los resultados de estos bioensayos indican que MBI-203 afecta a la fisiología de las hembras de psílido, afectando a su capacidad de oviposición.

**Ejemplo 10: Efecto de MBI-203 en lavas y escarabajos**

**Control de larvas blancas en césped**

Se evaluaron insecticidas para el control de larvas blancas (escarabajo enmascarado del sur, *Cyclocephala lurida* Bland) en hierba verde de Kentucky (*Poa pratensis* L.) y raigrás perenne áspero (*Lolium perenne* L.) en el campo de golf North Bend en North Bend, Nebraska. Los insecticidas se aplicaron a parcelas de 1,8 x 1,8 m (5 x 5 ft) dispuestas con un diseño de bloque completo aleatorizado (RCB) con 5 replicados. Los productos líquidos se aplicaron un pulverizador de CO<sub>2</sub> a 275 kPa (40 psi) y se aplicaron 1627,59 l/ha (174 gal/acre) de pulverización terminada. A las 24 horas después de la aplicación, se irrigaron todos los tratamientos con 0,63 cm (0,25 pulgadas) de agua. Las formulaciones se evaluaron 24 días y 48 días después del tratamiento (DAT) retirando de cada parcela tres secciones de césped de 20 cm (8 pulgadas) de diámetro (área total de 0,09 m<sup>2</sup> (1,05 ft<sup>2</sup>)) hasta una profundidad de 7,6 cm (3 pulgadas) y se contó el número de larvas supervivientes y moribundas. Se evaluó la fitotoxicidad de manera periódica en las parcelas. Los resultados se muestran en las tablas 7 y 8.

Parece haber una correlación entre la tasa de aplicación y el porcentaje de control para los tratamientos con MBI-203 DF1. Todos los tratamientos, a excepción de MBI-203 DF1 (59 ml/9 m<sup>2</sup> (2 fl oz/100 ft<sup>2</sup>)), superaron en su rendimiento a trichlorfon al 6% (comercializado como DYLOX® 420 SL (204 ml/92 m<sup>2</sup> (6,9 fl.oz/1000 ft<sup>2</sup>) de Bayer CropScience, Inc., un insecticida estándar en la técnica para el control de las larvas blancas. Curiosamente, se encontraron individuos moribundos en todos los tratamientos de MBI-203 AF1 y MBI-203 DF1. Estos números (entre paréntesis) no se usaron en el análisis estadístico, pero se incluyeron con fines comparativos. No se observó fitotoxicidad. AF1 es una formulación acuosa fluida y DF1 es un polvo humectable de *Chromobacterium substugae*.

**Tabla 7: Eficacia de MBI-203 para controlar larvas blancas 24 días después del tratamiento (24 DAT)**

Tratamiento/formulación n	Tasa de fl oz/1000 ft <sup>2</sup>	N.º de WG/0,09 m <sup>2</sup> (1,05 ft <sup>2</sup> )					Media de WG ± DT 0,09 m <sup>2</sup> (1,05 ft <sup>2</sup> )	% de control
		Rep 1	Rep 2	Rep 3	Rep 4	Rep 5		
MBI-203 AF1	16	5 (2)	4 (2)	1	2	0	2,4 ± 0,9	76,0
MBI-203 DF1	8	8 (1)	4 (1)	2	3	2	3,8 ± 1,1	62,0
MBI-203 AF1	8	3 (3)	9 (3)	7 (1)	5 (3)	0	4,8 ± 1,6	52,0
MBI-203 AF1	32	9 (3)	5	7	4	0	5,0 ± 1,5	50,0
MBI-203 DF1	4	5	6 (1)	10	2 (1)	2 (2)	5,0 ± 3,2	50,0
Dylox 420 SL	6,9	0	6	9	9	4	5,6 ± 1,7	44,0
MBI-203 DF1	2	2 (1)	8 (2)	8	9	6	6,6 ± 1,2	34,0
UTC	---	9	8	15	8	10	10,0 ± 1,3	---

**Tabla 8: Eficacia de MBI-203 para controlar larvas blancas 24 días después del tratamiento (43 DAT)**

Tratamiento/formulación	Tasa de fl oz/1000 ft <sup>2</sup>	N.º de WG/0,09 m <sup>2</sup> (1,05 ft <sup>2</sup> )				Media de WG 0,09 m <sup>2</sup> (1,05 ft <sup>2</sup> )	% de control
		Rep 1	Rep 2	Rep 3	Rep 4		
MBI-203 DF2	4,0	2	0	0	0	0,5 a	95,0
Dylox 6,2 G	1360 g (3 lb)	3	3	0	0	1,5 a	85,0
MBI-203 DF2	2,0	0	0	6	4	2,5 a	75,0
MBI-203 DF2	8,0	10	2	6	1	4,75 a	52,5
UTC	---	15	8	10	7	10,0 b	---

Las medias seguidas por la misma letra no son significativamente diferentes (P>0,05, LSD=4,4).

#### 15 **Estudio de alimentación del efecto de MBI-203 en otros escarabajos que se alimentan de raíces**

Se infestó suelo Groton, pH 4,25, 14% de materia orgánica con el escarabajo, larvas de escarabajo oriental (*Anomala orientalis*) y se puntuó el número de larvas que murieron. Se dosificó en el suelo una formulación fluida acuosa de MBI-203 y se calculó el porcentaje de mortalidad:

**Tabla 9: Efecto de MBI-203 en larvas de escarabajo oriental**

	Ensayo 1	Ensayo 2
	% de mortalidad 7 DAT (días después del tratamiento)	
1,5 ml de producto/5 g de suelo (mezcla de suelo al 30%)	100	100
1 ml de producto/5 g de suelo (mezcla de suelo al 20%)	100	100
0,5 ml de producto + 0,5 ml de agua desionizada/5 g de suelo	87	100
0,25 ml de producto + 0,75 ml de agua desionizada/5 g de suelo	93	100
0,1 ml de producto + 0,9 ml de agua desionizada/5 g de suelo	40	13
0,05 ml de producto + 0,95 ml de agua desionizada/5 g de suelo	27	27

	Ensayo 1	Ensayo 2
	% de mortalidad 7 DAT (días después del tratamiento)	
Control sin tratar (30% de humedad)	0	7
Control sin tratar (20% de humedad)	0	0

Se preparó un ensayo similar con el larvas de escarabajo, *Rhizotrogus majalis*, (escarabajo europeo) usando 1,5 ml y 1 ml en 5 g de suelo. Se eliminaron 100/100 larvas a los 7 DAT y no se eliminó a ninguna en el control.

- 5 También se llevaron a cabo ensayos con larvas del gorgojo de la vid negra *Otiorhynchus sulcatus* (*Curculionidae*) con medio para semilleros (sin fuente de alimentación), zanahorias y raíces de *Taxus*. Los resultados se muestran en las tablas 10, 11, 12 y 13.

**Tabla 10: Efecto de MBI-203 con suelo para semilleros**

	% de mortalidad 7 DAT	% de mortalidad 14 DAT
0,9 ml de producto/3 g de medio (humedad del suelo del 30%)	0	0
0,6 ml de producto/3 g de medio (humedad del suelo del 20%)	0	0
Control (30% de humedad)	0	0
Control (20% de humedad)	0	0

10

**Tabla 11: Efecto de MBI-203 con zanahorias empapadas en producto**

	% de mortalidad 3 DAT
Rodaja de zanahoria empapada en producto	100
Rodaja de zanahoria empapada en agua desionizada (control)	0

**Tabla 12: Efecto de MBI-203 con raíces de *Taxus***

	% de mortalidad 3 DAT
Raíces de <i>Taxus</i> empapadas en producto y secas	90
Raíces de <i>Taxus</i> empapadas en agua desionizada y secas	0

15

**Tabla 13: Efecto de MBI-203 con rodajas de zanahoria (secas)**

	% de mortalidad 3 DAT
Rodaja de zanahoria empapada en producto y seca	60
Rodaja de zanahoria empapada en agua desionizada y seca (control)	0

Parece ser que MBI-203 es muy activo contra escarabajos y gorgojos que se alimentan de raíces, en particular, cuando se alimentan de una fuente de alimento tratada.

**20 Ejemplo 11: Efecto de MBI-203 contra el gusano de la raíz del repollo**

Se llevó a cabo este estudio para determinar la eficacia de formulaciones de MBI-203 para el control de gusanos del repollo (*Delia radicum*) en plantas de brécol en un estudio en invernadero cerrado. Tratamientos experimentales de MBI-203 DF-1 (una formulación de polvo humectable de MBI-203) a tasas de 0,06 l/93 m<sup>2</sup> (2 oz/1000 ft<sup>2</sup>) y 0,23 l/93 m<sup>2</sup> (8 oz/1000 ft<sup>2</sup>); MBI-203 DF-2 (una segunda formulación de polvo humectable de MBI-203) a tasas de 0,06 l/93 m<sup>2</sup> (2 oz/1000 ft<sup>2</sup>) y 0,23 l/93 m<sup>2</sup> (8 oz/1000 ft<sup>2</sup>). Los tratamientos experimentales se compararon con el estándar comercial, RADIANT® (comercializado por DowAgro Sciences y que contiene spineforam como principio activo) a una tasa de 0,11 g/ml (1 lb/gal).

30 Se registró el número de insectos adultos vivos semanalmente hasta 14 días tras la tercera aplicación (14DA-C) y se registró el número de larvas vivas semanalmente hasta 21 DA-C. Los resultados mostraron que MBI 203 DF-1 tenía una emergencia significativamente menor del número de adultos en la última fecha de evaluación y fue comparable

con RADIANT®. MBI-203 DF-1 tenía una emergencia significativamente menor del número de adultos que el UTC en la última fecha de evaluación y fue comparable con el control de RADIANT®.

5 **Tabla 14. Recuento de gusanos. Número medio de larvas de insecto de *Delia radicum* por tratamiento, listado por fecha de evaluación.**

N.º de trat.	Nombre del tratamiento	Tasa	Unidad de tasa	Cod. de aplicación	7 DA-C	14 DA-C	21 DA-C
1	Sin tratar			ABC	5,75 a	6,25 a	6,50 a
2	MBI 203 DF - 1	2	oz/1000 ft <sup>2</sup>	ABC	5,00 ab	5,00 ab	4,25 b
3	MBI 203 DF - 1	8	oz/1000 ft <sup>2</sup>	ABC	4,75 ab	3,00 c	3,50 bc
4	MBI 203 DF -2	2	oz/1000 ft <sup>2</sup>	ABC	6,50 a	5,50 ab	4,25 b
5	MBI 203 DF -2	8	oz/1000 ft <sup>2</sup>	ABC	5,25 ab	3,00 c	1,50 cd
8	Radiante	10	fl oz/a	AC	1,50 c	1,00 d	1,00 d

**Tabla 15. Porcentaje de control. Porcentaje medio de control de larvas de insecto de *Delia radicum* por tratamiento, listado por fecha de evaluación.**

N.º de trat.	Nombre del tratamiento	Tasa	Unidad de tasa	Cod. de aplicación	7 DA-C	14 DA-C	21 DA-C
1	Sin tratar			ABC	0,00 c	0,00 d	0,00 d
2	MBI 203 DF - 1	2	oz/1000 ft <sup>2</sup>	ABC	13,04 bc	20,00 cd	34,62 c
3	MBI 203 DF - 1	8	oz/1000 ft <sup>2</sup>	ABC	17,39 bc	52,00 b	46,15 bc
4	MBI 203 DF -2	2	oz/1000 ft <sup>2</sup>	ABC	0,00 c	12,00 cd	34,62 c
5	MBI 203 DF -2	8	oz/1000 ft <sup>2</sup>	ABC	8,70 bc	52,00 b	76,92 ab
8	Radiante	10	fl oz/a	AC	73,91 a	84,00 a	84,62 a

10 **También se divulga una prueba que describe el ejemplo 12: Eficacia de MBI-203 DF1 y MBI-203 DF2 para el control de *Drosophila suzukii* (mosca de alas manchadas (SWD)) en fresa en invernadero**

Se llevó a cabo este estudio para determinar la eficacia de MBI-203 DF1 y MBI-203 DF2 para el control de la mosca de alas manchadas (SWD) en cultivos de fresa en invernadero. Se aplicaron tratamientos experimentales de MBI-203 DF1 y MBI-203 DF2 a tasas de 1,12 kg/ha y 4,48 kg/ha (1 lb/a y 4 lb/a) a parcelas replicadas. Los tratamientos se compararon con el estándar comercial, Entrust® a una tasa de (0,07 l/ha) (1,5 oz/a). Todos los tratamientos se combinaron con el tensioactivo SILWET® L77 (Chemtura AgroSolutions, Inc.) a una proporción del 0,05% v/v. Se encapsuló cada parcela replicada que contenía una planta de fresa para impedir la migración de las poblaciones de insectos.

20 Se liberó la tercera generación de adultos alados de SWD criados en el laboratorio en cada trasplante de fresa encapsulado. Se registraron los recuentos de adultos de SWD antes de la aplicación (recuento previo), 4 días después de la aplicación (DAA), 7 DAA y 11 DAA. Se registró el número de larvas de SWD por baya a los 14 DAA, 21 DAA, 28 DAA y 35 DAA. Las estadísticas se analizaron usando comparación de las medias por ANOVA con prueba de LSD y  $\alpha=0,05$ .

30 Después de la primera aplicación, los tratamientos con MBI-203 mostraron una reducción progresiva de adultos de moscas de alas manchadas y se observó una tasa de respuesta para los productos tanto DF1 como DF2. Aunque no fue comparable de manera significativamente con ENTRUST®, (Dow AgroBioSciences) que contiene spinosad como principio activo, MBI-203 DF2 a 4,48 kg/ha (4 lb/a) redujo significativamente las poblaciones de adultos en un 25% en comparación con UTC a los 7 días después de la primera aplicación (DAA). A los 11 DAA, tanto DF1 como DF2 a 4,48 kg/ha (4 lb/a) redujeron los recuentos de adultos en un 44%, aunque no era estadísticamente diferente respecto del UTC. Ambos productos de MBI-203 mostraron resultados significativos para la reducción de los recuentos de larvas de SWD. En todas las evaluaciones, DF2 a 4,48 kg/ha (4 lb/a) redujo significativamente el número de larvas por baya en un 71%, comparable con ENTRUST®, (Dow AgroBioSciences) que contiene spinosad como principio activo, al 78%; además, a los 21 DAA, se controló el número de larvas con todos los tratamientos de MBI-203 hasta el 72% y todos fueron comparables con ENTRUST®, (Dow AgroBioSciences). Se observó una tasa de respuesta tanto para MBI-203 DF1 como DF2 respecto de los recuentos de larvas.

