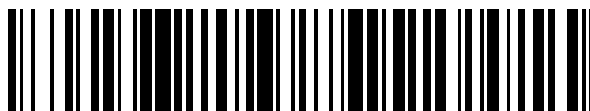


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 698 100**

51 Int. Cl.:

A01N 63/00 (2006.01)

C12N 1/20 (2006.01)

C12R 1/01 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.06.2013 PCT/IB2013/055157**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.03.2014 WO14045131**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.06.2013 E 13838290 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.08.2018 EP 2906044**

54 Título: **Cepas nuevas de Brevibacillus laterosporus como agentes de biocontrol contra plagas de plantas, particularmente Lepidoptera y Diptera**

30 Prioridad:

24.09.2012 US 201261704801 P
15.03.2013 US 201313837735

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
31.01.2019

73 Titular/es:

LINCOLN UNIVERSITY (100.0%)
PO Box 84, Lincoln University
Lincoln 7647, NZ

72 Inventor/es:

GLARE, TRAVIS, ROBERT;
HAMPTON, JOHN, GRAHAM;
COX, MURRAY, PAUL y
BIENKOWSKI, DAMIAN, ALEXANDER

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 698 100 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

Cepas nuevas de *Brevibacillus laterosporus* como agentes de biocontrol contra plagas de plantas, particularmente Lepidoptera y Diptera.

Campo técnico

Esta invención se refiere a cepas nuevas de *Brevibacillus laterosporus* y composiciones que contienen las mismas. Se proporcionan métodos para el control biológico de plagas de insectos que incluyen la polilla dorso de diamante y el mosquito usando las nuevas cepas y composiciones.

Antecedentes de la invención

Las plagas de insectos representan un coste económico significativo para la agricultura moderna. Los sistemas de agricultura actuales requieren a menudo uno o unos pocos cultivos o tipos de plantas que se deben cultivar en un área grande. Un sistema ecológicamente desequilibrado es susceptible a la presión de los insectos.

Algunas plagas de insectos también son perjudiciales para la salud animal, incluidos los seres humanos. Por ejemplo, se sabe que los mosquitos portan una variedad de enfermedades. Por lo tanto, actúan como vectores en la propagación de la enfermedad.

Tradicionalmente, se ha perseguido el control de las plagas de insectos a través del uso de insecticidas y pesticidas químicos. Sin embargo, los consumidores se están preocupando cada vez más por los restos químicos y sus efectos en la salud animal y vegetal, y por el medioambiente. Además, muchas plagas de insectos se están volviendo resistentes a los pesticidas e insecticidas.

El control biológico representa un medio alternativo para controlar las plagas de insectos, el cual reduce la dependencia de productos químicos. Dichos métodos "naturales" gozan de una mayor aceptación pública, y pueden ser más eficaces y sostenibles que los métodos de control químicos.

Una amplia gama de agentes de control biológicos, que incluyen bacterias, levaduras y hongos se han investigado para su uso en el control de plagas de insectos. Una especie de bacterias ampliamente investigada para el uso insecticida es *Bacillus*.

Bacillus es un género que contiene muchas especies bacterianas diversas con propiedades que varían desde perjudiciales para la salud animal y vegetal, hasta útil para el control de insectos.

Bacillus thuringiensis (Bt), en particular, es un agente de biocontrol conocido disponible en el comercio en productos tales como Thuricide® y Dipel®.

En los últimos años, ha habido evidencia de resistencia de los insectos a al desarrollo de Bt. Véase, por ejemplo, Tabashnik et al (1990); Baxter et al (2011); y Tabashnik et al (1998). En consecuencia, todavía hay una necesidad de nuevas especies de *Bacillus* para su uso en el control de plagas, incluyendo plagas de insectos.

Los solicitantes han identificado ahora un número de nuevas *Brevibacillus laterosporus* que son eficaces como agentes de biocontrol.

Por lo tanto, un objeto de la presente invención es proporcionar cepas nuevas de *B. laterosporus* útiles como agentes de biocontrol. Otro objeto es proporcionar una composición que comprende al menos una de las cepas nuevas de *B. laterosporus* de la invención; y/o al menos proporcionar al público una opción útil.

Sumario de la invención

En un aspecto, la invención proporciona una cepa aislada de *Brevibacillus laterosporus* con actividad insecticida contra al menos una especie de Lepidoptera y al menos una especie de Diptera, en la que la cepa aislada de *Brevibacillus laterosporus* se selecciona de la cepa NMI n.º V12/001946 de *Brevibacillus laterosporus*, cepa NMI n.º V12/001945 de *Brevibacillus laterosporus* y cepa NMI n.º V12/001944 de *Brevibacillus laterosporus*.

En una realización, al menos una de las especies de Lepidoptera es la polilla dorso de diamante (*Plutella xylostella*), tal como la cepa aislada de *Brevibacillus laterosporus* de la invención, se puede usar para controlar una polilla dorso de diamante (*Plutella xylostella*).

En una realización, la al menos una especie de Lepidoptera es el gusano gris de la col (*Trichoplusia ni*), tal como la cepa aislada de *Brevibacillus laterosporus* de la invención se puede usar para controlar el gusano gris de la col (*Trichoplusia ni*).

En una realización, la al menos una Lepidoptera se selecciona de una Tortricidae y una Plutellidae, tal como la cepa de *Brevibacillus laterosporus* de la invención se puede usar para controlar una especie de Tortricidae o una especie de Plutellidae.

- 5 En una realización adicional, la al menos una especie de Diptera es una especie de mosquito, tal como la cepa aislada de *Brevibacillus laterosporus* de la invención se puede usar para controlar una especie de mosquito.

En una realización, la especie de mosquito se selecciona de *Culex pervigilans* y *Opifex fuscus*.

- 10 En una realización adicional, la cepa de *B. laterosporus* es activa contra la polilla dorso de diamante (*Plutella xylostella*) y al menos una especie de mosquito seleccionada de *Culex pervigilans* y *Opifex fuscus*, tal como la cepa aislada de *Brevibacillus laterosporus* de la invención, se puede usar para controlar al menos una de la polilla dorso de diamante (*Plutella xylostella*) y al menos una especie de mosquito.

- 15 En una realización, la cepa de *B. laterosporus* está en la forma de un cultivo biológicamente puro.

Las cepas aisladas de *B. laterosporus* o cultivos biológicamente puros de pueden seleccionar de las cepas NMI n.º V12/001946, NMI n.º V12/001945 y NMI n.º V12/001944.

- 20 En un aspecto, la invención proporciona el cultivo biológicamente puro de la cepa NMI n.º V12/001946 de *Brevibacillus laterosporus*.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un cultivo biológicamente puro de la cepa NMI n.º V12/001945 de *Brevibacillus laterosporus*.

- 25 En un aspecto adicional, la invención proporciona un cultivo biológicamente puro de la cepa NMI n.º V12/001944 de *Brevibacillus laterosporus*.

- 30 En otro aspecto, la invención proporciona una composición que comprende al menos una cepa de *B. laterosporus* de la invención, y un soporte agrícolamente aceptable.

En una realización, la invención proporciona una composición que comprende una o más cepas de *B. laterosporus* seleccionadas de NMI n.º V12/001946, NMI n.º V12/001945 y NMI n.º V12/001944 y un soporte agrícolamente aceptable.

- 35 En una realización, la composición puede comprender dos cepas de *B. laterosporus* de la invención. En otra realización, la composición puede comprender tres cepas de *B. laterosporus* de la invención.

- 40 En una realización, la composición consiste esencialmente en una o más cepas de *B. laterosporus* seleccionadas entre NMI n.º V12/001946, NMI n.º V12/001945 y NMI n.º V12/001944 y un soporte agrícolamente aceptable.

En una realización, la composición consiste esencialmente en dos cepas de *B. laterosporus* de la invención y un soporte agrícolamente aceptable. En otra realización, la composición consiste esencialmente en tres cepas de *B. laterosporus* de la invención.

- 45 En una realización, la composición es una composición de insecticida.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para controlar al menos una plaga, comprendiendo el método poner en contacto la al menos una plaga con una composición de la invención.

- 50 En otro aspecto, la invención proporciona un método para controlar al menos una plaga, comprendiendo el método poner en contacto la al menos una plaga con una o más cepas de *B. laterosporus* de la invención.

- 55 Preferentemente, la al menos una plaga es una plaga de insecto, y más particularmente la al menos una plaga se selecciona entre una Lepidoptera y una Diptera.

La aplicación de la cepa, cepas o composición de la invención en el método de la invención puede controlar más de un tipo de plaga.

- 60 Por lo tanto, en una realización adicional, la al menos una plaga es una plaga de insecto, seleccionada entre una Lepidoptera, una Diptera o ambas.

En una realización, la al menos una plaga de insecto se selecciona de una polilla dorso de diamante y un mosquito.

- 65 En una realización adicional, la al menos una plaga es una plaga de insecto seleccionada entre una polilla dorso de diamante, un mosquito o ambos.

En una realización, la Lepidoptera se selecciona entre una Tortricidae, Plutellidae y Noctuidae. En una realización particular, la Lepidoptera se selecciona entre una Tortricidae y una Plutellidae.

En otra realización, la al menos una plaga de insecto es una polilla. En una realización, la polilla se selecciona del grupo que consiste en una polilla dorso de diamante (*Plutella xylostella*), un gusano gris de la col (*Trichoplusia ni*), una carpocapsa (*Cydia pomonella*), una polilla común del bosque (*Pseudocoremia suavis*), una oruga de las cápsulas del algodón (*Helicoverpa armigera*), una polilla marrón claro del manzano (*Epiphyas postvittana*), una polilla enrolladora de patas negras (*Planotortrixnotophaea*), y una polilla enrolladora de la lira negra (*Cnephasia jactatana*).

En otra realización la plaga es un nematodo. En una realización particular, el nematodo es un microgusano. Preferentemente, el microgusano es *Panagrellus redivivus*.

En otra realización, la plaga de insectos es una avispa. En una realización particular, la avispa es *Vespula vulgaris*.

En otra realización, la plaga de insecto es el escarabajo de Manuka (*Pyronota* sp.).

Definiciones

El término "insecticida", como se usa en el presente documento, se refiere a agentes que actúan para matar o controlar el crecimiento de insectos.

Los términos "poner en contacto", como se usa en el presente documento, se refiere a la provisión de una composición o cepa(s) de la invención a una plaga de una manera útil para efectuar el control de una plaga. La puesta en contacto implicará de manera más común la alimentación de la plaga en un material que comprende una composición o cepa(s) de la invención, pero no está limitada a las mismas. En consecuencia, "poner en contacto" incluye alimentar.

Los términos "control", "controlar", "biocontrol" o "control biológico" se usan de manera indistinta en el presente documento para hacer referencia a la reducción en los números de plagas, particularmente, plagas de insectos, realizada usando las cepas o composiciones de la invención. Generalmente, se entiende la reducción en números, o la erradicación de plagas, o la inhibición de su tasa de reproducción.

Los términos "que comprende" como se usa en esta memoria descriptiva significa "que consiste al menos en parte de". Al interpretar cada declaración en esta memoria descriptiva que incluye los términos "que comprende", pueden estar presentes otros rasgos distintos de los que preceden al término. Los términos relacionados tales como "que comprende" y "comprende", y los términos "que incluye", "incluyen" e "incluye" se deben interpretar de la misma manera.

El término "que consiste esencialmente en" cuando se usa en esta memoria descriptiva se refiere a los rasgos establecidos y permite la presencia de otras características básicas de los rasgos especificados.

Los términos "soporte agrícola aceptable" cubre todos los soportes líquidos y sólidos conocidos en la técnica tales como agua y aceites, así como adyuvantes, dispersantes, aglutinantes, agentes humectantes, tensioactivos, agentes de pegajosidad humectantes, y similares que se conocen normalmente para su uso en la preparación de composiciones de control, incluyendo composiciones de insecticidas.

Los términos "cantidad eficaz" como se usa en el presente documento significa una cantidad eficaz para controlar o erradicar plagas, particularmente, plagas de insectos.

Los términos "cultivo biológicamente puro" o "aislado biológicamente puro" como se usa en el presente documento se refiere a una cepa de *B. laterosporus* de la invención que comprende al menos el 90 %, preferentemente, el 95 %, preferentemente, el 99 % y, más preferentemente, al menos el 99,5 % de células de la cepa de *B. laterosporus*.

El término "plaga" como se usa en el presente documento se refiere a organismos que son convenientes para los seres humanos. En una realización, el término se refiere a organismos que causan daño a los animales, incluyendo seres humanos o plantas. El daño puede referirse a la salud, crecimiento, rendimiento, reproducción o viabilidad de la planta o animal y puede ser un daño cosmético. Preferentemente, el daño es de importancia comercial. En una realización preferida, el término "plaga" se refiere a organismos que causan daño a las plantas. Preferentemente, las plantas son plantas cultivadas.

Descripción detallada de la invención

En un aspecto, la presente invención está dirigida a cepas de *Brevibacillus laterosporus* con actividad contra plagas, que incluyen plagas de insectos y particularmente Lepidoptera y Diptera.

Brevibacillus laterosporus es una espora aeróbica formadora de bacterias entomopatógenas, que se conoce por ser patógena a algunas especies de insectos. Como *Bacillus thuringiensis*, *B. laterosporus* se caracteriza por la formulación de un cuerpo paraspórico típico en forma de canoa (CSPB por sus siglas en inglés) creado en un lado de la espora después de la lisis del esporangio.

Brevibacillus laterosporus se ha registrado como un patógeno de los huevos y larvas de nematodos parásitos objetivo (Bone y Singer, 1991; Huang *et al.*, 2005; Singer, 1996), moluscos, género Coleoptera (Boets *et al.*, 2004; Schnepf *et al.*, 2003; Singer, 1996; Singer *et al.*, 1997), Diptera (Favret y Yousten, 1985; Rivers *et al.*, 1991), y *Anticarsia gemmatilis* lepidóptera (De Oliveira *et al.*, 2004). Se han registrado diferentes factores de virulencia entre las diferentes cepas de *B. laterosporus* (Favret y Yousten, 1985; Rivers *et al.*, 1991; Zahner *et al.*, 1999).

La asociación de la actividad tóxica de *B. laterosporus* con sus esporas y cristales se demostró por primera vez por Orlova *et al.* (1998) en bioensayos contra larvas de especies de dípteros, incluido el mosquito de la fiebre amarilla *Aedes aegypti*. Este mosquito sirve como vector para la fiebre amarilla y otras enfermedades como la fiebre del dengue y el Chikungunya. Se ha informado también la actividad contra las larvas de las moscas negras (*Simulium vittatum*); mosquitos (*Culex quinquefasciatus* y *Aedes aegypti*) (Favret y Yousten, 1985; Rivers *et al.*, 1991); y moscas domésticas (*Musca domestica* (Ruii *et al.* 2006)), documento EP2.079.314.

La actividad de *B. laterosporus* contra las especies de Coleoptera se informó por primera vez en bioensayos preliminares. Las especies incluían el escarabajo del tabaco *Lasioderma serricorne* y el escarabajo de Colorado *Leptinotarsa decemlineata* (Rivers *et al.*, 1991). La actividad contra el gusano de la raíz del maíz, *Diabrotica* spp. se ha informado para diferentes cepas de *B. laterosporus* (Aronson *et al.*, 1991; Schnepf *et al.*, 2002; Boets *et al.*, 2011). El gusano de la raíz del maíz es una plaga agrícola importante de los cultivos de maíz.

De Oliveira *et al.* (2004) informaron una toxicidad elevada contra el gorgojo del algodón mexicano *Anthonomus grandis*, una plaga asociada con el daño del grano. La actividad lepidóptera contra la oruga del frijol terciopelo *Anticarsia gemmatilis* se informó en el mismo estudio.

Sin embargo, hasta la fecha no hay informes que analicen la actividad de las cepas contra Diptera y Lepidoptera. Rivers *et al.* (1991) cribaron 28 cepas contra la oruga, el mosquito y el género Coleoptera (escarabajos de la patata) y no encontraron actividad contra la oruga, pero sí actividad contra los otros dos grupos. Favret y Yousten (1985) también encontraron actividad de mosquitos, pero no actividad lepidóptera.

Sorprendentemente, los solicitantes han identificado ahora cepas de *Brevibacillus laterosporus* con actividad contra una variedad de plagas de insectos que incluyen algunas Lepidoptera y Diptera. En particular, tres cepas de la bacteria, *Brevibacillus laterosporus*, se han aislado de la semilla de brassica y del suelo en Nueva Zelanda. Los ensayos de cribado mostraron actividad de las tres cepas contra las larvas de la polilla dorso de diamante, *Plutella xyostella* y las larvas de mosquito (*Culex pervigilans* y *Opifex fuscus*).

Estas tres nuevas cepas de *Brevibacillus laterosporus* se han depositado en los laboratorios del Instituto Nacional de Medición (National Measurement Institute, NMI), Suakin Street, Pymble, Nueva Gales del Sur, Australia el 12 de septiembre de 2012 de acuerdo con el Tratado de Budapest para los fines del procedimiento de patente. A los aislados se les han otorgado los números de depósito de NMI n.º V12/001946, NMI n.º V12/001945 y NMI n.º V12/001944 respectivamente.

Los detalles de los procesos de aislamiento y selección empleados para obtener los aislados se exponen en los ejemplos. En el ejemplo 3 se proporcionan características morfológicas y fisiológicas de la *B. laterosporus* de la invención.

Los solicitantes han sido los primeros en proporcionar las cepas NMI n.º V12/001946, NMI n.º V12/001945 y NMI n.º V12/001944 de *B. laterosporus* en forma aislada.

Por consiguiente, en un aspecto, la invención proporciona NMI n.º V12/001946 de *B. laterosporus*.

En otro aspecto, la invención proporciona NMI n.º V12/001945 de *B. laterosporus*.

En otro aspecto, la invención proporciona NMI n.º V12/001944 de *B. laterosporus*.

En una realización, las cepas de *B. laterosporus* de la invención están aisladas. Preferentemente, las cepas se proporcionan en la forma de un cultivo biológicamente puro.

Las cepas de la invención han demostrado actividad insecticida contra una variedad de plagas de insectos que incluyen los géneros Lepidoptera y Diptera. Las tres cepas son las primeras que se proporcionan que muestran esta actividad. Más particularmente, las cepas son todas activas contra la polilla dorso de diamante y los mosquitos.