40

**Resultados:****Tabla 16. Número de moscas por parcela cubierta. Recuento medio de adultos alados de *Drosophila suzukii* después de su liberación en plantas y aplicaciones por tratamiento, listado por fecha de evaluación.**

N.º de trat.	Nombre del tratamiento	Tasa	Unidad de tasa	Cod. de aplicación	Recuento previo	4 DAA	7 DAA	11 DAA
1	Sin tratar			ABC	25,00 a	23,25 a	16,00 ab	4,00 a
2	MBI-203 DF 1	1	lb/a	ABC	25,00 a	21,25 a	14,75 ab	2,75 a
	Silwet L77	0,05	% v/v	ABC				
3	MBI-203 DF 1	4	lb/a	ABC	25,00 a	19,75 a	13,50 ab	2,25 a
	Silwet L77	0,05	% v/v	ABC				
4	MBI-203 DF 2	1	lb/a	ABC	25,00 a	21,00 a	18,00 a	3,00 a
	Silwet L77	0,05	% v/v	ABC				
5	MBI-203 DF 2	4	lb/a	ABC	25,00 a	19,75 a	12,00 b	2,25 a
	Silwet L77	0,05	% v/v	ABC				
6	Entrust	1,5	oz/a	ABC	25,00 a	8,25 b	0,00 c	0,00 b
	Silwet L77	0,05	% v/v	ABC				

5

**Tabla 17. Porcentaje de control. Porcentaje de control medio de larvas de *Drosophila suzukii* por parcela replicada, listado por fecha de evaluación.**

N.º de trat.	Nombre del tratamiento	Tasa	Unidad de tasa	Cod. de aplicación	14 DAA	21 DAA	28 DAA	35 DAA
1	Sin tratar			ABC	0,00 d	0,00 b	0,00 b	0,00 c
2	MBI-203 DF 1	1	lb/a	ABC	41,52 c	54,22 a	42,83 ab	44,44 b
	Silwet L77	0,05	% v/v	ABC				
3	MBI-203 DF 1	4	lb/a	ABC	54,78 bc	67,85 a	88,11 a	100,00 a
	Silwet L77	0,05	% v/v	ABC				
4	MBI-203 DF 2	1	lb/a	ABC	52,97 bc	60,58 a	64,33 a	88,89 a
	Silwet L77	0,05	% v/v	ABC				
5	MBI-203 DF 2	4	lb/a	ABC	71,36 ab	72,16 a	88,11 a	100,00 a
	Silwet L77	0,05	% v/v	ABC				
6	Entrust	1,5	oz/a	ABC	78,12 a	69,19 a	100,00 a	100,00 a
	Silwet L77	0,05	% v/v	ABC				

Los hallazgos pueden resumirse del siguiente modo:

10

- Se observó una tasa de respuesta para MBI-203, DF1 y DF2 para la reducción de recuentos de adultos y larvas de SWD
- MBI-203 DF2 a 4,48 kg/ha (4 lb/a) redujo de manera significativa las poblaciones de adultos en un 25% a los 7 DAA
- Durante todo el ensayo, DF2 a 4,48 kg/ha (4 lb/a) redujo significativamente el número de larvas por baya y fue comparable con Entrust

15

20

Aunque la aplicación de ambos productos no mostró demasiado efecto en la población adulta, redujo significativamente la población larvaria en la siguiente generación.

**También se divulga un ensayo que describe (anterior ejemplo 13): Efecto repelente de MBI-203 contra pulgones**

5 Se llevó a cabo una evaluación del efecto repelente de diversas concentraciones de MBI-203 para el pulgón verde del melocotonero. Específicamente, se evaluaron tres concentraciones de tratamiento de MBI-203 en agua (1% v/v, 3% v/v y 10% v/v). La concentración de MBI-203 al 10% v/v se usó como control positivo y el tratamiento solo con dH<sub>2</sub>O como control negativo. Cada solución de tratamiento se añadió con TWEEN 20 al 0,01%.

10 Se llevaron a cabo bioensayos tratando discos foliares de pimiento con las concentraciones de MBI-203 respectivas mencionadas anteriormente. Se cortaron discos foliares de pimiento (de plantas de pimiento de 3-4 semanas de edad) en círculos usando un cortador de galletas de 23mm, seleccionando una porción plana de la hoja para asegurarse de que el disco foliar se podía colocar plano dentro de la placa de agar tras el tratamiento con el compuesto. Se fundió una solución de agar al 1% calentándola y se vertió en la placa de Petri de 145 mm X 20 mm, suficiente para cubrir la superficie del fondo de la placa para elevar los discos foliares y mantener la humedad. Se dejó que el agar se solidificase por enfriamiento a temperatura ambiente.

15 El tratamiento del disco foliar se llevó a cabo vertiendo la solución de tratamiento en una placa de Petri. Con la solución en la placa, los discos foliares se trataron por empapado, removiendo la placa cuidadosamente para empapar completamente y recubrir los discos foliares. El tratamiento de los discos foliares por empapado se llevó a cabo durante 1 minuto. Después, se dejaron secar los discos foliares sacándolos de la solución usando unas pinzas y colocándolos en la campana de bioseguridad durante 10-15 minutos o hasta que la solución se había secado por completo en la superficie de las hojas. Una vez se secaron los discos foliares, se pipetearon 40 µl de agua sobre el agar donde se iba a colocar el disco foliar. Después, se dispusieron los discos foliares a la misma distancia unos de otros, sobre la superficie humedecida del agar, colocando cada disco abaxial boca abajo. Se presionó levemente cada disco para aplanarlo completamente en el agar y se introdujeron 20 adultos de GPA de 3-4 días de edad en el centro de la placa usando un pincel fino. Después, se cubrieron las placas y se sellaron con parafilm. La tapa de la placa de Petri se agujereó con diminutos agujeros para airearla y evitar la condensación.

20 La prueba se llevó a cabo en tres replicados. Se determinaron los datos de capacidad repelente para adultos y ninfas 24 horas después de la exposición de los adultos en las placas a discos foliares tratados. Se contó el número de pulgones (adultos y ninfas) presentes en cada hoja y se registraron y analizaron los datos.

**Resultados**

25 MBI-203 es repelente para adultos y ninfas de GPA, con una capacidad repelente del 97 - 99% a diferentes concentraciones de MBI-203 (tabla 18). La figura 6 muestra una diferencia estadística entre las concentraciones de tratamiento. MBI-203 a concentraciones del 3% y el 1% v/v tenía un % de capacidad repelente media calculada del 97% y 99%, respectivamente.

40 **Tabla 18. Porcentaje (%) medio de capacidad repelente de adultos y ninfas de pulgón verde del melocotonero (GPA) en discos foliares de pimiento tratados con diferentes concentraciones de MBI-203.**

Tratamiento	% medio de capacidad repelente
MBI-203 std 3% v/v	97
MBI-203 std 1% v/v	99
MBI-203 std 10% v/v	97

**También se divulga un ensayo que describe (anterior ejemplo 14): La aplicación de MBI-203 reduce la descendencia de los pulgones**

45 Se probó MBI-203 a una concentración del 3% v/v para determinar el efecto del compuesto en la producción de descendencia de adultos de pulgón verde del melocotonero (GPA). Se llevaron a cabo bioensayos tratando discos foliares de pimiento con MBI-203 al 3% v/v. Se cortaron discos foliares de pimiento (de plantas de pimiento de 3-4 semanas de edad) en círculos usando un cortador de galletas de 23 mm, seleccionando una porción plana de la hoja para asegurarse de que el disco se podía colocar plano sobre la placa de agar. Se fundió una solución de agar al 1% calentándola y se vertieron 30 µl en cada placa de Petri (placas de Petri de poliestireno ventiladas de 16mm X 35mm), lo justo para cubrir el fondo de la placa para elevar los discos foliares y mantener la humedad. Se dejó que el agar se solidificase por enfriamiento a temperatura ambiente. El tratamiento del disco foliar se llevó a cabo vertiendo la solución de tratamiento en una placa de Petri. Con la solución en la placa, los discos foliares se trataron por empapado, removiendo la placa cuidadosamente para empapar completamente y recubrir los discos foliares. El tratamiento de los discos foliares por empapado se llevó a cabo durante 1 minuto. Se dejaron secar los discos foliares tratados durante 10-15 minutos en una campana de bioseguridad o hasta que la solución se había secado por completo en la superficie de la hoja. Cada disco foliar tratado se colocó individualmente sobre la placa de agar, colocando el disco foliar abaxial boca abajo en agar humedecido, prensando cuidadosamente para aplanar

completamente el disco en el agar. En cada placa con disco foliar tratado (tratamiento), Se introdujeron 6 adultos de GPA (3 - 4 días de edad). Después se cubrieron las placas con pulgones adultos con parafilm. Las coberturas de parafilm se perforaron con diminutos agujeros para airear y evitar la condensación. Las placas se incubaron a temperatura ambiente. La descendencia (estadio de ninfa temprana) se contó 3 días después de exponer a los adultos a discos foliares tratados. El experimento se llevó a cabo en 3 replicados y el experimento completo se repitió 5 veces.

La figura 7 muestra la producción de descendencia significativamente afectada por MBI-203 de adultos de GPA 3 días después de la exposición a discos foliares tratados. La gráfica en la figura cinco es el resultado de los cinco ensayos llevados a cabo y se observó que la reducción de la descendencia de adultos de GPA era mayor del 50% en comparación con el control negativo (tratamiento solo con agua) y su rendimiento es comparable al del control positivo (Avid al 10%), mostrando estadísticamente la misma producción de descendencia. Cuando se evaluó el número de producción de descendencia en comparación con el producto formulado DF2, no hubo una diferencia estadística entre el patrón de MBI-203 y DF2 a una concentración del 3% v/v (figura 8). En los tratamientos con MBI-203 y DF2 se mostró una reducción de más del 90% de la descendencia (ninfas) en comparación con el control negativo, que demostró ser significativamente mejor que Avid a una concentración del 10% v/v (control positivo).

#### **También se divulga una prueba que describe el ejemplo 15: Extracción de violaceína y Oligo-(ácido $\beta$ -hidroxibutírico) de *Chromobacterium substugae*.**

El siguiente procedimiento se usó para la purificación de compuestos extraídos del cultivo de *Chromobacterium substugae*:

Se extrajo el caldo de cultivo completo (WBC) procedente de una fermentación de 20 l de *C. substugae* en caldo L mediante un método de extracción líquido-líquido usando acetato de etilo. La capa de acetato de etilo se separó y se secó al vacío usando un evaporador rotatorio para proporcionar el extracto en bruto. Después, se fraccionó el extracto en bruto usando diferentes disolventes, tales como diclorometano (DCM), acetato de etilo (EA), metanol (MeOH) y lavando con una mezcla de disolventes (LAVADO). Después, se concentraron a sequedad estas fracciones usando evaporación rotatoria y se evaluó la actividad biológica de los residuos secos usando diferentes plagas (insectos, nematodos). Después, se sometieron las fracciones activas a cromatografía de exclusión por tamaños Sephadex LH 20 ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ ; 50/50) para dar 10 fracciones (figura 9). Después, se concentraron a sequedad estas fracciones usando evaporación rotatoria y se evaluó la actividad biológica de los residuos secos (fracciones) usando un ensayo de capacidad repelente de insectos con pulgón verde del melocotonero, de producción de descendencia de pulgón verde del melocotonero (GPA) y un bioensayo nematocida (*M. incognita* y/o *M. hapla*). Después, se sometió a las fracciones activas a HPLC en fase reversa (Spectra System P4000 (Thermo Scientific)) para proporcionar compuestos puros, que después se evaluaron en los bioensayos anteriormente mencionados para localizar/identificar los compuestos activos. Para confirmar la identidad del compuesto, se registraron datos espectroscópicos adicionales, tales como CL/EM y RMN.

El potente compuesto repelente insecticida se aisló de las fracciones F8, F9 y F10 y se identificó como violaceína (2). El compuesto con actividad nematocida de la fracción principal de DCM se identificó como oligo-(ácido  $\beta$ -hidroxibutírico) (4).

#### **Análisis de los compuestos por espectroscopía de masas**

El análisis por espectrometría de masas de los picos activos se realizó en un instrumento de electronebulización (ESI) Thermo Finnigan LCQ Deca XP Plus usando los modos de ionización tanto positiva como negativa en un modo de escaneo completo (m/z 100-1500 Da) en un espectrómetro de masas LCQ DECA XP<sup>plus</sup> (Thermo Electron Corp., San José, CA). Instrumento de cromatografía líquida de alto rendimiento de Thermo (HPLC) equipado con detector Finnigan Surveyor PDA plus, autosampler plus, bomba MS y una columna 4,6 mm x 100 mm Luna C18 5  $\mu$  100 A (Phenomenex). El sistema disolvente consistía en agua (disolvente A) y acetonitrilo (disolvente B). La fase móvil comienza al 10 % de disolvente B y se incrementa de forma lineal hasta el 100% de disolvente B durante 20 min y después se mantiene durante 4 min y finalmente se vuelve al 10% de disolvente B durante 3 min y se mantiene durante 3 min. El caudal es de 0,5 ml/min. El volumen de inyección fue de 10  $\mu$ l y las muestras se mantienen a temperatura ambiente en un automuestreador. Los compuestos se analizaron mediante CL-EM utilizando la LC y cromatografía de fase inversa. El análisis por espectroscopía de masas de los presentes compuestos se realiza en las siguientes condiciones: El caudal del gas nitrógeno se fijó a 30 y 15 arb para el caudal del gas de impulsión y del aux/de barrido, respectivamente. La ionización por electronebulización se realizó con un voltaje de pulverización ajustado a 5000 V y un voltaje capilar a 35,0 V. La temperatura capilar se ajustó a 400 °C. Los datos se analizaron con un programa informático Xcalibur. El análisis del oligo-(ácido  $\beta$ -hidroxibutírico) (1) se llevó a cabo un espectrómetro de masas de transformada de Fourier híbrido LTQ Orbitrap XL en las instalaciones para espectrometría de masas de UC Davis.

#### **Análisis de los compuestos por espectroscopía de RMN**

Los espectros RMN-RMN se midieron en un espectrómetro de gradiente de campo Bruker 600 MHz. La referencia se ajusta al patrón interno tetrametilsilano (TMS, 0,00 ppm).