- La actividad insecticida se ha mostrado también para la cepa NMI n.º V12/001946 contra una variedad de otras plagas de insectos que incluyen: la carpocapsa (*Cydia pomonella*), la oruga de las cápsulas del algodón (*Helicoverpa armigera*), la polilla enrolladora de la lira negra (*Cnepasia jactatana*), la polilla enrolladora de patas negras (*Planotortrix notophaea*), la polilla marrón claro del manzano (*Epiphyas postvittana*), el escarabajo de Manuka (*Pyronota spp*) y la avispa (*Vespula vulgaris*).
- Se ha demostrado también la actividad para las cepas NMI n.º V12/001944 y V12/001945 contra el gusano gris de la col (*Trichoplusia ni*).
- La cepa NMI n.º V12/001944 también es activa contra la carpocapsa (*Cydia pomonella*).
- Las cepas NMI n.º V12/001944 y NMI n.º V12/001946 han demostrado también actividad contra el nematodo microgusano (*Panagrellus redivivus*).
- Las cepas de la invención pueden tener aplicación particular contra las familias Lepidoptera Tortricidae y Lepidoptera Plutellidae. También se ha demostrado alguna actividad contra Lepidoptera Noctuidae.
- Las plagas de insectos mencionadas anteriormente son particularmente problemáticas y causan una variedad de problemas para las plantas y la salud animal. Las especies de polillas, en particular, son responsables de pérdidas económicas significativas en cultivos agrícolas y hortícolas. Por ejemplo, actualmente, se gastan más de US\$ 1.000 millones al año en el control en todo el mundo de la polilla dorso de diamante (DBM).
- El control del mosquito actualmente cuesta más de US\$ 400 millones al año.
- En una realización, la cepa aislada de *Brevibacillus laterosporus* de la invención tiene actividad insecticida contra al menos una especie de Lepidoptera y al menos una especie de Diptera.
- En una realización la especie de Lepidoptera procede de una familia seleccionada de Tortricidae, Plutellidae, Nocuidae y Geometridae.
- Las especies preferidas de Tortricidae incluyen: la carpocapsa (*Cydia pomonella*), la polilla marrón claro del manzano (*Epiphyas postvittana*), la polilla enrolladora de patas negras (*Planotortrix notophaea*) y la polilla enrolladora de la lira negra (*Cnepasia jactatana*).
- Una especie preferida de Plutellidae es la polilla dorso de diamante (*Plutella xyostella*).
- Unas especies preferidas de Nocuidae incluyen el gusano gris de la col (*Trichoplusia ni*) y la oruga de las cápsulas del algodón (*Helicoverpa armigera*).
- Una especie preferida de Geometridae es la polilla común del bosque (*Pseudocoremia suavis*)
- En una realización, la especie de Diptera procede de una familia seleccionada de Culcidae.
- Las especies preferidas de Culcidae incluyen *Opifex fuscus* y *Culex pervigilans*.
- La presente invención proporciona también una composición que comprende al menos una cepa de *B. laterosporus* de la invención, y un soporte agrícolamente aceptable.
- En una realización, la invención proporciona una composición que comprende al menos una cepa de *B. laterosporus* seleccionada de:
- (a) *B. laterosporus* NMI n.º NMI n.º V12/001946
 - (b) *B. laterosporus* NMI n.º NMI n.º V12/001945
 - (c) *B. laterosporus* NMI n.º NMI n.º V12/001944
- y un soporte o adyuvante agrícolamente aceptable.
- La composición puede incluir combinaciones de dos o más cepas de la *B. laterosporus* de la invención. Es decir, (a) y (b), (a) y (c) o (b) y (c). En una realización, la composición puede comprender las tres cepas de la invención.
- La(s) cepa(s) de la invención está(n) presente(s) en la composición en una cantidad eficaz para controlar la plaga de interés. La concentración eficaz puede variar dependiendo de la forma en la que se usa la *B. laterosporus* en el entorno en el que se va a aplicar la composición, el tipo, la concentración y el grado de infestación de la plaga; la temperatura; el período; la humedad; la etapa en el período de cultivo de la planta; la edad de la planta; el método, el ritmo y frecuencia de aplicación; el número y tipo de fungicidas convencionales, los pesticidas y similares que se están aplicando y los tratamientos para las plantas (por ejemplo, poda, pastoreo e irrigación). Todos los factores se pueden tener en cuenta en la formulación de la composición.

Las composiciones de la invención se pueden preparar mezclando una o más toxinas productoras de las cepas de *B. laterosporus* de la invención con un soporte agrícola deseado.

Típicamente, el producto contendrá material fermentado de *B. laterosporus* sin separación de esporas y cristales, formulado para la pulverización. Se puede usar material fermentado que tenga más de dos días, típicamente cuatro días. La *B. laterosporus* en las composiciones se pueden formular como suspensiones celulares, con un soporte agrícola deseado. Las células producen la toxina insecticida directamente o a través de esporas o cristales.

Los intervalos de concentración típicos para la *B. laterosporus*, cuando está presente en la composición en forma de células intactas, es de 1×10^3 a 1×10^{14} , preferentemente, de 1×10^4 a 1×10^{10} , más preferentemente, de 1×10^6 a 1×10^8 células/mg. Se apreciará que las composiciones con concentrados celulares del orden de 1×10^{11} to 1×10^{14} pueden prepararse y diluirse antes de la aplicación si se requiere.

B. laterosporus puede prepararse para el uso en las composiciones usando técnicas estándar de secado y fermentación conocidas en la técnica. El crecimiento se efectúa normalmente en condiciones aeróbicas en un biorreactor a temperaturas y pH adecuados para el crecimiento. Las temperaturas de crecimiento típicas son de 15 a 37 °C, normalmente, 27 °C a 32 °C.

El medio de cultivo puede ser cualquier medio de la técnica conocido adecuado para el cultivo de *B. laterosporus*. Por ejemplo, medio caldo nutriente, extracto de levadura y sales (Nutrient Yeast Extract Salt Medium, NYSM) (Favret y Youstein 1985).

Las cepas pueden recogerse usando técnicas convencionales de lavado, filtrado o sedimentación, tales como centrifugación o pueden recogerse usando un sistema ciclónico. Las células recogidas pueden usarse inmediatamente o almacenarse en condiciones de refrigeración (por ejemplo, 4 °C) o pueden liofilizarse. Preferentemente, las células deberían usarse pronto después de la recogida.

Las células de *B. laterosporus* pueden también procesarse antes de usarse para producir extractos celulares activos, suspensiones celulares, homogeneizados celulares, lisados celulares, sobrenadantes celulares, filtrados celulares, sedimentos celulares o pueden usarse como preparaciones celulares completas.

Las composiciones de la invención pueden incluir humectantes, esparcidores, apelmazantes, estabilizantes, penetrantes, emulsionantes, dispersantes, tensioactivos, tampones, aglutinantes y otros componentes típicamente empleados en las composiciones insecticidas o de control conocidas en la técnica.

La composición de la invención puede estar en forma líquida o sólida, las composiciones líquidas incluyen típicamente agua, solución salina o aceites, tales como aceites vegetales o minerales. Ejemplos de aceites vegetales útiles en la invención, son aceite de soja y aceite de coco.

Las composiciones pueden estar en forma de pulverizaciones, suspensiones, concentrados, espumas, caldos, suspensiones espesas, inyecciones, geles, baños, pastas y similares.

Las composiciones líquidas pueden prepararse mezclando el soporte líquido agrícolamente aceptable con células de *B. laterosporus*. Las técnicas de formulación convencionales pueden usarse para producir composiciones líquidas.

En una realización la composición está en forma sólida. La composición puede producirse secando la composición líquida de la invención. Como alternativa, una composición sólida útil en la invención puede prepararse mezclando las células de *B. laterosporus* de la invención con una variedad de materiales inorgánicos o biológicos. Por ejemplo, los soportes agrícolas sólidos inorgánicos pueden incluir carbonatos, sulfatos, fosfatos o silicatos, piedra pómez, cal, bentonita o mezclas de los mismos. Los materiales biológicos sólidos pueden incluir cáscaras de palma en polvo, cascarillas de mazorcas y cáscaras de nueces.

La composición se puede formular como polvos, gránulos, revestimientos de semillas, polvos humectables o similares. Las composiciones se pueden formular antes de la aplicación para proporcionar composiciones líquidas.

Las composiciones de la invención pueden estar en forma de formulaciones de liberación controlada o de liberación sostenida.

Las composiciones de la invención pueden incluir también otros agentes de control tales como pesticidas, insecticidas, fungicidas, nematocidas, virucidas, promotores del crecimiento, nutrientes, promotores de la germinación y similares, siempre que sean compatibles con la función de las cepas de *B. laterosporus* de la invención.

Cuando la(s) cepa(s) de la invención se usa(n) directamente, se aplican las mismas combinaciones de las cepas, criterios de preparación y de aplicación mencionados anteriormente.

En otro aspecto, la invención también proporciona un método para controlar las plagas, comprendiendo el método poner en contacto la plaga con una composición de la invención.

5 En otra realización, la invención proporciona un método para controlar plagas, comprendiendo el método poner en contacto la plaga con una o más cepa(s) de *B. laterosporus* de la invención.

En una realización, la plaga controlada por el método de la invención se selecciona de un insecto y un nematodo.

10 Los nematodos preferidos incluyen microgusanos. Un microgusano preferido es *Panagrellus redivivus*. En una realización, la plaga es un insecto.

En una realización, el insecto procede de una orden seleccionada de Lepidoptera, Diptera, Hymenoptera y Coleoptera.

15 En una realización la especie de Lepidoptera procede de una familia seleccionada de Tortricidae, Plutellidae, Nocuidae y Geometridae.

20 Las especies preferidas de Tortricidae incluyen: la carpocapsa (*Cydia pomonella*), la polilla marrón claro del manzano (*Epiphyas postvittana*), la polilla enrolladora de patas negras (*Planotortrix notophaea*) y la polilla enrolladora de la lira negra (*Cnepasia jactatana*).

Una especie preferida de Plutellidae es la polilla dorso de diamante (*Plutella xyostella*).

25 Especies preferidas de Nocuidae incluyen el gusano gris de la col (*Trichoplusia ni*) y la oruga de las cápsulas del algodón (*Helicoverpa armigera*).

Una especie preferida de Geometridae es la polilla común del bosque (*Pseudocoremia suavis*)

30 En una realización, la especie de Diptera procede de una familia seleccionada de Culcidae.

Las especies preferidas de Culcidae incluyen *Opifex fuscus* y *Culex pervigilans*.

En una realización, la especie de Hymenoptera se selecciona de la familia Vespidae.

35 Una especie preferida, la especie de Vespidae es la avispa *Vespula vulgaris*.
En una realización, la especie de Coleoptera se selecciona de la familia Scarabaeidae.

40 Una especie preferida de Scarabaeidae es el escarabajo de Manuka (*Pyronta sp.* Una especie preferida de *Pyronta* es *Pyronta festiva*.

En una realización, una composición o cepa(s) de la invención se aplica directamente a la plaga. Por ejemplo, mediante pulverización, inmersión, espolvoreado o similares.

45 En otra realización, una composición o cepa(s) de la invención se aplica directamente al entorno de la plaga, típicamente sobre plantas o animales que se deben proteger, equipo, suelo o aire. La pulverización, espolvoreado, remojo del suelo, revestimiento de semillas, pulverización foliar, rociado, aerosolización y fumigación son técnicas de aplicación posibles.

50 En una realización, la composición o cepa(s) de la invención se aplica a una planta o animal, típicamente sobre una superficie o parte en la que se alimenta una plaga.

55 Las aplicaciones pueden ser una sola vez o repetirse según se requiera. La aplicación en distintos momentos en los ciclos de vida de las plantas, también se contempla. Por ejemplo, en la cosecha para prevenir o minimizar ataques de las plagas después de la cosecha.

Más habitualmente, la composición o cepa(s) de la invención se aplica a una planta como plántula y en intervalos en índices de aplicación de 10^{10} esporas/hectáreas hasta 10^{14} esporas, preferentemente, 10^{12} a 10^{13} esporas por hectárea.

60 Los índices de aplicación típicos pueden ser 50 g/hectárea hasta 10.000 g/hectárea. Normalmente, de 100 g/hectárea a 5.000 g/hectárea, o 500 a 1500 g/hectárea.

65 Una amplia gama de plantas puede tratarse usando las composiciones de la invención. Tales plantas incluyen cultivos de cereales, vegetales y herbáceos, hierbas, césped, pastos, árboles frutales y árboles y plantas ornamentales.

Los cultivos arables que pueden beneficiarse particularmente del uso de las composiciones y cepa(s) de la invención incluyen crucíferas y brassicas. Por ejemplo, col, brécol, coliflor, coles de Bruselas y col china.

5 Cuando se formula para la aplicación, la composición de la invención, normalmente, estará presente en una concentración de 1 a 99 % en peso, del 5 al 95 %, del 10 al 90 %, del 15 al 85 %, del 20 al 80 %, del 30 al 70 % o del 40 al 60 % en peso.

Breve descripción de los dibujos

10 A continuación, se describirá la invención con referencia a las figuras en los dibujos adjuntos, en los que:

La figura 1 muestra una representación esquemática de un bioensayo usado en el estudio de gama de hospedadores.

15 La figura 2 muestra una representación esquemática del ensayo de la polilla marrón claro del manzano.

La figura 3 muestra series de gráficos que muestran la actividad comparativa de las cepas NMI n.º V12/0001946, NMI n.º V12/0001945 y NMI n.º V12/0001944 de *B. laterosporus*; y una cepa NCIMB41419 italiana de *B. laterosporus* y una *Erwinia* sp. (ICMP) contra las larvas de la polilla dorso de diamante (*Plutella xylostella*) (n=10, 22 °C).

La figura 4 muestra un gráfico de barras que muestra la actividad de la cepa NMI n.º V12/001946 de *B. laterosporus* contra los mosquitos *Culex pervigilans* y *Opifex fuscus*. Los tratamientos fueron aislados NMI n.º V12/001946 = 500 µl en 10 ml, NMI n.º V12/001946 = 50 µl en 10 ml y NMI n.º V12/001946 (1821-2) = 5 µl en 10 ml (500 ppm).

La figura 5 muestra un gráfico de barras que muestra el porcentaje de mortalidad del mosquito *Culex pervigilans* inoculado con 20 µl de suspensión bacteriana NMI n.º V12/001946, NMI n.º V12/001945 y NMI n.º V12/001944, ICMP o NCIMB41419 en 1 ml de agua por cada larva de mosquito. Se trataron individualmente 12 larvas por cada dilución.

La figura 6 muestra un gráfico que muestra el efecto de NMI n.º V12/001944 y V12/001945 sobre Bt, el gusano gris de la col *Trichoplusia ni* resistente a CryIA (figura 8A) y susceptible (figura 8B).

35 La figura 7 muestra un gráfico que muestra la comparación entre larvas del estadio 2º de *Plutella xylostella* (DBM) resistentes a Cry 1A y susceptibles a CryIA con soluciones débiles de V12/001944.

La figura 8 muestra un gráfico que muestra el efecto de NMI n.º V12/001944 sobre larvas de carpocapsa.

40 La figura 9 muestra un gráfico de barras que muestra la supervivencia de microgusanos (*Panagrellus redivivus*) tratados con V12/001946 y V12/001944. La puntuación es una escala de 5 para el número de vivos.

La figura 10 muestra un alineamiento de secuencia múltiple de las secuencias de ADNr 16s usadas para identificar cada una de las cepas NMI n.º V12/001944, V12/001945 y V12/001946, y la cepa italiana NCIMB41419. Un guion (-) indica el mismo nucleótido que el que se encuentra directamente arriba en la secuencia anterior.

Ejemplos

50 Ejemplo 1 - Proceso para la selección de *Brevibacillus laterosporus*

Como parte de una investigación sobre nuevos agentes de biocontrol de plagas y enfermedades que afectan a las brassicas, se aislaron microbios de 36 lotes de semillas de 8 tipos de plantas del género Brassica, los vegetales brécol, col, colirrábano y col china, y las plantas forrajeras como la col rizada, nabo de hoja, colza y colinabo.

Un total de 811 microbios se aislaron en medios microbiológicos estándar y se cultivaron puros. Consistieron en:

- 584 aislados de bacterias
- 227 aislados de hongos

La mayoría de los microbios surgieron de las semillas no esterilizadas (84 %). Las especies formadoras de bacilos constituyeron el 74 % de todos los aislados bacterianos recuperados, pero solo 2 aislados pertenecieron al género *Brevibacillus*.

65 La bioactividad de 21 microbios (17 aislados bacterianos y 4 hongos) se evaluó contra las larvas de la polilla dorso de diamante, *Plutella xylostella*, usando el ensayo de hojas separadas. 2 especies bacterianas adicionales y 6

hongos de la colección de cultivos de la Universidad de Lincoln se cribaron también por su actividad contra *P. xylostella*. Las superficies de las hojas se contaminaron con soluciones bacterianas y fúngicas y se controló la alimentación y la mortalidad de las larvas. En este cribado, se identificó un aislado de *B. laterosporus*. Se encontró un aislado adicional de la misma especie entre los aislados restantes y se cribaron también contra *P. xylostella*, y mostraron actividad.

Se obtuvo un aislado adicional de *B. laterosporus* de un estolón de patata esterilizado en la superficie, a partir de un programa no relacionado. También mostró actividad contra las larvas de DBM en los ensayos de hojas. Estas cepas se sometieron a bioensayos adicionales y se confirmó la identificación.

Ejemplo 2 - Aislamiento de *Brevibacillus laterosporus*

Las tres cepas de *B. laterosporus* se aislaron de plantas o semillas de Nueva Zelanda. Las colonias que se formaron en las placas de aislamiento de agar nutritivo se seleccionaron usando un bucle estéril y se repartieron en nuevas placas para proporcionar un cultivo puro.

NMI n.º V12/001946 se aisló de semillas de repollo híbridas obtenidas de South Pacific Seeds (NZ) Ltd.

NMI n.º V12/001945 se aisló de semillas de colza forrajeras obtenidas de PGG Wrightson Seeds Ltd, Nueva Zelanda.

NMI n.º V12/001944 se aisló de una planta de patata (cv Iam Hardy de granja comercial cerca de Southbridge, Nueva Zelanda).

Protocolos de aislamiento

Para la semilla de brassica, se aislaron las bacterias de la superficie no estéril de semillas en agar nutritivo. Las colonias individuales se cultivaron después puras.

Para la planta de patata, se trató con calor el estolón (80 °C durante 20 min) después se esterilizó la superficie (5 min en una solución de hipoclorito de sodio al 2 %) y se maceró el tejido y se esparció en agar nutritivo.

Ejemplo 3 - Identificación morfológica y fisiológica

Todos los aislados de *B. laterosporus* se identificaron usando microscopía óptica para examinar las características de *Brevibacillus*.

Caracterización bioquímica usando API 50CH (BioMérieux).

Se identificaron adicionalmente las cepas NMI n.º V12/001946 y NMI n.º V12/001945 usando el kit de utilización en sustrato API 50CH (bioMérieux) disponible en el comercio siguiendo las instrucciones del fabricante. Se inoculó cada una con bacterias en medio API 50 CHB/E siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las comprobaciones de identidad de bioMérieux mostraron una identidad del 99,9 % con *B. laterosporus* en su base de datos.

Características morfológicas

Brevibacillus laterosporus son bacterias aerobias, grampositivas, formadoras de endósporas que pueden también ser anaerobias facultativas (Shida et al., 1996).

Las tres NMI n.º V12/001946, V12/001945 y V12/001944 de *B. laterosporus* tienen las siguientes características morfológicas, que son típicas de las especies: Las tres cepas crecen inicialmente como células vegetativas, después forman esporangios que contienen un cuerpo parasporal (CSPB) y esporas adyacentes.

Características de crecimiento

Aerobias, anaerobias facultativas; Las colonias en agar son blanco amarillento, colonias de bordes irregulares.

Identificación de ADNr 16s

La región de ADNr 16s se obtuvo de secuencias del genoma de cada una de las 4 cepas de *B. laterosporus*. El ADN genómico se secuenció por New Zealand Genomics Ltd, Dunedin, Nueva Zelanda. Se buscaron los cóntigos usando otra secuencia de ADNr 16s de *B. laterosporus* y el gen de ADNr 16s completo se extrajo y se alineó usando los programas Geneious (<http://www.geneious.com/>) y DNAMAN (Lynnon Biosoft, Canada).

La SEQ ID NO. 1 se usó para caracterizar NMI V12/001946; SEQ ID NO. 2 para caracterizar NMI V12/001945; SEQ ID NO. 3 para caracterizar NMI V12/001944 y SEQ ID NO. 4. para caracterizar NCIMB41419. NCIMB41419,

identificada en el documento EP 2.079.314, es una cepa de *B. laterosporus* obtenida de NCIMB Ltd, Ferguson Building, Craibstone Estate, Bucksburn, Aberdeen, AB21 9YA, Escocia.

En la figura 10, se muestra un alineamiento de las secuencias SEQ ID NO: 1 a 4, y muestra diferencias entre cada secuencia, características de cada cepa.