**Purificación de compuestos**

La fracción de diclorometano (DCM) se trituró con metanol y el sólido de color blanco obtenido se retiró por filtración para dar oligo-(ácido  $\beta$ -hidroxibutírico) (1).

5

**Identificación de los compuestos***Oligo-(ácido  $\beta$ -hidroxibutírico) (1)*

El espectro de RMN  $^1\text{H}$  del compuesto **4** mostró señales a  $\delta$  5,22 (sext), 2,62 (dd) y 2,53 (dd) con una intensidad relativa de 1 protón cada una. Además de estos, también se observó una señal de metilo a  $\delta$  1,31 en forma de duplete. El espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  mostró tan solo cuatro señales de carbono a  $\delta$  169,2, 67,6, 40,9 y 19,8. El análisis detallado de RMN 1D y 2D dio como resultado la estructura parcial de  $(-\text{O}-\text{CHCH}_3-\text{CH}_2-\text{CO}-)$  con una masa de fragmento de 86. La EM MALDI-TOF-IEN (FIG. 2) de este compuesto mostró un patrón de señal típico para una mezcla de oligómeros con masas moleculares de  $[(n \times 86) + \text{Na}]$ , lo que corresponde a que el producto era una mezcla de oligo-(ácido  $\beta$ -hidroxibutírico) **1** con  $n = 10-25$ . Se ha comunicado que este compuesto puede aislarse de diversas bacterias (Singh et al., 2011; Maskey et al., 2002; Hahn et al., 1995). Se confirmó la potencia de este compuesto obtenido de la fracción de DCM en un ensayo *in vitro* usando *M. hapla* que mostró una inmovilidad del 75% (figura 10).

20

**Prueba *in vitro* de fracciones y compuesto puro de *Chromobacterium substugae*.**

Se disolvieron las fracciones y los compuestos puros en dimetilsulfóxido (DMSO) y se evaluaron en un bioensayo *in vitro* en placas de cultivo celular de plástico de 96 pocillos. Se expuso a aproximadamente 15-20 nematodos en una solución de agua de 50  $\mu\text{l}$  a 100  $\mu\text{l}$  de una muestra a 4mg/ml durante un periodo de 24 horas a 25°C. Una vez se había completado el periodo de incubación, se registraron los resultados basándose en la evaluación visual de la inmovilidad de los nematodos jóvenes (J2) en cada pocillo tratado con las muestras; cada tratamiento se probó en cuatro repeticiones de pocillos. Los resultados se muestran en la figura 5, que muestra los resultados de dos bioensayos diferentes en placas de 96 pocillos de fracciones de *C. substugae* y compuesto **4**. En cada ensayo se incluyeron tres controles; 1 positivo (Avid al 1%) y 2 negativos (DMSO y agua). Ambos ensayos (T1) y (T2) se llevaron a cabo usando nematodos de *M. hapla*.

30

**Aislamiento e identificación de compuestos responsables de la capacidad repelente**

Se evaluó la actividad repelente de las fracciones principales, tales como DMC, EA, MeOH y LAVADO usando el bioensayo con pulgón verde del melocotonero (GPA) como se describe en detalle a continuación. La actividad repelente más potente se observó para las fracciones de EA y MeOH. El análisis por CLEM de estas fracciones mostró un perfil químico similar, por lo que dado que el rendimiento de la fracción de MeOH era mayor que el de la fracción de EA, el trabajo químico detallado se llevó a cabo usando la fracción de MeOH. La fracción de MeOH se fraccionó adicionalmente usando cromatografía de exclusión por tamaños Sephadex LH 20 ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ ; 50/50) para dar 10 fracciones (figura 9). La actividad más potente se observó en las fracciones F9 y F10. La purificación guiada por bioensayo de estas fracciones mediante una combinación de HPLC y Sephadex LH 20 proporcionó violaceína como el compuesto responsable de la actividad repelente. También se evaluó la violaceína en una prueba de descendencia de pulgones.

45

**También se divulga una prueba que describe el ejemplo 16: Efecto repelente de las fracciones de MBI-203 en el pulgón verde del melocotonero****Métodos**

50

Los bioensayos elegidos en adultos de pulgón verde del melocotonero (GPA) se llevaron a cabo usando fracciones de MBI-203 y compuesto puro. Se evaluó la eficacia contra insectos de las fracciones y el compuesto puro (violaceína) obtenidos de la extracción de la pasta celular de *C. substugae* (MBI-203) mediante bioensayos de repelencia. Se cortaron discos foliares de pimiento (de plantas de pimiento de 3-4 semanas de edad) en círculos usando un cortador de galletas de 23 mm, seleccionando una porción plana de la hoja para asegurarse de que el disco foliar se podía colocar plano dentro de la placa de agar tras el tratamiento con el compuesto. Se preparó agar al uno por ciento (%) en agua. Se fundió la solución de agar al 1% calentándola y se vertió en la placa de Petri de 145mm X 20mm, suficiente para cubrir la superficie del fondo de la placa para elevar los discos foliares y mantener la humedad. Se dejó que el agar se solidificase por enfriamiento a temperatura ambiente.

60

El tratamiento del disco foliar se llevó a cabo pipeteando cuidadosamente 100  $\mu\text{l}$  de extracto de MBI-203 en el dorso del disco foliar. Después, se dejó que los discos foliares tratados se secasen colocando el disco plano sobre un cobertor de placas de 12 pocillos marcado. Una vez se secaron los discos foliares, se pipetearon 40  $\mu\text{l}$  de agua sobre el agar donde se iba a colocar el disco foliar. Después, se dispusieron los discos foliares a la misma distancia unos de otros, sobre la superficie humedecida del agar, colocando cada disco abaxial boca abajo con la superficie tratada hacia arriba. Se apretó suavemente cada disco para aplanarlo completamente sobre el agar. Después de

65

colocar discos foliares tratados, se introdujeron 20 adultos de GPA de 3-4 días de edad en el centro de la placa usando un pincel fino. Después, se cubrieron las placas y se sellaron con parafilm. Las tapas de las placas de Petri se agujerearon con diminutos agujeros para airearlas y evitar la condensación.

5 Todas las pruebas se realizaron en tres replicados. La prueba inicial del extracto en bruto se llevó a cabo usando metanol y acetona como disolventes para seleccionar el mejor disolvente para la prueba. Esta prueba mostró que la acetona era mejor como disolvente. Las demás pruebas de las muestras que incluían fracciones y compuesto puro (violaceína) se llevaron a cabo usando acetona como disolvente. Se determinaron los datos de capacidad repelente de adultos y ninfas 24 horas después de la exposición de los adultos en discos foliares tratados. Se contó el número  
10 de pulgones (adultos y ninfas) y se registraron y analizaron los datos. El porcentaje de repelencia se calculó del siguiente modo:

$$\% \text{ de repelencia} = 100 - \left\{ \frac{[N+A] \text{ en hoja tratada}}{[N+A] \text{ en placa de Petri}} \times 100 \right\},$$

15 donde A representa a los adultos y N representa a las ninfas.

### Resultados

20 Las pruebas de repelencia para las fracciones de MBI-203 se iniciaron con los extractos en bruto. Se probaron los extractos en bruto en disolventes de metanol y acetona y el análisis de los resultados mostró diferencias significativas, tal como se muestra en la figura 11. Los discos foliares tratados con extracto en bruto de MBI-203 en disolventes tanto de metanol como de acetona dieron como resultado una diferencia estadísticamente significativa a la hora de determinar la respuesta de las ninfas y adultos de pulgón verde del melocotonero respecto del control negativo. Las figuras 11A y B muestran el efecto repelente de MBI-203 en los pulgones. Sin embargo, el disolvente  
25 de metanol mostró un efecto repelente en los pulgones (figura 11A) que no mostró una diferencia estadística respecto del extracto de MBI-203 y el control positivo (Avid al 10%). Se demostró que el disolvente de acetona era un buen disolvente para su uso en las fracciones, ya que no mostró actividad repelente en ninfas y adultos de GPA, ya que el número medio de ninfas y adultos que se asentaban en el disco foliar era estadísticamente igual al del control negativo (figura 11B).

30 Las fracciones de MBI-203 mostraron una fuerte actividad repelente de ninfas y adultos de GPA. Se observaron diferencias estadísticas entre las medias de tratamiento (figuras 12A y B). Los materiales fraccionados en EA y MeOH provocaron una repelencia del 100% en ninfas y adultos, mientras que el material de lavado mostró una repelencia del 94%, que no es estadísticamente diferente respecto del control positivo (MBI-203 al 10% v/v) (tabla  
35 19).

**Tabla 19. Porcentaje de repelencia medio de muestras fraccionadas de MBI-203.**

Material fraccionado	% medio de repelencia
DCM	77,2
EA	100
203 10% (+ C)	98,9
Lavado	94
MeOH	100
203 10% (+ C)	100

40 Además, se probaron las 10 fracciones obtenidas de la fracción de MeOH usando acetona como disolvente; las muestras con compuesto de violaceína puro (F9, F10) mostraron un elevado efecto repelente en adultos y ninfas de pulgón verde del melocotonero (tabla 20). Solo 2 fracciones no de violaceína mostraron un elevado efecto repelente (F2 y F3). Las fracciones F9 y F10 se purificaron adicionalmente, lo que proporcionó violaceína, que tenía una repelencia del 100%. Los datos revelaron que la violaceína es el compuesto responsable de provocar la repelencia en insectos succionadores. Parece ser que los materiales fraccionados F6 - F10 contenían violaceína, siendo F9 y  
45 F10 los que contenían el compuesto de violaceína puro.

**Tabla 20. Porcentaje medio de repelencia de las fracciones obtenidas del fraccionamiento de la fracción de MeOH (F1 - F10).**

Material fraccionado	% medio de repelencia
F1	81,5
F2	92,9
F3	95,6
F4	76,8
F5	84,3

Material fraccionado	% medio de repelencia
F6	90,1
F7	96
F8	91,5
F9	100
F10	100

**También se divulga un ensayo que describe (anterior ejemplo 17): La violaceína reduce la descendencia del pulgón**

5 Se usaron dos concentraciones de compuesto de violaceína puro en acetona, 0,5 µg/ml y 1,0 µg/ml, en la prueba para determinar el efecto de los compuestos sobre la descendencia de los adultos de pulgón verde del melocotonero (GPA). Se llevaron a cabo bioensayos tratando discos foliares de pimiento con las diferentes concentraciones de violaceína en acetona. Se cortaron discos foliares de pimiento (de plantas de pimiento de 3-4 semanas de edad) en discos con un diámetro de 23 mm, seleccionando una porción plana de la hoja para asegurarse de que el disco se podía colocar plano sobre la placa de agar tras el tratamiento con el compuesto. Se preparó una solución de agar al 10  
10 1%, se fundió calentándola y se vertieron 30 µl en placas de Petri (placas de Petri de poliestireno ventiladas de 16 mm X 35 mm), lo justo para cubrir el fondo de la placa para soportar los discos foliares y mantener la humedad. Se dejó que el agar se solidificase por enfriamiento a temperatura ambiente. El tratamiento con violaceína se llevó a cabo dispersando cuidadosamente 100 µl de la solución de muestra sobre el disco foliar usando una pipeta de 200  
15 µl. Los tratamientos se efectuaron por triplicado. Los discos foliares tratados se dejaron secar en la campana durante 5-10 minutos. El control positivo era Avid al 10% v/v y el control negativo era dH<sub>2</sub>O, se usó acetona como blanco. En cada placa de agar solidificado, se pipetearon 20-30 µl de dH<sub>2</sub>O sobre el agar para mantener la humedad. Cada disco foliar tratado se colocó individualmente sobre la placa de agar, colocando el disco foliar abaxial boca abajo en agar humedecido, prensando cuidadosamente para aplanar completamente el disco en el agar. En cada placa con  
20 disco foliar tratado (tratamiento), Se introdujeron 6 adultos de GPA (3 - 4 días de edad). Después se cubrieron las placas con pulgones adultos con parafilm. La cubierta de parafina se perforó con agujeros de ventilación para impedir la condensación y se mantuvo a temperatura ambiente. La descendencia (estadio de ninfa temprana) se contó 3 días después de exponer a los adultos a discos foliares tratados. El experimento se llevó a cabo en 3 replicados y el experimento completo se repitió 2 veces.

25 Tal como se muestra en la figura 13, la violaceína a 1,0 µg/ml redujo significativamente la producción de descendencia de los pulgones adultos. Se observó una reducción de aproximadamente el 50% en comparación con el control negativo (tratamiento solo con agua). El control positivo (Avid al 10%) produjo el menor número de descendencia, ya que la mayor parte de los adultos expuestos murió a los 3 días después de la exposición. Se llevaron a cabo dos ensayos en este experimento, replicando tres veces cada tratamiento. Ambos ensayos proporcionaron resultados consistentes, afectando la violaceína a la descendencia de manera significativa.

**También se divulga un ensayo que describe (anterior ejemplo 18): Otros productores de violaceína presentan repelencia contra los áfidos**

35 También se evaluó el efecto repelente de otras especies de *Chromobacterium* en el pulgón verde del melocotonero. Las especies de *Chromobacterium* evaluadas fueron las siguientes: *Chromobacterium piscinae* DSM 23278, *C. pseudoviolaecum* DSM 23279, *C. haemolyticum* DSM 19808 y *C. aquaticum* DSM 19852. Dos de las especies son especies productoras de violaceína (*C. piscinae* y *C. pseudoviol*) mientras que no se ha documentado que las otras  
40 dos especies produzcan violaceína. Los microorganismos se cultivaron en caldo LB a 26°C y 100 rpm durante 5 días. Al final de la fermentación, se recogieron los caldos y se separaron en alícuotas para el bioensayo. Se evaluaron concentraciones de tratamiento al 5% v/v en adultos de GPA. La concentración de MBI-203 al 10% v/v se usó como control positivo y el tratamiento solo con dH<sub>2</sub>O como control negativo. Cada solución de tratamiento se añadió con TWEEN 20 al 0,01%.

45 Los bioensayos se llevaron a cabo tratando discos foliares de pimiento como se ha descrito anteriormente. Se apretó suavemente cada disco tratado para aplanarlo completamente sobre el agar. Después de colocar discos foliares tratados, se introdujeron 20 adultos de GPA de 3-4 días de edad en el centro de la placa usando un pincel fino. Después, se cubrieron las placas y se sellaron con parafilm. Las tapas de las placas de Petri se agujerearon con  
50 diminutos agujeros para airearlas y evitar la condensación.