Ejemplo 4 - Procedimientos de bioensayos

La polilla dorso de diamante (*Plutella xylostella*) (Lepidoptera: Plutellidae), la blanquita de la col *Pieris rapae* (Lepidoptera: Pieridae) y el gusano gris de la col (*Trichoplusia ni*) (Lepidoptera: Noctuidae)

Las larvas de la polilla dorso de diamante se criaron en brassica (plantas de repollo) en Lincoln, o las cepas resistentes a CryIA y CryIC y una cepa susceptible (G88) se obtuvieron y evaluaron en la Estación Experimental Agrícola del Estado de Nueva York, Facultad de Agricultura y Ciencias de la vida en la Universidad Cornell, situada en Geneva, NY, USA. Las larvas de la blanquita de la col se recolectaron en el campo de la granja en la Universidad de Lincoln, Nueva Zelanda.

Diez larvas del estadio 2°-3° se usaron y colocaron en un disco de 3 cm de hoja de col tratada bien con 20 µl de solución de cepas que contenían bacterias (NMI n.º: V12/00944, V12/001945 o V12/001946) o bien se sumergieron en la solución. Una cepa italiana de *B. laterosporus*, NCIMB41419, y un cultivo de otro género bacteriano, *Erwinia* (ICMP) se usaron también como comparaciones contra las larvas de DBM. Se usó un agente humectante, Siliwet L-77 (Momentive Performance Materials, Nueva York, EE. UU.) o Triton X-100 (Rohm y Hass Co, Philadelphia, EE. UU.) a <0,05 %. Cada tratamiento se replicó 3-5 veces (3-50 larvas por tratamiento). Las larvas tratadas permanecieron en la hoja de col a 23 °C 16L:8hO (Lincoln) o a 27 °C 16hL:8hO (EE. UU.) y se comprobaron diariamente las muertes.

Trichoplusia ni susceptibles y resistentes a CryIA se obtuvieron también y evaluaron en la Estación Experimental Agrícola del Estado de Nueva York, Facultad de Agricultura y Ciencias de la vida en la Universidad Cornell, situada en Geneva, NY, USA. Las larvas del estadio 2°- 3° se inocularon y mantuvieron como para DBM, excepto que solo se usaron 5 larvas por réplica (un total de 25 larvas por tratamiento). Se mantuvieron las larvas a 27 °C 16hL:8hO después del tratamiento.

Bioensayo de Carpocapsa (*Cydia pomonella*) (Lepidoptera: Tortricidae)

El bioensayo se realizó usando las larvas de carpocapsa de huevos proporcionados por el Centro de Investigación de Plantas y Alimentos (Plant and Food Research Center), (PFR), Auckland, Nueva Zelanda. PFR suministró también la dieta artificial usada para la cría de los insectos.

Se realizaron ensayos preliminares y confirmatorios para evaluar la reacción del insecto a NMI n.º V12/001946, Cada bioensayo tuvo dos tratamientos que consistían en a) una dieta tratada con NMI n.º V12/001946 o V12/001944 de fuerza máxima (material del matraz de agitación de 4 días cultivado en NYSM a 30 °C usado sin diluir, con 0,025 % de contacto usado como agente humectante) y b) dieta no tratada como control. En la preparación preliminar, se replicó cada tratamiento 10 veces con 1 tubo representando una réplica. Para el ensayo confirmatorio, cada tratamiento tuvo 30 réplicas o 1 tubo como réplica. Para la dieta tratada, 10 µl de NMI n.º V12/001946 se esparcieron sobre la superficie y se dejaron secar al aire durante 10 min. Dos larvas del estadio 2° se introdujeron en cada tubo y los tubos se cubrieron con parafilm.

Todos los tubos se colocaron en una gradilla y se pusieron en la incubadora a 25 °C y un fotoperíodo de 16:8 (luz:oscuridad). La mortalidad de las larvas se observó a diario con los datos iniciales recogidos 1 día después de la inoculación.

Bioensayo de Mosca doméstica (*Musca domestica*) (Diptera: Muscidae)

El ensayo de bioensayo se realizó usando las larvas (gusanos) y crisálidas adquiridas de Biosuppliers Insects, una compañía que suministra insectos vivos (www[punto]biosuppliers[punto]com) con sede en Auckland, Nueva Zelanda. La dieta artificial por Ruiu et al. 2006 se usó en la preparación.

La reacción de NMI n.º V12/001946 contra los gusanos y las crisálidas se observó en dos tratamientos, a) una dieta tratada con NMI n.º V12/001946 de longitud completa y b) una dieta no tratada como control. En la preparación preliminar usando gusanos cada tratamiento tenía tres tazas *pottel* (Huhtamaki Co., Henderson, Auckland, Nueva Zelanda) con 10 ml de la dieta. Para la dieta tratada, 200 µl de NMI n.º V12/001946 de fuerza máxima se mezclaron completamente con la dieta antes de la introducción de seis gusanos. En la preparación usando crisálidas, cada tratamiento tuvo un *pottel* con cinco crisálidas colocadas en cada taza.

La preparación se colocó en la incubadora a 21 °C y un fotoperíodo de 16:8 (luz:oscuridad). Se realizó la observación diaria de la preparación.

Bioensayo en la polilla común del bosque (*Pseudocoremia suavis*) (Lepidoptera: Geometridae)

Los huevos de la polilla común del bosque se suministraron por PFR. Los huevos se dejaron incubar en una de las salas de Temperatura Controlada (TC) en el Centro de Bioprotección, Lincoln, Nueva Zelanda a 20 °C y un fotoperíodo de 16:8 (luz:oscuridad). Las larvas emergentes se incubaron después en brotes de pino radiata separados cultivados en la Universidad de Lincoln, Lincoln, Nueva Zelanda. Los brotes se lavaron completamente, se sacudieron y se secaron en un recipiente de plástico forrado con toallita de papel húmeda. El recipiente se cubrió con tapaderas de malla para permitir la aireación. Las hojas de pino fresco se suministraron a diario hasta que las larvas alcanzaron el estadio 3° para el bioensayo.

Se hicieron dos bioensayos usando el método de inmersión de las hojas. Cada bioensayo tuvo dos tratamientos de la siguiente manera: a) hojas de pino radiata sumergidas en bacterias con 0,01 % Triton X 100 (agente humectante, Rohm y Haas Co. Philadelphia, EE. UU.) y b) el control, hojas sumergidas en agua destilada estéril con 0,01 % Triton X-100. Cada tratamiento tiene 2 muestras de hojas que representan 2 réplicas. En el 1^{er} bioensayo, Se usó dilución bacteriana 10⁻¹ mientras que el 2° ensayo utilizó la fuerza máxima. Se dejaron secar al aire las hojas antes de que se introdujeran 5 larvas en las hojas. La preparación se colocó en la sala de TC a 20 °C y un fotoperíodo de 16:8 (luz:oscuridad).

Bioensayo del gusano del césped [*Costelytra zealandica*] (Coleoptera: Scarabaeidae)

Las larvas del gusano del césped se recolectaron en el campo cercano. Antes del bioensayo, se prealimentaron las larvas con cubos de zanahorias en placas de cultivo tisular de 12 pocillos. La realimentación con cubos de zanahoria fresca se hizo según la necesidad. Después de 2 días, todas las larvas que comían activamente se seleccionaron para el bioensayo.

El bioensayo tuvo dos tratamientos, a saber, cubos de zanahoria tratados con NMI n.º V12/001946 y cubos de zanahoria sin tratar de control. Para los cubos de zanahoria tratados con NMI n.º V12/001946, cada cubo se pasó sobre NMI n.º V12/001946 cultivada en agar nutritivo durante 2 días. Se asignaron doce pocillos por tratamiento con 1 larva por pocillo. Las placas se colocaron en una bandeja forrada con toallita de papel húmeda y cerrada con una bolsa de plástico para aumentar la humedad de los cubos de zanahoria. Se colocó la bandeja en la incubadora a 21 °C y un fotoperíodo de 16:8 (luz:oscuridad). Se realizó observación diaria.

Bioensayo de escarabajo de Manuka (*Pyronota* spp.) (Coleoptera: Scarabaeidae)

Se realizaron dos bioensayos con larvas de escarabajo de Manuka, bioensayo de cubos de zanahorias y bioensayo de suelo. Las larvas del escarabajo de Manuka se proporcionaron por Landcare Farming Ltd, Westport, Nueva Zelanda.

Para el bioensayo de cubos de zanahorias, se siguieron las mismas etapas que en los gusanos del césped. En el bioensayo de suelo, se prealimentaron las larvas con cubos de zanahoria durante 2 días en placas de cultivo tisular de 12 pocillos. Las larvas que comían activamente se seleccionaron para el bioensayo. Diez gramos de suelo esterilizado se colocaron en una botella universal. Se pipetearon dos ml de agua destilada estéril en el suelo y se mezclaron bien. El suelo tratado tuvo 500 ml de NMI n.º V12/001946 de fuerza máxima mezclados completamente con el suelo. El control solo tuvo 2 ml de agua destilada estéril mezclada en el suelo. Se introdujo una larva en cada botella y se alimentó con 1 cubo de zanahoria. La tapa de las botellas se cerró ligeramente y se colocó en una incubadora a 21 °C y un fotoperíodo de 16:8 (luz:oscuridad). Se realizó la observación diaria de la mortalidad de las larvas.

Bioensayo de la polilla marrón claro del manzano (LBAM) (*Epiphyas postvittana*) (Lepidoptera: Tortricidae)

El bioensayo se basó en el trabajo de Wearing et al. (2003) con modificaciones. Su método usó hojas de manzano totalmente expandidas con las larvas transferidas a hojas nuevas cada semana hasta el estadio 4°. Se colocó la hoja plana con el lado abaxial hacia abajo. Para la preparación, se utilizaron hojas de manzano joven de BHU, Universidad de Lincoln, y las larvas de LBAM de huevos suministrados amablemente por Plant & Food Research.