La prueba se efectuó en tres replicados. Se determinaron los datos de capacidad repelente para adultos y ninfas 24 horas después de la exposición de los adultos en las placas a discos foliares tratados. Se contó el número de pulgones (adultos y ninfas) asentados en cada disco foliar y se registraron y analizaron los datos. El porcentaje de repelencia se calculó del siguiente modo:

$$\% \text{ de repelencia} = 100 - \left\{ \frac{[N + A] \text{ en hoja tratada}}{[N + A] \text{ en placa de Petri}} \times 100 \right\}$$

Donde N= número de ninfas y A= número de pulgones adultos

Los resultados se muestran en las tablas 21 y 22 y en las figuras 14 y 15. Varias especies de *Chromobacterium* productoras de violaceína mostraron repelencia contra adultos y ninfas de GPA, con diferencias estadísticas entre las medias de tratamiento. Las especies de *Chromobacterium* productoras de violaceína tenían un % de repelencia media del 75% (*C. piscinae*), 86% (*C. pseudoviolaceum*), mientras que las no productoras de violaceína (*C. aquaticum* y *C. haemolyticum*) no fueron estadísticamente diferentes respecto del control sin tratar (agua). Se observó una ligera repelencia para las no productoras de violaceína.

**Tabla 21. Porcentaje (%) medio de capacidad repelente de adultos y ninfas de pulgón verde del melocotonero (GPA) expuestos a discos foliares de pimienta tratados con diferentes especies de *Chromobacterium*.**

Tratamiento	% medio de repelencia
<i>C. piscinae</i>	75
<i>C. pseudoviolaceum</i>	86
MBI-203 Std 10%	100

**Tabla 22. Porcentaje (%) medio de capacidad repelente de adultos y ninfas de pulgón verde del melocotonero (GPA) expuestos a discos foliares de pimienta tratados con diferentes especies de *Chromobacterium***

Tratamiento	% medio de repelencia
<i>C. aquaticum</i>	91,4
<i>C. haemolyticum</i>	67,3
MBI-203 Std 10%	99

**Ejemplo 19: Comparación de la estabilidad de la formulación de *Chromobacterium* con y sin benzoato de sodio**

La formulación 1 contiene 32 partes de cosecha de concentrado celular de *Chromobacterium*, 62,5 partes de sobrenadante de caldo de fermentación de *Chromobacterium*, 1 parte de n-hexanol, 0,5 partes de alginato de sodio, 2 partes de etoxilato de éster de sorbitán y 2 partes de d-limoneno. Estos ingredientes de formulación se seleccionan por su funcionalidad a la hora de asegurar mezclas uniformes y estables y también se prefieren debido a que están recogidos en la lista 4 de la EPA de los EE. UU. El hecho de que un ingrediente esté recogido en la lista 4 de la EPA presupone que suscita pocas preocupaciones en cuanto a su efecto en el ambiente y su toxicología. La formulación 2 contiene 32 partes de cosecha de concentrado celular de *Chromobacterium*, 54,5 partes de sobrenadante de caldo de fermentación de *Chromobacterium*, 1 parte de n-hexanol, 0,5 partes de alginato de sodio, 2 partes de etoxilato de éster de sorbitán y 10 partes de benzoato de sodio.

La tabla 23 ilustra los resultados del almacenamiento de las formulaciones 1 y 2 a lo largo de un periodo de tiempo prolongado.

**Tabla 23: Almacenamiento de las formulaciones 1 y 2**

Formulación	Observación visual: Un día	30 días	120 días
Formulación 1	Líquido púrpura uniforme	Separación de capas de color pardo claro en la superficie. Color púrpura reducido	Líquido de color pardo grisáceo no uniforme con formación de costras en el espacio de cabeza.
Formulación 2	Líquido púrpura uniforme	Líquido púrpura uniforme	Líquido púrpura uniforme

La formulación 2 es más estable que la formulación 1. Parece ser que las sales hidrosolubles del ácido benzoico estabilizan las composiciones plaguicidas biológicas frente a la separación física y la pérdida de actividad causada por la exposición a la luz solar. Los iones benzoato proporcionan propiedades de capacidad de disolución y equilibrio electrolítico, de tal forma que la matriz biológica permanece uniforme, dando como resultado una vida útil prolongada para la composición plaguicida. Los iones benzoato también pueden proporcionar absorción de la radiación ultravioleta para el producto una vez que se ha aplicado a campos de cultivo. La protección UV prolonga la actividad insecticida durante al menos varios días.

**También se divulga un ensayo que describe (anterior ejemplo 20): Efecto del benzoato de sodio en la mortalidad de plagas**

5 El producto final de MBI-203 que contiene *Chromobacterium substugae*, d-limoneno, hexanol, propilenglicol y formulación de parabeno (MBI-203 EP), combinado con carbonato de calcio, benzoato de sodio u óxido de titanio se colocó en placas de Petri de plástico y se selló con parafilm. Las placas se dejaron en el exterior durante 7 horas expuestas a la luz solar. Tras la exposición al sol, se llevó el material al interior y se diluyó a concentraciones del 1,5% y el 3% v/v con agua Millipore autoclavada. Después, se añadió el material a dieta artificial y se dio de comer a orugas del repollo neonatas, *Trichoplusia ni*. La mortalidad se puntuó de 3 a 4 días de la infestación de la dieta. Los resultados se muestran en la tabla 24 y la figura 16.

**Tabla 24: Efecto del benzoato de sodio en la mortalidad de plagas**

Composición	Mortalidad (% de pérdida)
EP + CaCO <sub>3</sub>	~30% de pérdida
EP+ TiO <sub>2</sub>	~60% de pérdida
EP + Purshade	~25% de pérdida
EP + Benzoato de Na	~10% de pérdida
Solo EP	~30% de pérdida

**Estudio en brécol**

15 Se roció brécol Packman de 4-5 semanas de edad con diluciones al 3% v/v de producto final de MBI-203 (formulación en d-limoneno) (MBI-203 EP) con y sin benzoato de sodio. Cada planta en una parcela de 58 cm<sup>2</sup> (9 in<sup>2</sup>) recibió 500 ul de tratamiento. Se incluyó Tween-20 a una concentración final del 0,01% en todas las muestras. Se colocaron en cada planta cinco pulgones de la col adultos, *Brevicoryne brassicae*. Las plantas e insectos se incubaron con luces de crecimiento (24-29°C (75-85°F), 16 h de luz/8 h de oscuridad). Se puntuaron los pulgones vivos a los 3, 5 y 7 días después de la infestación. Apparently, la formulación en benzoato de sodio proporcionó un mejor control que el producto final solo (figura 17).

**Estudio en col roja**

25 Se rociaron diluciones al 10% v/v de producto final de MBI-203 (formulación en d-limoneno) (MBI-203 EP) con y sin benzoato de sodio sobre col roja a tasas de tratamiento de aproximadamente 280 l/ha (30 gal/acre). También se incluyó en el ensayo un blanco de formulación (lote 2403-83-3) al 10% v/v. Después de haberse secado las plantas, se infestaron con 10 pulgones de la col. El ensayo se puntuó en los días 3, 6 y 8. El porcentaje de control se determinó aplicando la corrección de Henderson-Tilton. En la figura 18 se muestran los resultados. La formulación de producto final + benzoato de sodio mostró un mejor control de los pulgones que el producto final solo o el blanco de formulación solo.

**También se divulga un ensayo que describe (anterior ejemplo 21): Comparación del benzoato de sodio y el carbonato de calcio**

35 Se expuso a la luz del sol durante 1 día en placas de Petri selladas al producto final de MBI-203 sin diluir (MBI-203 EP) con diversas concentraciones de benzoato de sodio o de carbonato de calcio. El material expuesto y no expuesto al sol se diluyó posteriormente al 3% v/v y se aplicó a una dieta artificial. Se expuso a la dieta a neonatos de orugas del repollo y se puntuó la mortalidad 4 días después de la infestación de la dieta. Los resultados se muestran en la figura 19. El benzoato de sodio a concentraciones del 10% y el 15% pareció proporcionar la menor degradación en la actividad con el coste más económico.

**También se divulga un ensayo que describe (anterior ejemplo 22): Efecto del sulfonato de lignina**

45 Se vertieron células secadas por pulverización no diluidas con diversos aditivos en un vial de plástico y se expusieron al ambiente durante 4 días, 4,4-18,3°C (40-65°F), soleado con algunos días de llovizna). Las muestras expuestas y no expuestas se diluyeron al 6% v/v y se rociaron sobre plantas de brécol Packman. Las plantas secas se infestaron con 5 pulgones de la col inmaduros. Se puntuó a los pulgones 3 y 6 días después de la infestación. El control se determinó aplicando la corrección de Henderson-Tilton. Las células secadas por pulverización con benzoato de sodio mostraron el mayor grado de muerte en el día 3 y mantuvieron el control a medida que el ensayo continuó hasta el día 6 (véase la figura 20).

55 El producto final de MBI-203 (formulación en d-limoneno) (MBI-203 EP) se mezcló con diversas concentraciones de benzoato de sodio y sulfonato de lignina. Los tratamientos se diluyeron a concentraciones del 10% v/v y se pipetearon en placas de Petri de plástico y se expusieron a la luz solar durante 4 días consecutivos. Después, se

evaluó la actividad de las muestras contra la oruga del repollo tratando dieta artificial. Los tratamientos con sulfonato de lignina tendieron a formar una costra en la superficie de la dieta artificial. El producto final con solo benzoato de sodio parecía proporcionar la muerte más prometedoras antes y después de la exposición al sol (véanse las figuras 21 y 22).

5 En otro estudio, se expusieron a la luz solar diluciones al 10% v/v de producto final de MBI-203 (formulación en d-limoneno) con benzoato de sodio al 10% y diversas concentraciones de sulfonato de lignina durante 4 días consecutivos en placas de Petri de plástico selladas. Tras la exposición, se rociaron plantas de brécol Packman de 4  
10 semanas de edad con los tratamientos a una tasa de aproximadamente 280 l/ha (30 gal/acre). Se colocaron tres larvas de oruga de la col de estadio dos tardío en cada planta tratada y se puntuó la mortalidad en los días 3 y 4 del ensayo. De las plantas expuestas al sol, la muestra con solo benzoato de sodio mostró el mayor grado de control (véase la figura 23).

15 Aunque la presente invención se ha descrito en referencia a realizaciones específicas, los detalles de las mismas no han de interpretarse como limitantes, ya que es obvio que se pueden usar diversos equivalentes, cambios y modificaciones y aun así, encontrarse dentro del alcance de la presente invención.

A lo largo de la presente memoria descriptiva se citan diversas referencias.

## 20 Referencias citadas

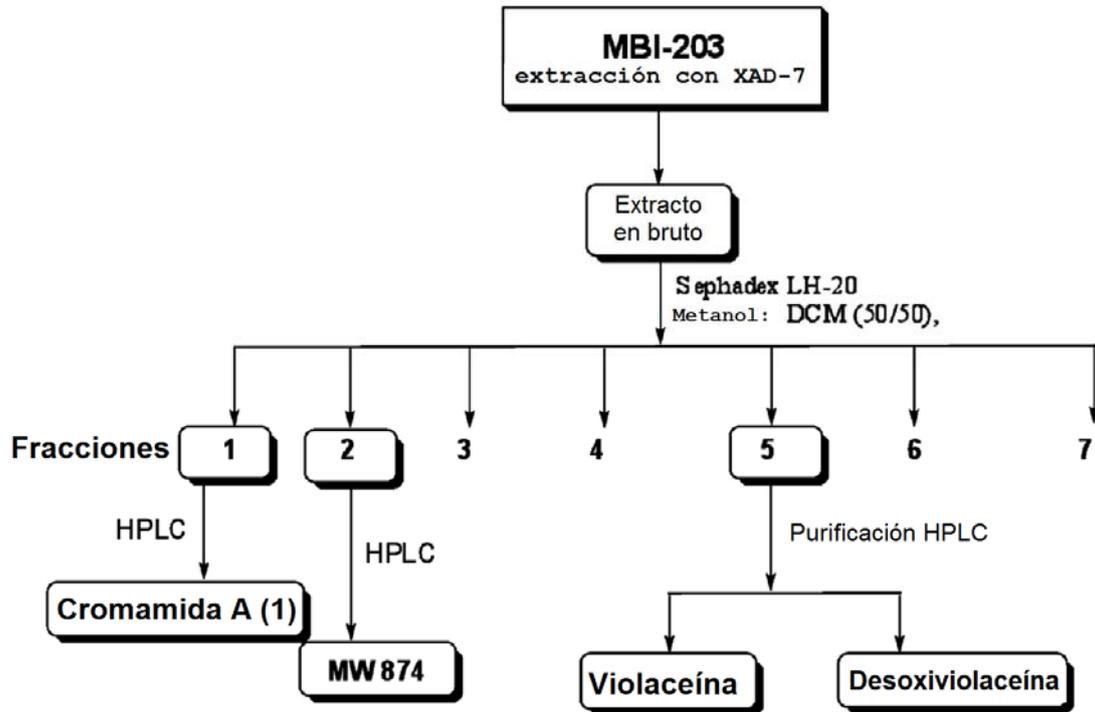
- Asolkar, R. N., Jensen, P. R., Kauffman, C. A., Fenical, W. 2006. Daryamides A-C, Weakly Cytotoxic Polyketides from a Marine-Derived Actinomycete of the Genus *Streptomyces* strain CNQ-085 J. Nat. Prod. 69:1756-1759.
- 25 Arena, J. P., K. K. Liu, et al. (1995). "The mechanism of action of avermectins in *Caenorhabditis elegans* - correlation between activation of glutamate-sensitive chloride current, membrane binding and biological activity." *Journal of Parasitology* 81: 286-294.
- Byrom, D. (1991). "Copolymer production." Documento EP 0431883 A2.
- 30 Durán, N., G. Z. Justo, et al. (2007). "Minireview. Violacein: properties and biological activities." *Biotechnol. Appl. Biochem.* 48: 127-133.
- Durán, N. y C. F. M. Menck (2001). "Chromobacterium violaceum: a review of pharmacological and industrial perspectives." *Crit. Rev. Microbiol.* 27: 201-222.
- 35 Furneaux, G. C. (2005). "Compostable packaging material and method." Documento WO 030482 A1.
- Hahn, S. K.; Chang, Y. K.; Lee, S. Y. (1995). Recovery and characterization of poly(3-hydroxybutyric Acid) synthesized in *Alcaligenes eutrophus* and recombinant *Escherichia coli*. *Applied & Environ. Microbiol.* 61. 34-39.
- Hoshino, T., T. Takano, et al. (1987). "Biosynthesis of violacein: origins of the hydrogen, nitrogen and oxygen atoms in the 2-pyrrolidone nucleus." *Agric. Biol. Chem.* 51: 2733-2741.
- 45 Huismar, G. W.; Peoples, O. P.; Skraly, F. A. (2000). "Transgenic microbial polyhydroxyalkanoate producers." Documento WO 11188 A1.
- Huismar, G. W.; Skraly, F. A.; Martin, D. P.; Peoples, O. P. (1999). "Biological systems for manufacture of polyhydroxyalkanoate polymers containing 4-hydroxyacids." Documento WO 14313 A2.
- 50 Hungria, M., S. Astolfi-Filho, et al. (2005). "Genetic characterization of *Chromobacterium* isolates from black water environments in the Brazilian Amazon." *Lett. Appl. Microbiol.* 41: 17-23.
- Khanna S, Srivastava AK. (2005). "Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates" *Process Biochemistry* 40, 607-619.
- 55 Krans RG, Gabbert KK, Locke TA, Madigan MT (1997). "Polyhydroxyalkanoate production in *Rhodobacter capsulatus*: Genes, mutants, expression, and physiology." *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 3003-3009.
- 60 Krieg, A., A. M. Huger, et al. (1983). "*Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*: Ein neuer, gegenüber Larven von Coleopteren wirksamer Pathotyp." *Z. Angew. Entomol.* 96: 500-508.
- Kämpfer, P., H.-J. Busse, et al. (2009). "*Chromobacterium piscinae* sp. nov. and *Chromobacterium pseudoviolaceum* sp. nov., from environmental samples." *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59: 2486-2490.
- 65 Lee, S.Y. (1996). "Bacterial polyhydroxyalkanoates". *Biotechnol. Bioeng.* 49, 1-14.