En el bioensayo preliminar, se realizaron modificaciones del protocolo de Wearing et al. (2003) de la siguiente manera: 1) en vez de la hoja entera, se cortó la hoja en una pulgada cuadrada (0,0006 metros cuadrados) 2) se usaron dos orientaciones de la hoja 3) las larvas no se transfirieron a hojas nuevas.

El bioensayo preliminar tuvo dos tratamientos: hojas no tratadas como control y hojas tratadas con 1821 de fuerza máxima. Una pulgada cuadrada (0,0006 metros cuadrados) de hoja se cortó de una hoja joven bien expandida. Para la muestra de hoja tratada, 40 µl de V12/001946 de fuerza máxima se esparcieron sobre la superficie y se dejaron secar al aire. Las muestras de hojas de control y tratadas se colocaron en la superficie de agar agua de 2 maneras: 1) lado abaxial (inferior) de la hoja en contacto con el agar y lado adaxial (superior) en contacto con el agar. Hubo 2 muestras de hojas por tratamiento y por orientación de la hoja. Se colocaron cinco larvas en cada muestra de hoja.

Se realizó un segundo bioensayo usando el método de hojas enteras. Los tratamientos y procedimientos fueron los mismos que en el primer bioensayo.

Bioensayo de la polilla del tomate (gusano cogollero del maíz y oruga común) (*Helicoverpa armigera*) (Lepidoptera: Noctuidae)

La reacción de V12/001946 contra el gusano cogollero del tomate se evaluó en un bioensayo usando larvas de huevos suministrados amablemente por PFR y dieta artificial basada en Singh (1983) con modificaciones. Las modificaciones fueron que los productos químicos conservantes, antibióticos y antifúngicos no se incorporaron en la dieta.

El bioensayo tuvo dos tratamientos: dieta tratada con V12/001946 de fuerza máxima y dieta no tratada como control. Se usaron seis tazas de porciones (Huhtamaki Co., Henderson, Auckland) con 5 ml de la dieta por tratamiento. En la dieta tratada, 20 µl de V12/001946 de fuerza máxima se esparcieron sobre la superficie de la dieta y se dejaron secar al aire. Se introdujeron cinco larvas por taza en las dietas tratadas y no tratadas. Se cubrió la taza con parafilm para evitar que la dieta se secara. Las tazas tratadas y no tratadas se colocaron en una incubadora a 25 °C y un fotoperíodo de 16:8 (luz:oscuridad).

Bioensayo del mosquito (*Culex pervigilans* y *Opifex fuscus*) (Diptera: Culicidae)

En bioensayo se realizó usando larvas de mosquitos (ambas especies) recogidas por la Universidad de Lincoln de una piscina en desuso (*Culex pervigilans*) en Oxford, Canterbury, Nueva Zelanda o suministradas (*Culex pervigilans* y *opifex fuscus*) por New Zealand BioSecure Entomology Laboratory Research, Lincoln, Christchurch. El ensayo tuvo siete tratamientos, a saber, NMI n.º V12/001946 de fuerza máxima (de matraz de agitación), 5 diluciones bacterianas de 10⁻², 10⁻⁴, 10⁻⁶, 10⁻⁸, 10⁻¹⁰ y larvas no tratadas como control. Cada tratamiento tuvo 12 pocillos que representaban 12 réplicas y se distribuyeron en un diseño completamente aleatorio.

Se pipetearon un ml de agua y 1 larva en cada pocillo de la placa de cultivo tisular de 12 pocillos. Para las larvas tratadas, se introdujeron 20 µl de NMI n.º V12/001946 en cada pocillo. Las placas se cubrieron con tapas y se colocaron en una incubadora a 25 °C y fotoperíodo 16:8 (luz:oscuridad). La mortalidad de las larvas como se indica por la ausencia de movimiento de las larvas cuando se agitó suavemente se evaluó a diario.

Se repitió el ensayo usando las tres cepas, NMI V12/001944, V12/001945 y V12/001946, una cepa italiana de *B. laterosporus*, NCIMB41419, y un cultivo de otro género bacteriano, *Erwina* (ICMP) se usaron también como comparaciones.

Bioensayo del gusano del ejército tropical (*Spodoptera litura*) (Lepidoptera: Noctuidae)

Las larvas usadas en el bioensayo se incubaron a partir de huevos suministrados por PFR. Un día después de la emergencia, las larvas se criaron durante la noche con la dieta artificial desarrollada para el gusano del tomate. La dieta resultó ser apropiada también para el gusano del ejército tropical como se muestra por la presencia de excrementos en la superficie de la dieta.

Hubo dos tratamientos en el bioensayo, la dieta tratada con NMI n.º V12/001946 de fuerza máxima y la dieta no tratada como control. Cada tratamiento tiene 6 tazas que representan 6 réplicas. Veinte (20) µl de la bacteria de fuerza máxima se esparcieron sobre la superficie de la dieta y se dejaron secar al aire. Se introdujeron cinco larvas en cada taza. La taza se cubrió con parafilm después de la introducción de las larvas.

La preparación se colocó en la incubadora a 25 °C y un fotoperíodo de 16:8 (luz:oscuridad). La mortalidad de las larvas se observó a diario.

Bioensayos de la polilla enrolladora de patas negras (*Planotortrix notophaea*) y la polilla enrolladora de la lira negra (*Cnephasia jactatana*) (Lepidoptera: Tortricidae)

Los insectos del ensayo y la dieta artificial para dos bioensayos se proporcionaron por PFR. Un día después de la emergencia de los huevos, las larvas se criaron durante la noche con la dieta artificial y se colocaron en la incubadora a 21 °C y un fotoperíodo de 16:8 (luz:oscuridad).

Los bioensayos tuvieron dos tratamientos, la dieta tratada con NMI n.º V12/001946 de fuerza máxima y la dieta no tratada como control. En el bioensayo que involucraba la enrolladora de patas negras, el control tuvo 15 tubos, cada tubo representando una réplica mientras que la dieta tratada tuvo 14 réplicas. Para el bioensayo de la lira negra, las dietas tratadas y no tratadas tuvieron 15 réplicas cada una. Dos larvas del estadio 2º se introdujeron en cada tubo y se cubrieron con parafilm.

Los tubos tratados y no tratados en ambos bioensayos se colocaron en incubadora a 21 °C y un fotoperíodo de 16:8 (luz:oscuridad). La mortalidad de las larvas se observó a diario bajo estereomicroscopio. La ausencia de movimiento de las larvas cuando se acaricia ligeramente con un pincel pelo de camello se considera muerta.

Bioensayo del gusano de la harina (*Tenebrio molitor*) (Coleoptera: Tenebrionidae)

5 Las larvas y la dieta del bioensayo se adquirieron de Biosuppliers Live Insects, Auckland, Nueva Zelanda. Hubo dos tratamientos, la dieta tratada con NMI n.º V12/001946 de fuerza máxima y la dieta no tratada como control. Cada tratamiento tuvo 2 réplicas con 1 recipiente como réplica.

10 Doscientos cincuenta mg de la dieta se colocaron en cada recipiente. Para la dieta tratada, 200 µl se mezclaron completamente con la dieta y se dejaron secar al aire. La misma cantidad de agua destilada estéril se mezcló con la dieta en el control. Se colocaron cinco larvas en cada recipiente y se cubrieron con tapa con un agujero perforado en el centro. Los recipientes se colocaron después en la incubadora a 25 °C y un fotoperíodo de 16:8 (luz:oscuridad).

15 Bioensayo de nematodo/microgusanos de la avena (*Panagrellus redivivus*) (Nematoda: Rhabditida)

El nematodo de vida libre se adquirió de Biosuppliers. Hubo dos bioensayos completados para evaluar la reacción de las bacterias de *B. laterosporus* contra el microgusano. Para los dos bioensayos, los microgusanos se proporcionaron en forma de pasta y se extrajeron de la pasta y se colocaron en una placa de Petri profunda con agua destilada estéril para permitir la separación de los nematodos individuales. Una punta de pipeta de un ml con la punta cortada se usó para introducir los microgusanos individuales en el agua destilada estéril.

25 Hubo tres tratamientos en el primer bioensayo: 1) microgusanos tratados con V12/001946 de longitud completa, 2) microgusanos tratados con V12/001944 de longitud completa y 3) microgusanos no tratados como control. Diez microgusanos se colocaron en cada pocillo en las placas de cultivo tisular de 12 pocillos. Un ml de agua destilada estéril se colocó en cada pocillo. Cada tratamiento tuvo 6 pocillos con réplicas que se distribuyeron en un diseño completamente aleatorio. En los microgusanos tratados, se añadieron 10 µl de bacterias por pocillo. El bioensayo se hizo a temperatura ambiente.

30 La mortalidad de los microgusanos se evaluó a diario hasta tres días después de la inoculación. La mortalidad de las larvas se observó a diario bajo el estereomicroscopio.

35 En el segundo bioensayo, se usó caldo bacteriano en vez de material centrifugado. Se evaluaron cinco tratamientos, a saber, 1) caldo de fuerza máxima de V12/001944, 2) dilución 10^{-2} 3) dilución 10^{-3} , 4) dilución 10^{-4} y 5) no tratados como control. Hubo diez microgusanos por pocillo con seis pocillos por tratamiento distribuidos en un diseño completamente aleatorio. Para los microgusanos tratados, se añadieron 20 µl de caldo bacteriano por pocillo. El bioensayo se completó también a temperatura ambiente.

40 La mortalidad se evaluó a diario hasta tres días después de la inoculación. La mortalidad de las larvas se observó a diario bajo el estereomicroscopio.

Gorgojo argentino del tallo (*Listronotus bonariensis*) (Coleoptera: Curculionidae)

45 Se realizaron dos bioensayos para evaluar la reacción de V12/001946 contra el gorgojo argentino del tallo. Los materiales de ensayo para ambos bioensayos, raigrás y el gorgojo procedían de material recolectado del campo, Canterbury, Nueva Zelanda.