- Martin, P. A. W., D. Gundersen-Rindal, et al. (2007a). "Chromobacterium substugae sp. nov., a betaproteobacterium toxic to Colorado potato beetle and other insect pests." *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57: 993-999.
- 5 Martin, P.A., A.D.S. Shropshire, et al., (2007b). " Chromobacterium substugae sp. nov for control of insect pests" Patente de los Estados Unidos 7244607 B2.
- Martin, P.A.W., Hirose, E., y Aldrich, J.R. 2007c. " Toxicity of Chromobacterium substugae to southern green stink bug (Heteroptera:Pentatomidae) and corn rootworm (Coleoptera:Chrysomelidae)". *J. Econ. Entomol.* 100: 680-684.
- 10
- Martin, P.A.W., Blackburn, M., et al. (2004), "Two New Bacterial Pathogens of Colorado Potato Beetle (Colorado: Chrysomelidae)", *J. Econ. Entomol.* 97:774-780 (2004).
- 15 Martin, P.A.W., "A Freeze-Dried Diet to Test Pathogens of Colorado potato beetle", *Biological Control* 29:109-114 (2004).
- Maskey, R. M.; Kock, I.; Shaaban, M.; Grun-Wollny, I.; Helmke, E.; Mayer, F.; Wagner-Dobler, I.; Laatsch, H. (2002) Low molecular weight oligo-B-hydroxybutyric acid and 3-hydrox-N-phenyl-butylamide new products from microorganism. *Polymer bulletin.* 49, 87-93.
- 20
- McClean, K. H., M. K. Winson, et al. (1997). "Quorum sensing and Chromobacterium violaceum: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acyl homoserine lactones" *Microbiology* 143: 3703-3711.
- 25 Mukhopadhyay M., Patra A., Paul, A. K., (2005). "Production of poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxy-valerate)" by *Rhodospirillum rubrum* SP5212" *J. Micro. Biotech.*, 21, 765-769.
- Peoples, O. P.; Sinskey, A. J. (1991). " Method for producing novel polyester biopolymer." *Documento WO* 910091 A1.
- 30
- Reddy, C. S. K.; Ghai, R.; Kalia, R.V.C. (2003). "Polyhydroxyalkanoates: an overview" *Bioresource Technology.* 87, 137-146.
- 35 Ryan, K. S. y C. L. Drennan (2009). "Divergent pathways in the biosynthesis of bisindole natural products." *Chemistry&Biology* 16: 351-364.
- Thompson, G. D., R. Dutton, et al. (2000). "Spinosad - a case study: an example from a natural products discovery programme." *Pest Management Science* 56: 696-702.
- 40 Young, C.-C., A. B. Arun, et al. (2008). "Chromobacterium aquaticum sp. nov., isolated from spring water samples." *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58: 877-880.

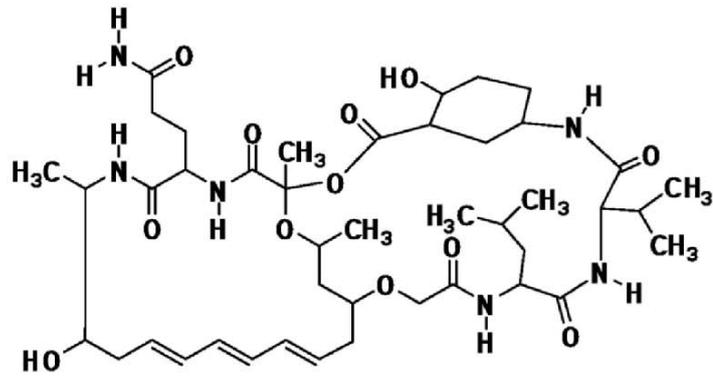
**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un método no terapéutico para modular una infestación por plagas, en donde dicha plaga se selecciona entre *Acari*, *Anthomyidae*, *Triozidae*, *Tenebrionidae*, *Scarabaiedae*, en una ubicación donde se desea la modulación, que comprende  
aplicar una cantidad de una composición obtenida de *Chromobacterium subtsugae* cepa Nov (NRRL B-30655), eficaz para modular dicha infestación.
- 10 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la ubicación donde se desea la modulación es sobre una planta, semilla de planta o en el suelo.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde dicho *Acari* es un ácaro.
- 15 4. El método de acuerdo con la reivindicación 3, en donde dicho ácaro es *Tetranychus* sp.
5. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde dicha plaga se selecciona entre *Bactericera* sp., *Cyclocephala* sp., *Alphitobius* sp., *Rhizotrogus* sp. o *Anomala* sp.
- 20 6. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en donde dicha plaga se selecciona entre *Bactericera cockerelli*, *Alphitobius diaperinusxi*, *Cyclocephala lurida*, *Rhizotrogus majalis* o *Anomala orientalis*.
7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en donde la plaga es una larva de un *Scarabaiedae*.
- 25 8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde la composición comprende caldo celular completo, sobrenadante, filtrado o extracto obtenido de la cepa de *Chromobacterium subtsugae* Nov (NRRL B-30655).
- 30 9. El método de la reivindicación 8, en donde el caldo celular completo, sobrenadante, filtrado o extracto comprende violaceína, desoxiviolaceína o cromamida A.

**FIGURA 1**



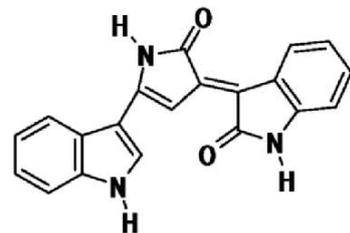
**FIGURA 2**



**Cromamida A (1)**

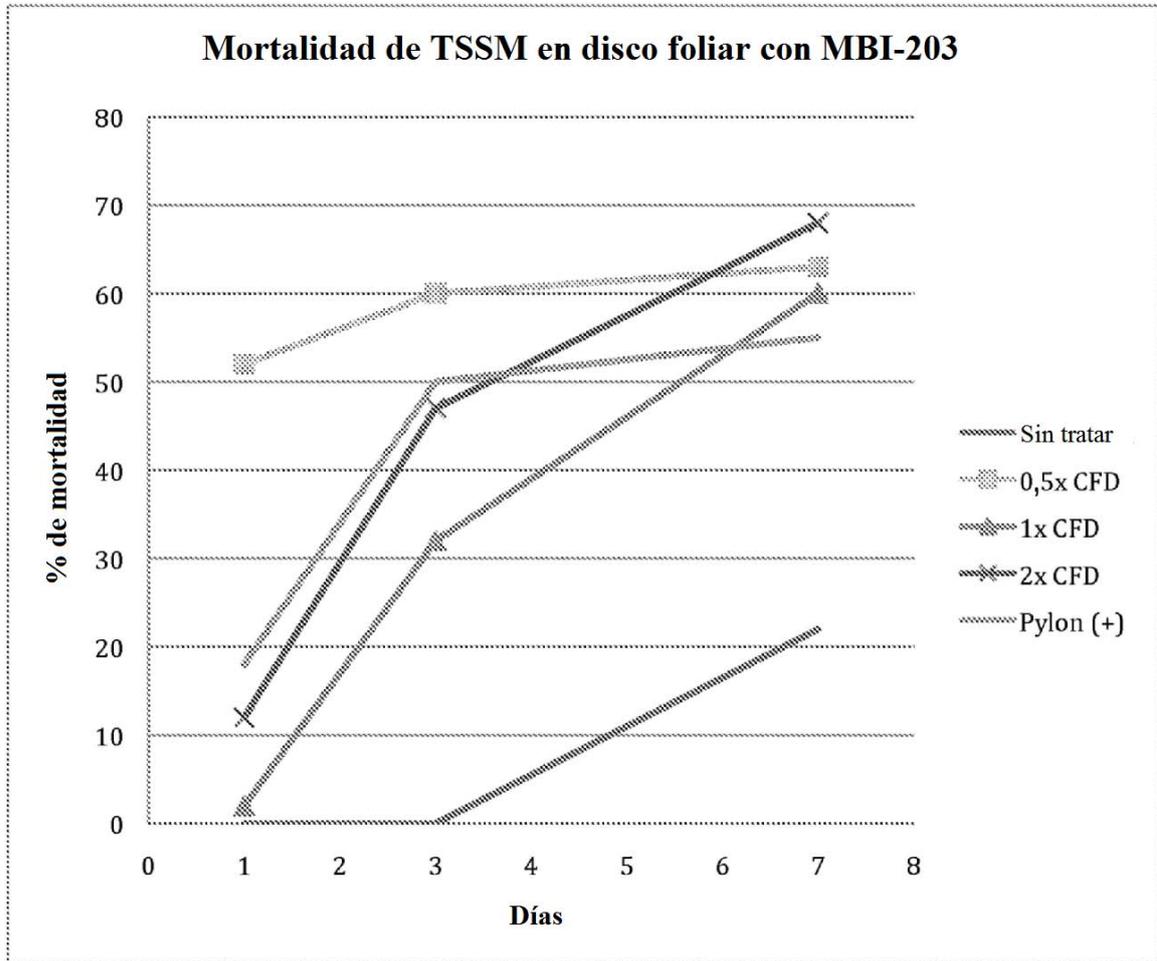


**Violaceína (2)**

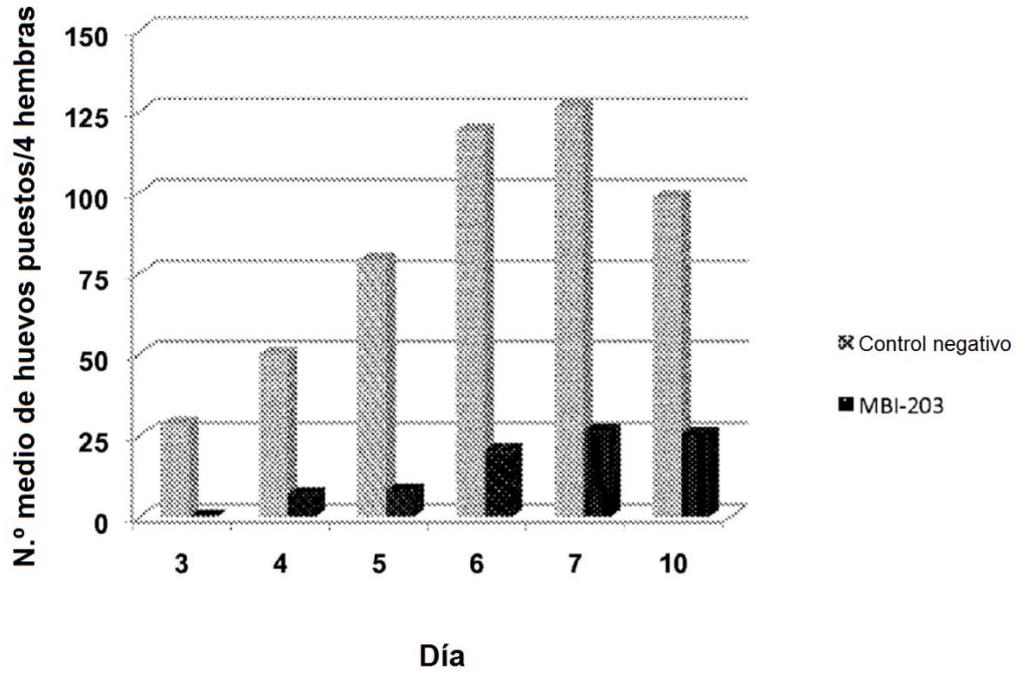


**Desoxiviolaceína (3)**

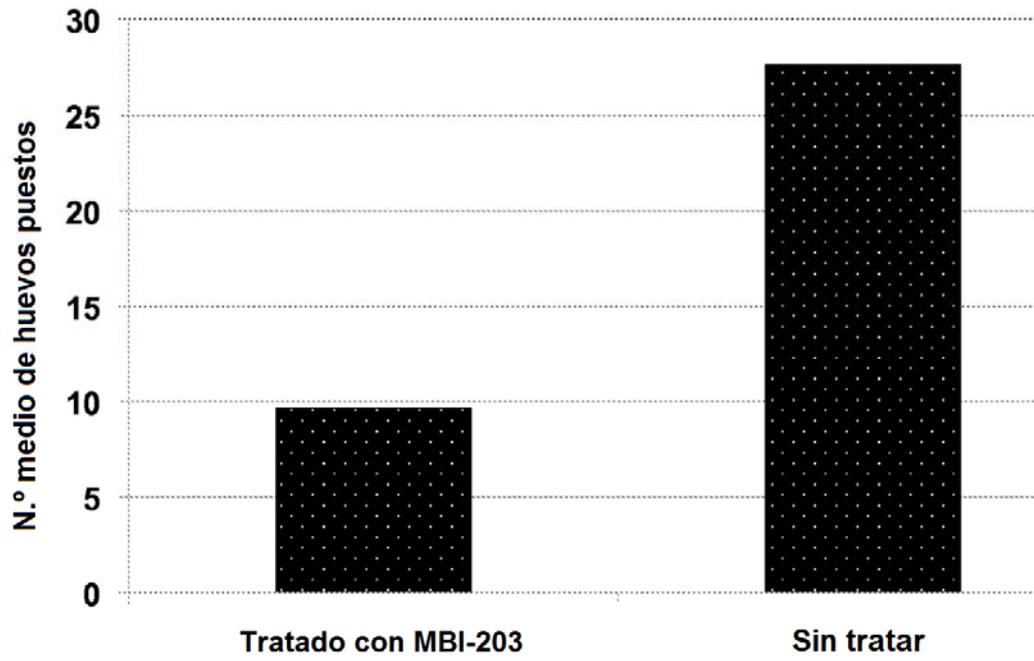
**FIGURA 3**



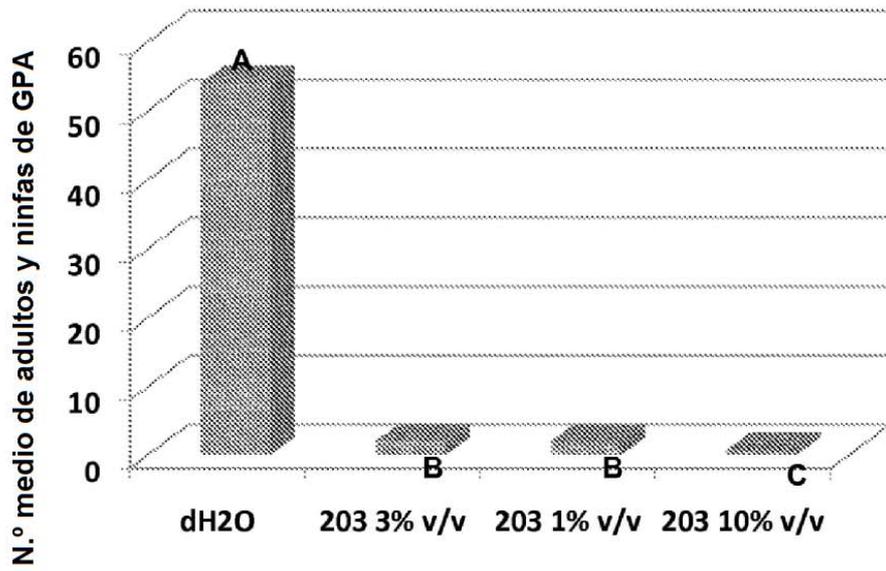
**FIGURA 4**



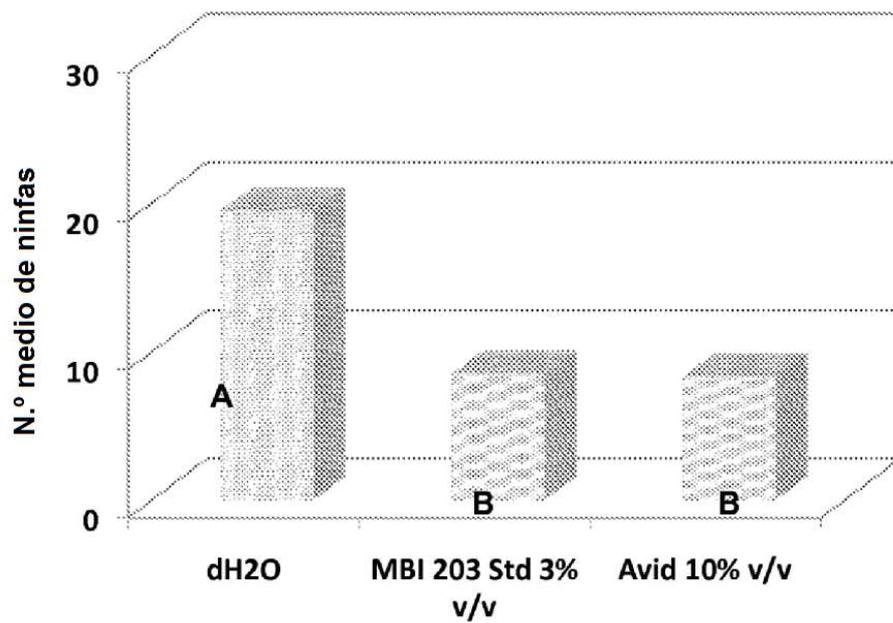
**FIGURA 5**



**FIGURA 6**



**FIGURA 7**



**FIGURA 8**

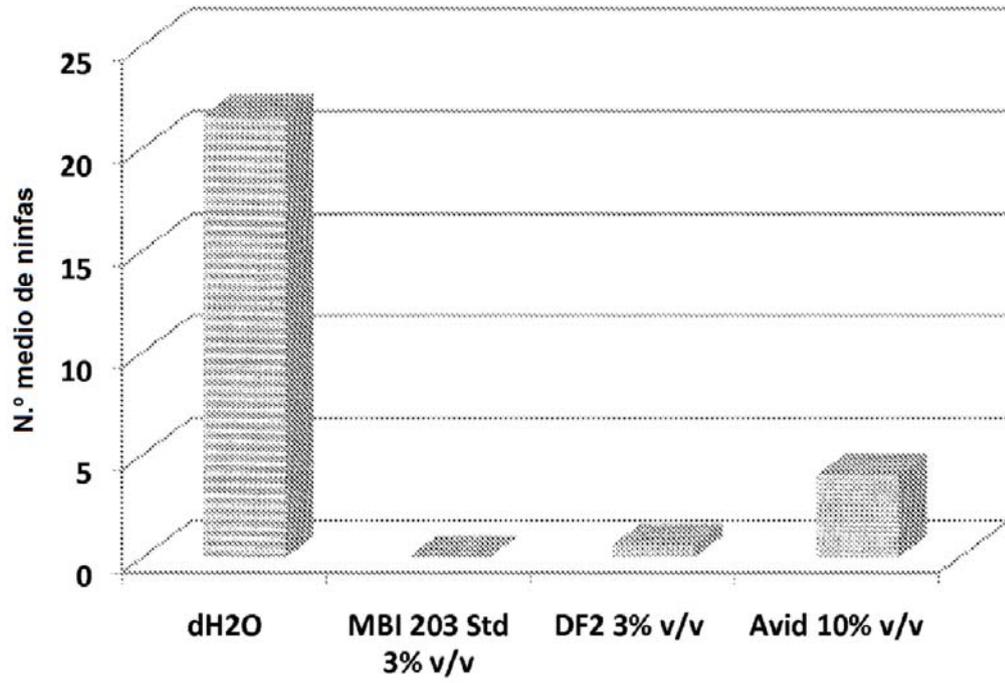
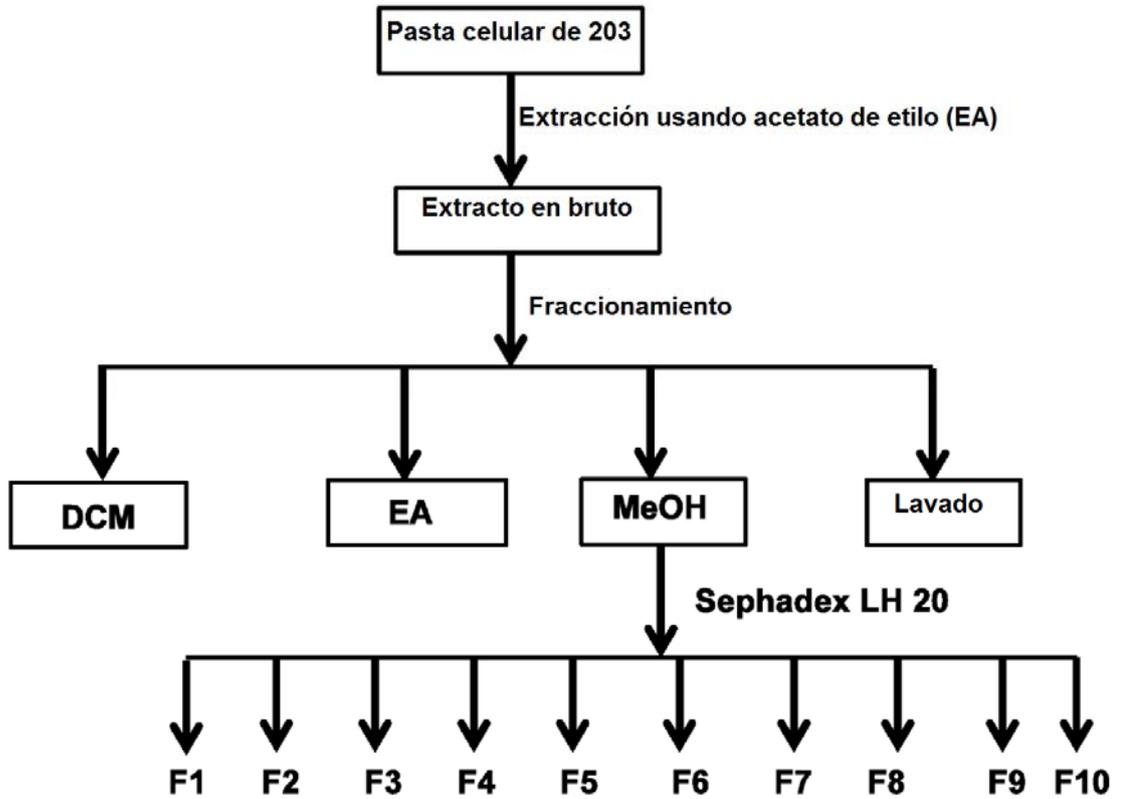
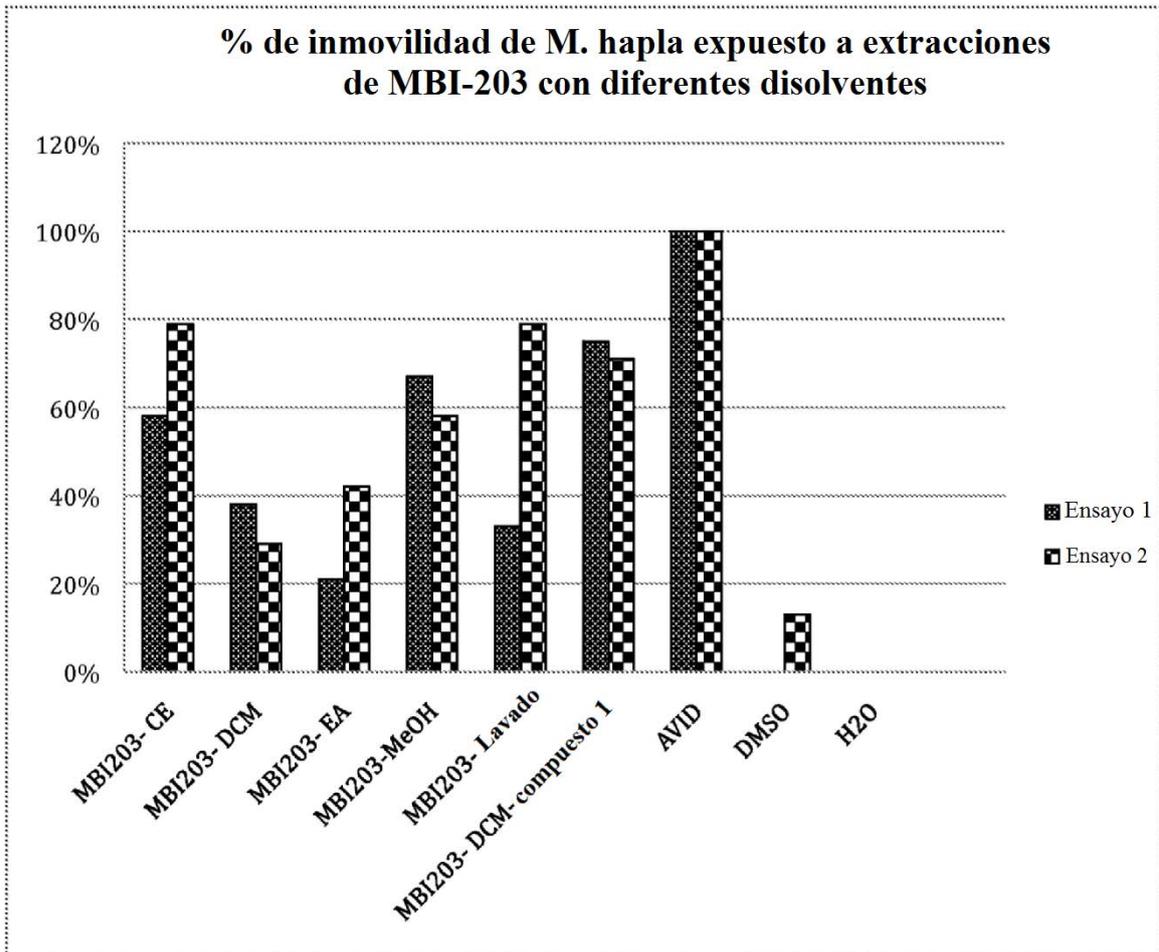