50 El bioensayo inicial tuvo dos tratamientos: 1) raigrás tratado con V12/001946 de fuerza máxima y caldo y hojas no tratadas como control. El raigrás se cortó en una longitud de 2 pulgadas (5,08 cm). Para el césped tratado con V12/001946, la muestra de hierba se sumergió en caldo de fuerza máxima de V12/001946 y se dejó secar al aire 10-15 minutos. Las muestras de control y de césped tratado se colocaron en una placa de Petri. Hubo cinco placas de Petri en el césped tratado y cuatro en el control. Diez gorgojos se colocaron en cada muestra de césped. La placa de Petri se selló después con película envolvente. Todas las placas de Petri se colocaron en la incubadora a 22 °C y un fotoperíodo de 12:12 (luz/oscuridad). La mortalidad de las larvas se observó a diario.

55 El segundo bioensayo utilizó plántulas de raigrás enteras. Se usaron plántulas de raigrás de tres semanas de edad. Las raíces de las plántulas de raigrás se colocaron en una pequeña bolsa de plástico y se colocó suficiente agua para evitar que las plántulas se secaran. La bolsa de plástico se sujetó justo por encima de las raíces con una brida de plástico para evitar que el agua saliera de la bolsa.

60 El bioensayo tuvo dos tratamientos de la siguiente manera: 1) raigrás tratado con V12/001946 y raigrás no tratado como control. Hubo tres plántulas de raigrás por tratamiento. Para el raigrás no tratado, 500 µl de agua destilada estéril se pulverizó en cada plántula usando un cepillo de aire. En el raigrás tratado, 500 µl de caldo de V12/001946 se pulverizaron. Las plántulas se dejaron secar al aire después de la pulverización y se colocaron en un recipiente de plástico rectangular con una tapa de malla. Diez gorgojos se introdujeron en cada plántula. Todos los recipientes

65

se colocaron en la incubadora a 22 °C y un fotoperíodo de 12:12 (luz/oscuridad). Se realizó una evaluación de la mortalidad de las larvas.

Barquero de agua (Hemiptera: Corixidae)

El bioensayo se realizó usando el barquero de agua recolectado del campo de Oxford, Nueva Zelanda. Hubo dos tratamientos: 1) barquero de agua tratado con V12/001946 y no tratado como control. Un barquero de agua se colocó en una botella universal con 5 ml de agua destilada estéril. Hubo cinco botellas por tratamiento. En el barquero de agua tratado, 40 µl de V12/001946 de fuerza máxima se añadieron al agua destilada estéril. Se realizó el experimento a temperatura ambiente (20-24 °C). La mortalidad se evaluó a diario.

Escarabajo buceador (*Antiporus duplex*) (Coleoptera: Dytiscidae)

Los escarabajos buceadores usados en el bioensayo se recogieron del campo en Oxford, Nueva Zelanda. El bioensayo tiene dos tratamientos, a saber, 1) escarabajo buceador tratado con V12/001946 y no tratado como control.

En el bioensayo, se utilizaron placas de cultivo tisular de doce pocillos. Se colocó un escarabajo buceador por pocillo con 6 pocillos por tratamiento. En cada pocillo, se colocaron dos ml de agua estéril. Para el escarabajo buceador tratado con V12/001946, se añadieron 10 µl de V12/001946 de fuerza máxima. El bioensayo se realizó a temperatura ambiente (20-24 °C) con registro diario de mortalidad.

Avispas comunes adultas *Vespula vulgaris* (Hymenoptera: Vespidae)

El bioensayo se realizó usando avispas adultas recolectadas de plantas en flor alrededor de la Universidad de Lincoln. Se evaluaron dos tratamientos: avispas tratadas con V12/001946 y no tratadas como control. Se colocaron cinco avispas en un recipiente de plástico con tapa perforada con agujeros pequeños.

Las avispas en el control se alimentaron con 2 ml de solución de sacarosa al 10 % colocada en una pequeña tapa de plástico. Para las avispas tratadas con V12/001946, 2 ml de sacarosa al 10 % se mezclaron con 1 ml de V12/001946 de fuerza máxima (concentrado). Las soluciones de sacarosa (con y sin V12/001946) se colocaron antes de la introducción de las avispas en cada contenedor.

Se realizó el bioensayo a temperatura ambiente (20-24 °C). La mortalidad se registró a diario.

Tres aislados de Nueva Zelanda de *B. laterosporus* (NMI n.º V12/001944, V12/001945 y V12/001946) mostraron actividad contra las larvas de DBM (véase la figura. 3). Contra una gama de otros lepidópteros, las bacterias fueron tóxicas contra algunas especies. (Tabla 1). Las enrolladoras (enrolladoras de patas negras, enrolladoras de la lira negra, polilla marrón claro del manzano, todas las Tortricidae), carpocapsa (Tortricidae) y DBM (Plutellidae) y una Noctuidae fueron susceptibles.

Los mosquitos (Diptera: Culicidae) también son muy susceptibles a las bacterias (Figuras 4 y 5). Hay alguna susceptibilidad en el escarabajo de Manuka (un escarabajo), pero esto no se vio cuando las larvas se inocularon en el suelo. Los gusanos del césped, otro escarabajo, no fueron susceptibles (Tabla 2). Las avispas del orden Hymenoptera, *Vespula vulgaris* adultas parecen ser susceptibles.

La actividad de los nematodos se demostró contra una especie de nematodos, conocida como microgusanos (*Panagrellus redivivus*) (figura 9).

La cepa NCIMB 41419 de *B. laterosporus* no fue eficaz contra la polilla dorso de diamante (figura 3) ni contra el mosquito (figura 5).

Tabla 1: Sumario de bioensayos contra insectos lepidópteros usando la cepa V12/001946, (La fuerza máxima es aproximadamente 10^{10} células/ml de un cultivo de 3-4 días)/

Tratamiento y especies	Dilución	% de mortalidad	N
<i>Cydia pomonella</i> (carpocapsa) (Tortricidae)			
Control	-	16,7	n=30
V12/001946	10^{-4}	66,7	
V12/001946	10^{-2}	83,3	
V12/001946	0	73,3	

<i>Helicoverpa armigera</i> (oruga de la cápsula de algodón/gusano cogollero del maíz/gusano del tomate)(Noctuidae)			
Control	-	3,3	n=30
<i>Helicoverpa armigera</i> (oruga de la cápsula de algodón/gusano cogollero del maíz/gusano del tomate)(Noctuidae)			
V12/001946	0	0,0	
<i>Pseudocoremia suavis</i> (polilla del pino/polilla común del bosque) (Geometridae)			
Control	-	0,0	n=20
V12/001946 (25 días de edad)	0	5,0	
V12/001946 (4 días de edad)	0	10,0	
<i>Cnephasia jactatana</i> (polilla enrolladora de la lira negra) (Tortricidae)			
Control	-	36,7	n=30
V12/001946	0	83,3	
Control		23,3	
V12/001946	10 ⁻⁴	50,0	n=30
V12/001946	10 ⁻²	50,0	
V12/001946	0	76,7	
<i>Planotortrix notophaea</i> (enrolladora de las patas negras) (Tortricidae)			
Control		30,0	n=10
V12/001946	0	40,0	
Control		36,7	n=30
V12/001946	0	50,0	
Control		21,4	n=28
V12/001946	0	39,3	
<i>Epiphyas postvittana</i> (polilla marrón claro del manzano) (Tortricidae)			
Control		30	n=10
V12/001946	0	60	
<i>Spodoptera litura</i> (gusano gris del tabaco/gusano del ejército) (Noctuidae)			
Control		10,0	n=30
V12/001946	0	0,0	
<i>Pieris rapae</i> (blanquita de la col)(Pieridae)			
Control		0	n=10
V12/001946	0	0	
Dipel (control positivo)	0	100	

Tabla 2: Otras especies

Tratamiento y especies	Dilución	% de mortalidad	Comentario
Barquero de agua (Corixidae)	0	no susceptible	
Escarabajo buceador (<i>Antiporus duplex</i>)		no susceptible	
Los gusanos del césped, <i>Costelytra zealandica</i>		no susceptible	

Tratamiento y especies	Dilución	% de mortalidad	Comentario
escarabajo de Manuka, <i>Pyronota</i> sp.-		7/20 murieron después de 24 días usando inoculación de zanahoria.	Ninguno murió cuando se trató en el suelo
<i>Vespula vulgaris</i> adultas (avispa común)	Control - 2 ml de sacarosa al 10 %	3/5	
	1 ml de fuerza máxima (FS por sus siglas en inglés) (centrifugado) + 1 ml de sacarosa al 10 %	5/5	5/5 murieron después de 1 día (1/5 para el control)
Gorgojo argentino del tallo (<i>Listronotus bonariensis</i>) (Coleoptera: Curculionidae)	Control	0/60	no susceptible
	V12/001946	1/60	
<i>Musca domestica</i> (mosca doméstica)	Control	1/16	
	V12/001946	3/16	

Las tres cepas de *B. laterosporus* aisladas de plantas de Nueva Zelanda han demostrado todas actividad contra algunos lepidópteros y dípteros. Con el orden Lepidoptera, todas las especies de las órdenes Tortricidae y Plutellidae evaluadas fueron susceptibles. Dentro de las Diptera, los mosquitos fueron susceptibles.

LISTA DE REFERENCIAS

Aronson, A. I., & Dunn, P. E. (1991). Patente de los Estados Unidos US5055293.

Baxter, S.W., Badenes-Pérez, F.R., Morrison, A., Vogel, H., Crickmore, N., Kain, W., Wang, P., Heckel, D.G. y Jiggins, C.D. (2011) Parallel evolution of *Bacillus thuringiensis* toxin resistance in Lepidoptera. *Genetics*, Octubre, 189, 675-679.

Boets, A., Arnaut, G., van Rie, J., & Damme, N. (2011). Patente belga n.º US 7919609B2.

Bone, L. W., & Singer, S. (1991). Patente de los Estados Unidos n.º 5045314

de Oliveira, E. J., Rabinovitch, L., Monnerat, R. G., Passos, L. K., & Zahner, V. (2004). Molecular characterization of *Brevibacillus laterosporus* and its potential use in biological control. *Appl Environ Microbiol*, 70(11), 6657-6664.

Favret, M.E. y Yousten, A.A. (1985) Insecticidal activity of *Bacillus laterosporus*. *J. Invertebrate Pathology* 48, 195-203.

Huang, X., Tian, B., Niu, Q., Yang, J., Zhang, L., & Zhang, K. (2005). An extracellular protease from *Brevibacillus laterosporus* G4 without parasporal crystals can serve as a pathogenic factor in infection of nematodes. *Res Microbiol*, 156(5-6), 719-727. Orlova, M. V., Smirnova, T. A., Ganushkina, L. A., Yacubovich, V. Y., & Azizbekyan, R. R. (1998). Insecticidal activity of *Bacillus laterosporus*. *Appl Environ Microbiol*, 64(7), 2723-2725.

Rivers, D. B., Vann, C. N., Zimmack, H. L., & Dean, D. H. (1991). Mosquitocidal activity of *Bacillus laterosporus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 58, 444-447.

Ruiu, L., Delrio, G., Ellar, D. J., Floris, I., Paglietti, B., Rubino, S., et al. (2006). Lethal and sublethal effects of *Brevibacillus laterosporus* on the housefly (*Musca domestica*). *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 118(2), 137-144.

Schnepf, H. E., Narva, K. E., Stockhoff, B. A., Finstad Lee, S., Walz, M., & Sturgis, B. (2002). Patente de los Estados Unidos n.º US 2002/0120114A1.

Singer, S. (1996). The utility of strains of morphological group II *Bacillus*. *Advances in applied microbiology*, 42, 219-261.

Singer, S., Van Fleet, A. L., Viel, J. J., & Genevese, E. E. (1997). Biological control of the zebra mussel *Dreissena polymorpha* and the snail *Biomphalaria glabrata*, using Gramicidin S and D and molluscicidal strains of *Bacillus*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 18(4), 226-231.

Singh, P. (1983) A general purpose laboratory diet mixture for rearing insects. *Insect Sci. Application* 4, 357-362.

Tabashnik, B.E., Cushing, N.L., Finson, N., Johnson, M.W. (1990) Field Development of Resistance to *Bacillus thuringiensis* in Diamondback Moth (Lepidoptera: Plutellidae). *Journal of Economic Entomology*, 83, 1671-1676.

Tabashnik, B.E., Liu, Y., Malvar, T., Heckel, D.G., Masson, L. y Ferré, J. (1998) Insect resistance to *Bacillus thuringiensis*: uniform or diverse? *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 29 October 353, 1751-1756.

Wearing, C.H. et al., (2003) Screening for resistance in apple cultivars to light brown apple moth, *Epiphyas postvittana* and green headed leaf roller *Planotortrix octo* and its relationship to field damage. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 109, 39-53.

Zahner, V., Rabinovitch, L., Suffys, P., & Momen, H. (1999). Genotypic diversity among *Brevibacillus laterosporus* strains. *Applied and environmental microbiology*, 65(11), 5182.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> LINCOLN UNIVERSITY

<120> COMPOSICIONES DE BIOCONTROL

<130> 673412 HCF

<150> 61/704801

<151> 24/09/2012

<150> 13/837735

<151> 15/03/2013

<160> 4

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 1483

<212> ADN

<213> *Brevibacillus laterosporus*

<400> 1

acgctggcgg	cgtgccta	aatgcaagt	cgagcgaggg	tcttcggacc	ctagcggcgg	60
acgggtgagt	aacacgtagg	caacctgcct	gtaagactgg	gataacatag	ggaaaacttat	120
gctaataccg	gataggggtt	tgcttctcct	gaagcgaaac	ggaaagatgg	cgcaagctat	180
cacttacaga	tgggcctgcg	gcgcattagc	tagttgggtg	ggtaatggct	caccaaggcg	240
acgatgcgta	gccgacctga	gagggtgacc	ggccacactg	ggactgagac	acggcccaga	300
ctcctacggg	aggcagcagt	agggaatttt	ccacaatgga	cgaaagtctg	atggagcaac	360
gccgcgtgaa	cgatgaaggc	tttcgggtcg	taaagttctg	ttgttaggga	agaaacagtg	420
ccattttaat	aagggtggcac	cttgacggta	cctaacgaga	aagccacggc	taactacgtg	480
ccagcagccg	cggtaatacg	taggtggcaa	gcgttgccg	gaattattgg	gogtaaagcg	540
cgcgcaggtg	gctatgtaag	tctgatgtta	aagcccgagg	ctcaacctcg	gttcgcattg	600
gaaactgtgt	agcttgagtg	caggagagga	aagtggattt	ccacgtgtag	cggtgaaatg	660
cgtagagatg	tggaggaaca	ccagtggcga	aggcgacttt	ctggcctgta	actgacactg	720
aggcgcgaaa	gcgtggggag	caaacaggat	tagataccct	ggtagtccac	gccgtaaacg	780
atgagtgcta	ggtgttaggg	gtttcaatac	ccttagtgcc	gcagctaacg	caataagcac	840
tccgcctggg	gagtacgctc	gcaagagtga	aactcaaagg	aattgacggg	ggcccgacac	900
agcgggtggag	catgtgggtt	aattcgaagc	aacgcgaaga	accttaccag	gtcttgacat	960
cccactgacc	gctctagaga	tagagcttcc	cttcggggca	gtggtgacag	gtggtgcatg	1020
gttgctgtca	gctcgtgtcg	tgagatgttg	ggttaagtcc	cgcaacgagc	gcaaccctta	1080
tctttagttg	ccagcattca	gttgggcact	ctagagagac	tgccgtcgac	aagacggagg	1140
aaggcgggga	tgacgtcaaa	tcatcatgcc	ccttatgacc	tgggctacac	acgtgotaca	1200
atggttggta	caacgggatg	ctacttcgcg	agaagatgct	aatctcttaa	aaccaatctc	1260
agttcggatt	gtaggctgca	actcgcctac	atgaagtcgg	aatcgctagt	aatcgcggat	1320
cagcatgccg	cggatgaatac	gttcccgggc	cttgtaacac	ccgcccgtca	caccacggga	1380
gtttgcaaca	cccgaagtcg	gtgaggtaac	cgcaaggagc	cagccgcgga	aggtggggta	1440
gataactggg	gtgaagtcgt	aacaaggtat	ccgtaccgga	agg		1483

<210> 2

<211> 1483

<212>ADN

<213> Brevibacillus laterosporus

<400> 2

acgctggcgg cgtgcctaata catgcaagt cgagcgaggg tcttcggacc ctacggcgcg	60
acgggtgagt aacacgtagg caacctgcct gtaagactgg gataacatag ggaaacttat	120
gctaataaccg gatagggttt tgcttctcct gaagcgaaac ggaaagatgg cgcaagctat	180
cacttgcaga tgggcctgcg gcgcattagc tagttggtga ggtaatggct caccaaggcg	240
acgatgcgta gccgacctga gagggtgacc ggccacactg ggactgagac acggcccaga	300
ctcctacggg aggcagcagt agggaatddd ccacaatgga cgaaagtctg atggagcaac	360
gccgcgtgaa cgatgaaggc tttcgggtcg taaagttctg ttgttaggga agaaacagtg	420
ccatttaaat aagggtggcac cttgacggta cctaacgaga aagccacggc taactacgtg	480
ccagcagccg cggtaatacg taggtggcaa gcgttgtccg gaattattgg gcgtaaagcg	540
cgcgaggtg gctatgtaag tctgatgtta aagcccgagg ctcaacctcg gttcgcattg	600
gaaactgtgt agcttgagtg caggagagga aagtgggtatt ccacgtgtag cggtgaaatg	660
cgtagagatg tggaggaaca ccagtggcga aggcgacttt ctggcctgta actgacactg	720
aggcgcgaaa gcgtggggag caaacaggat tagataccct ggtagtccac gccgtaaacg	780
atgagtgcta ggtgttaggg gtttcaatac ccttagtgcc gcagctaacg caataagcac	840
tccgcctggg gactacgctc gcaagagtga aactcaaagg aattgacggg ggcccgcaca	900
agcgggtggag catgtggttt aattcgaagc aacgcgaaga acctaccag gtcttgacat	960
cccactgacc gctctagaga tagagcttcc cttcggggca gtggtgacag gtggtgcatg	1020
gttgctcgtca gctcgtgtcg tgagatgttg ggttaagtcc cgcaacgagc gcaaccctta	1080
tctttagttg ccagcattca gttgggcaact ctagagagac tgccgtcgac aagacggagg	1140
aaggcgggga tgacgtcaaa tcatcatgcc ccttatgacc tgggctacac acgtgctaca	1200
atggttggtg caacgggatg ctacttcgcg agaagatgct aatctcttaa aaccaatctc	1260
agttcggatt gtaggctgca actcgcctac atgaagtogg aatcgctagt aatcgcgat	1320
cagcatgccg cggatgaatac gttcccgggc cttgtacaca ccgcccgtca caccacggga	1380
gtttgcaaca cccgaagtcg gtgaggtaac cgcaaggagc cagccgccga aggtggggta	1440
gataactggg gtgaagtcgt aacaaggtat ccgtaccgga agg	1483

<210> 3

<211> 1483

<212>ADN

<213> Brevibacillus laterosporus

<400> 3

acgctggcgg	cgtgccta	aatgcaagt	cgagcgaggg	tcttcggacc	ctagcggcgg	60
acgggtgagt	aacacgtagg	caacctgcct	gtaagactgg	gataacatag	ggaaacttat	120
gctaataccg	gatagggttt	tgcttctcct	ggagcgaaac	ggaaagatgg	cgcaagctat	180
caettacaga	tgggcctgcg	gcgcattagc	tagttggtga	ggtaatggct	caccaaggcg	240
acgatgcgta	gccgacctga	gagggtgacc	