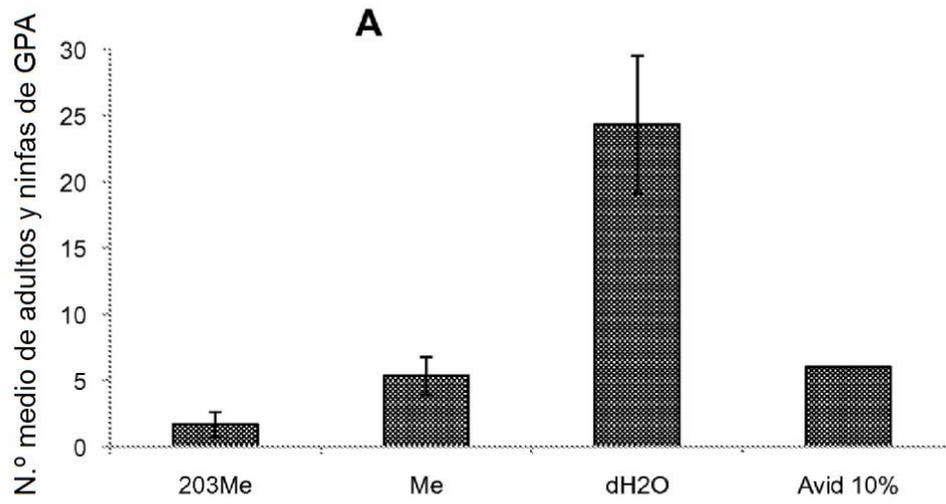
FIGURA 9



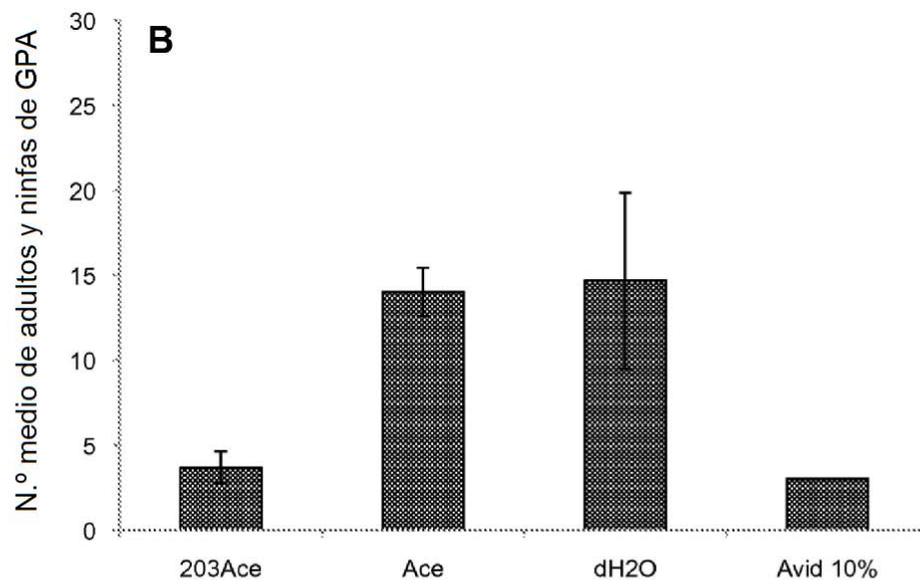
**FIGURA 10**



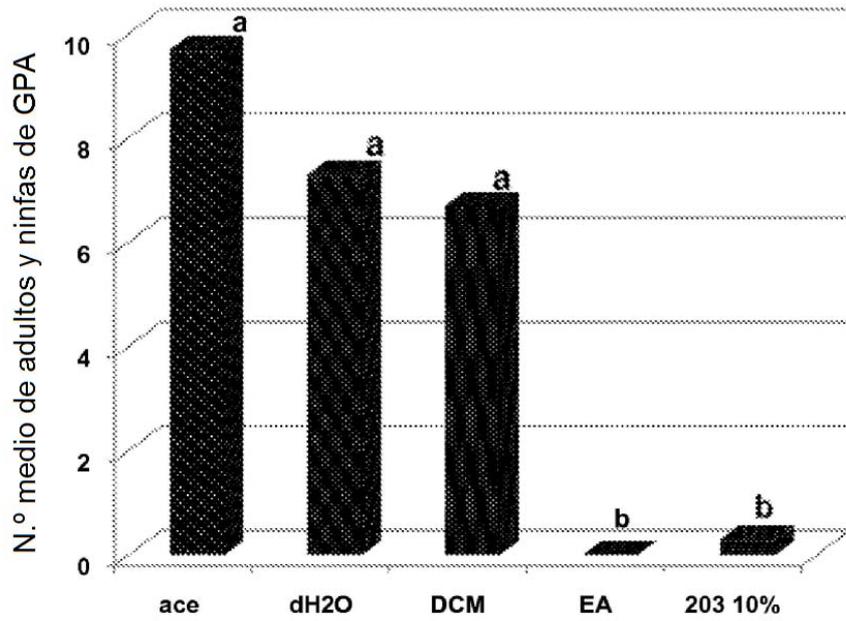
**FIGURA 11A**



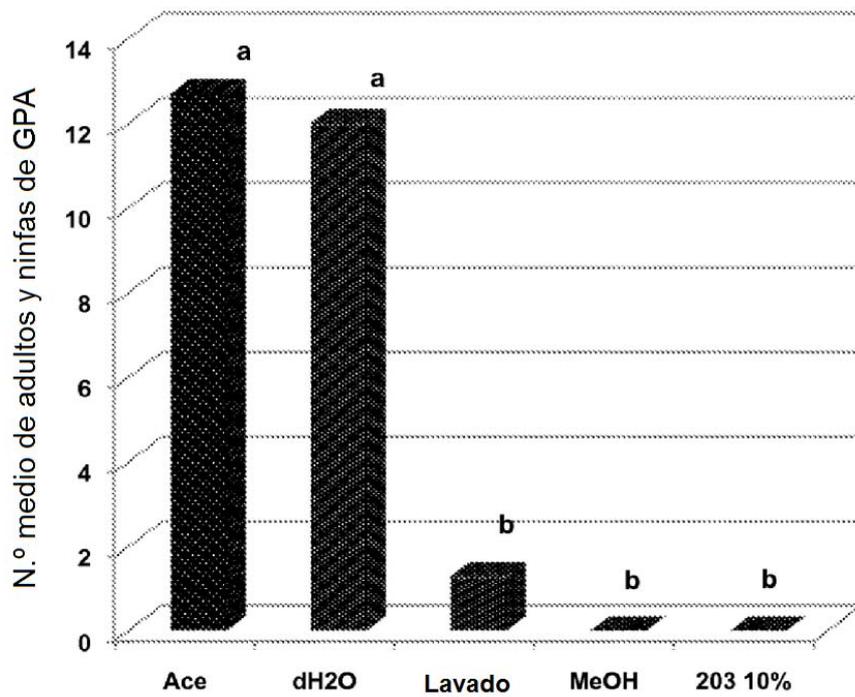
**FIGURA 11B**



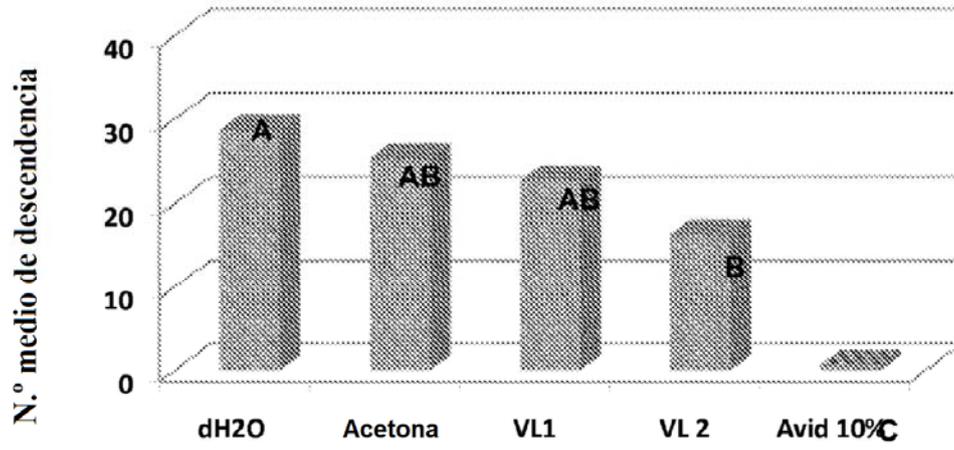
**FIGURA 12A**



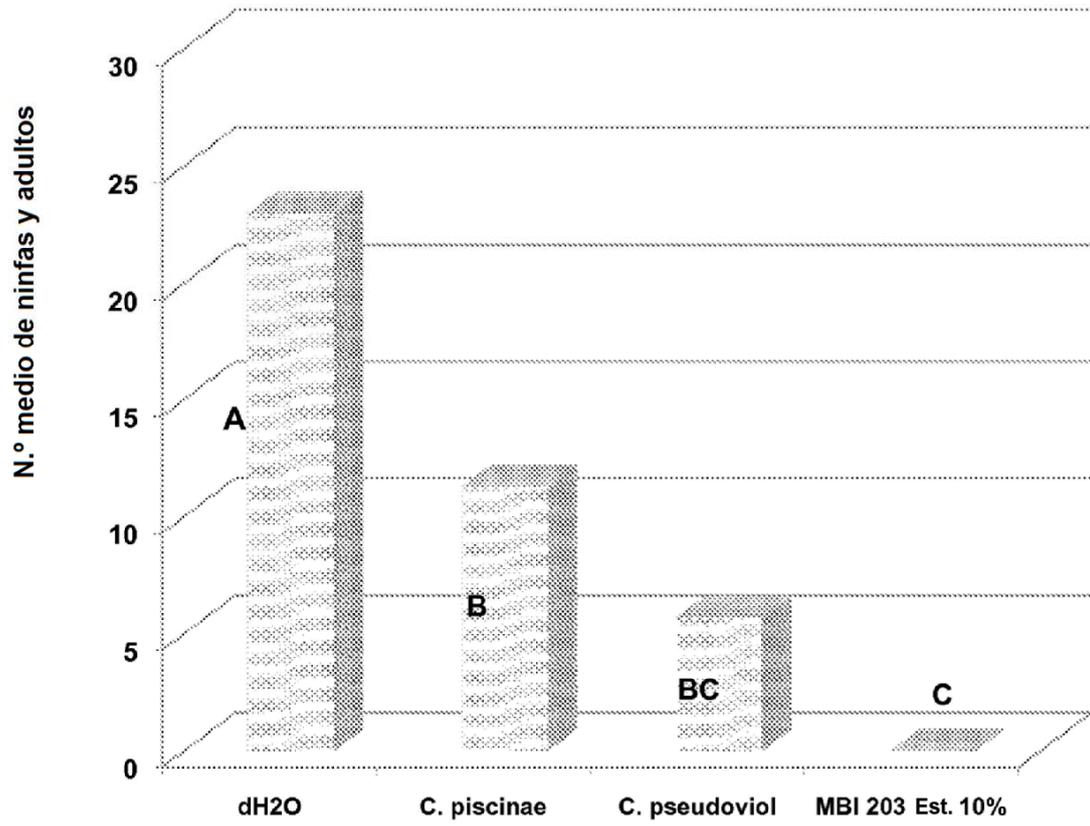
**FIGURA 12B**



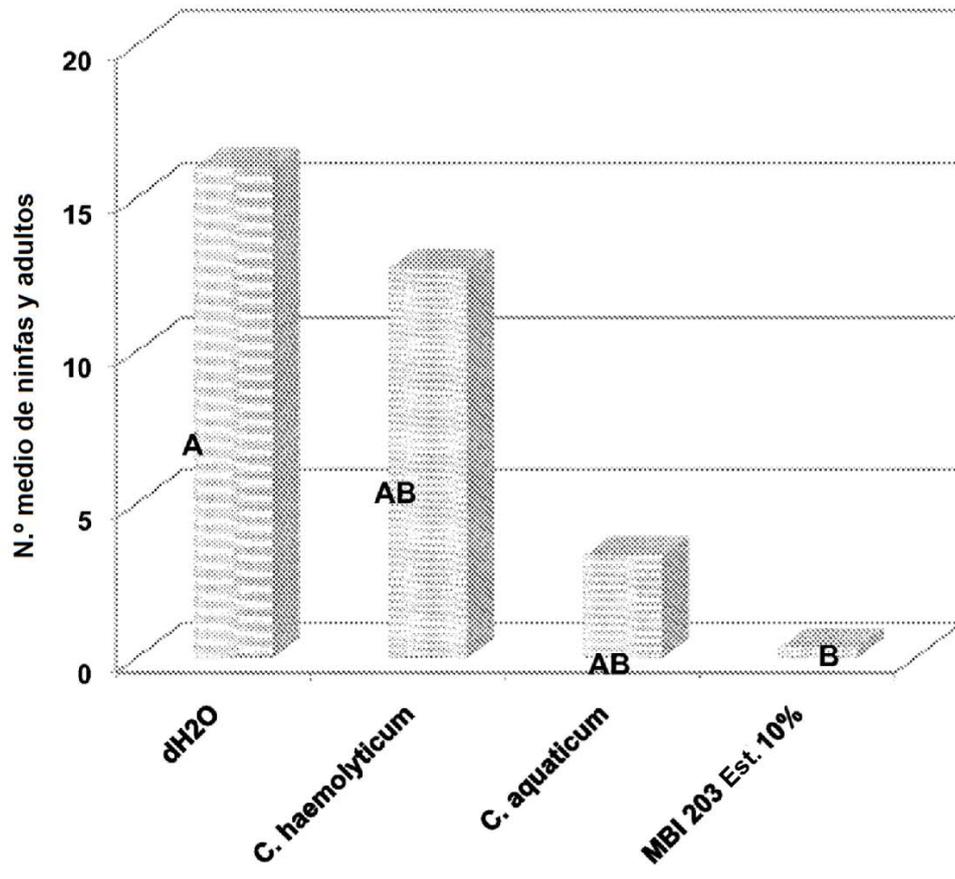
**FIGURA 13**



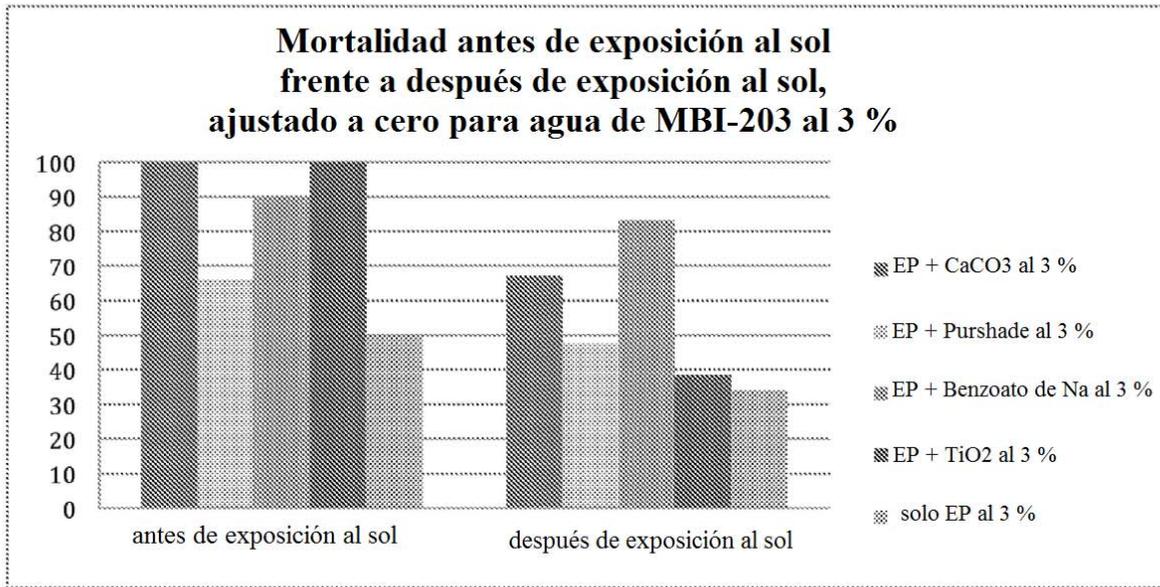
**FIGURA 14**



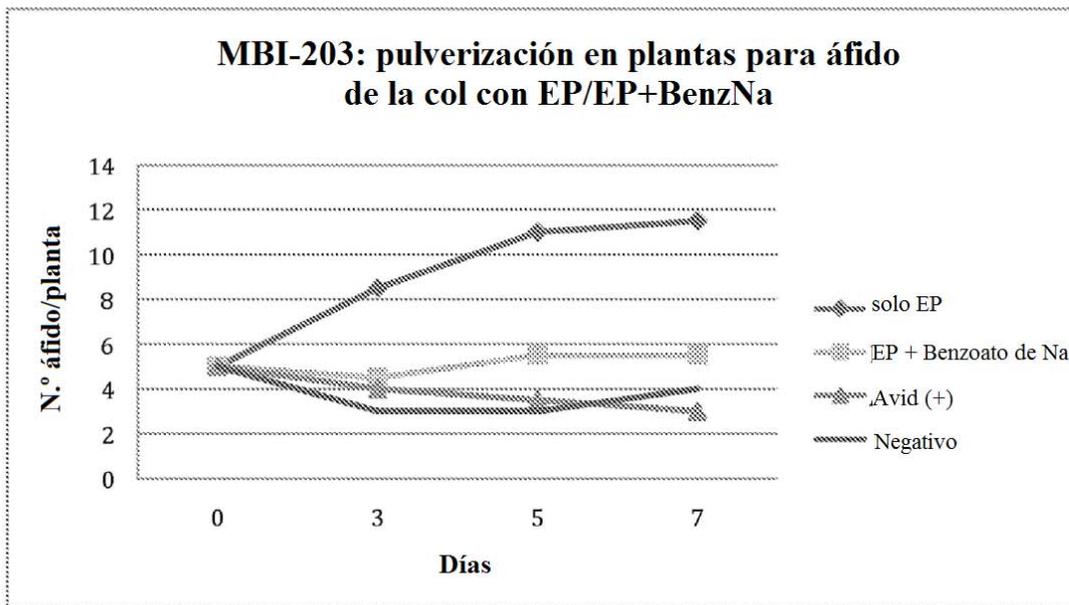
**FIGURA 15**



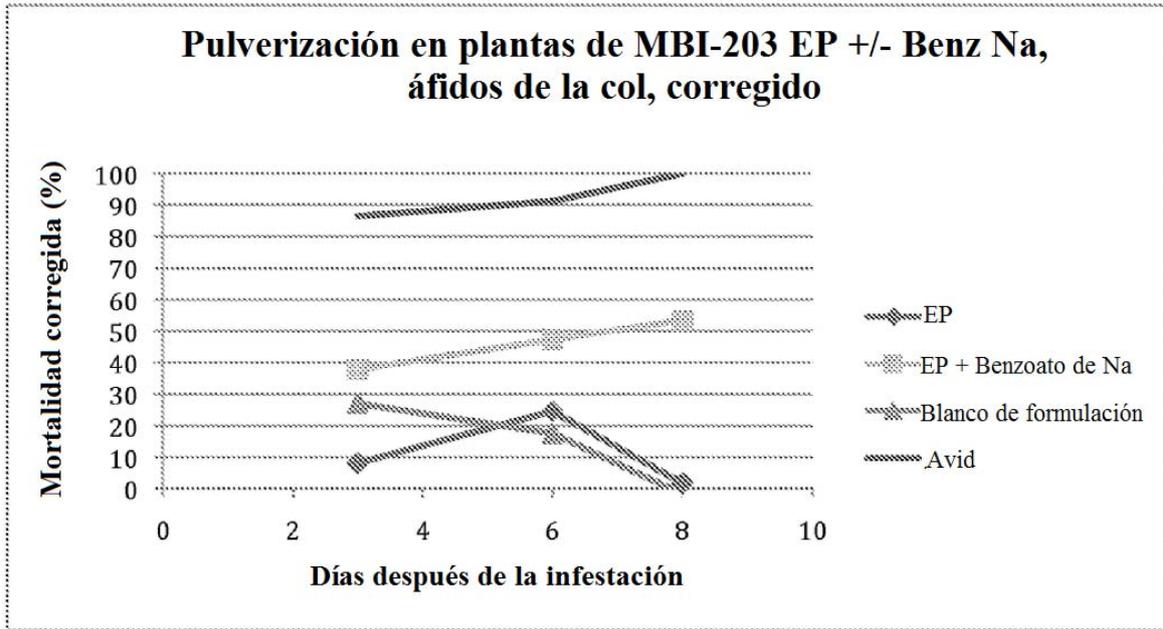
**FIGURA 16**



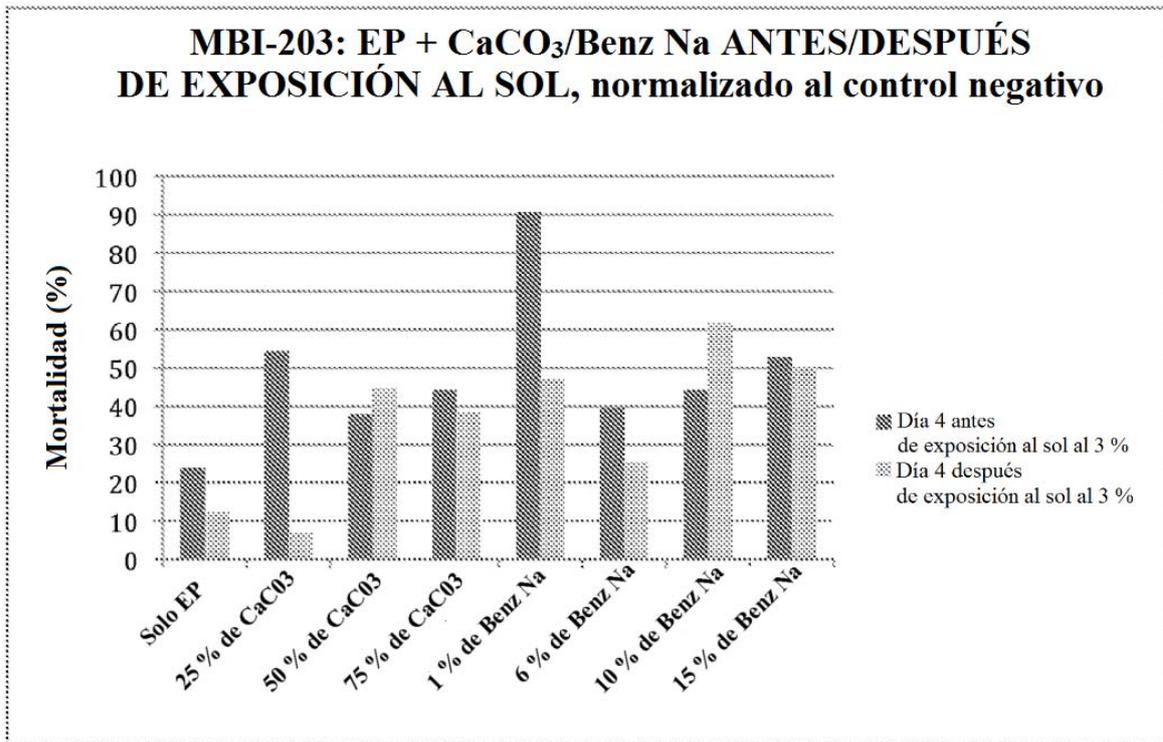
**FIGURA 17**



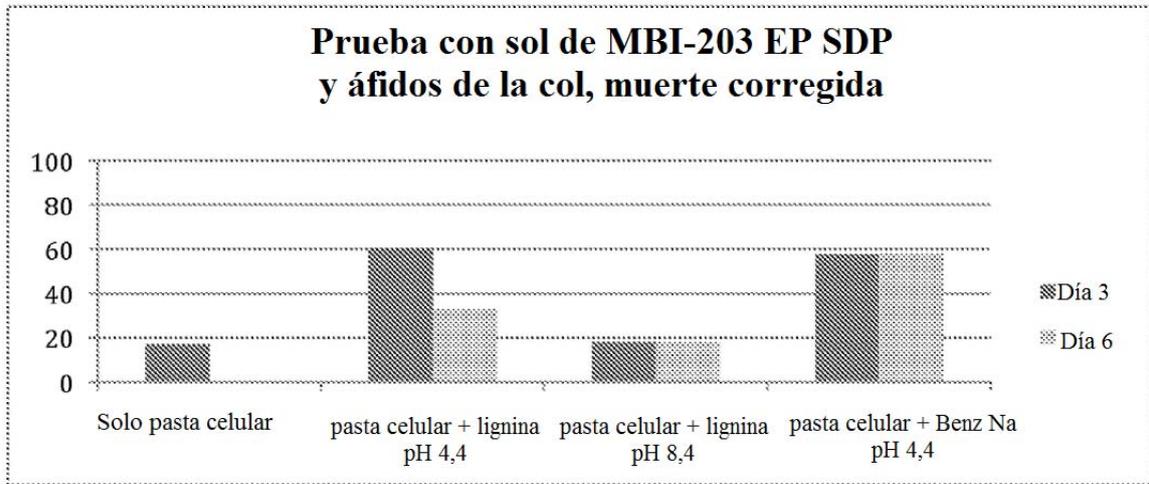
**FIGURA 18**



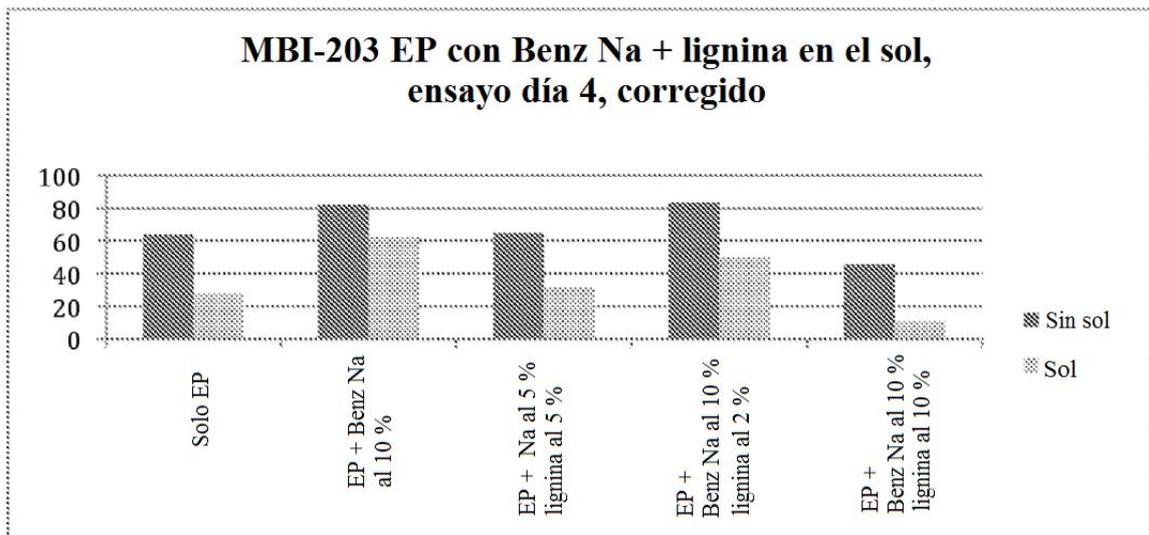
**FIGURA 19**



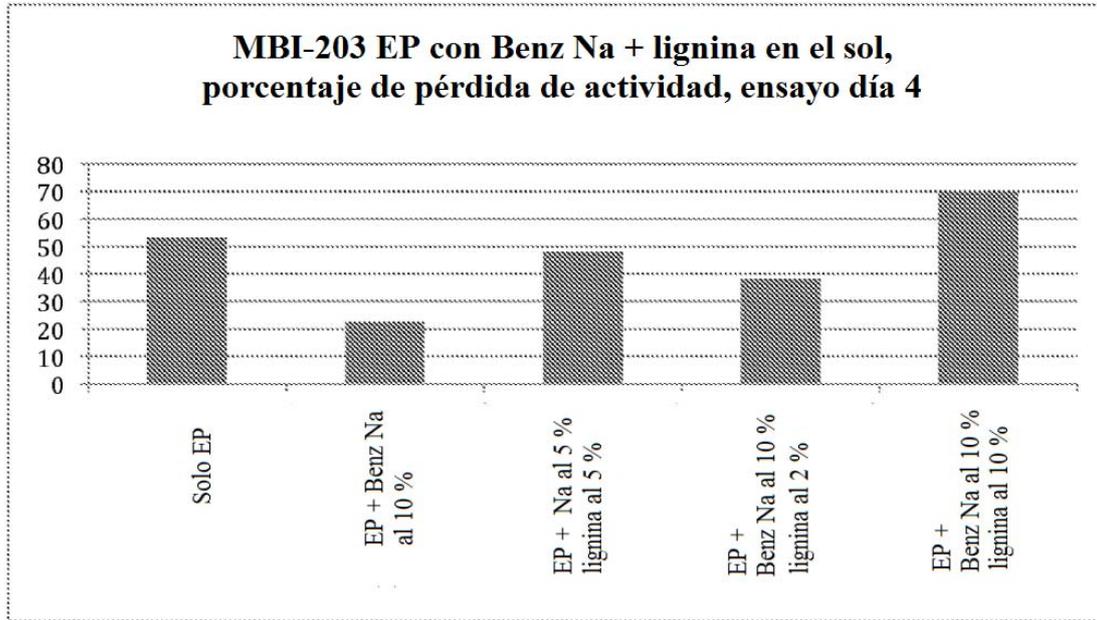
**FIGURA 20**



**FIGURA 21**



**FIGURA 22**



**FIGURA 23**

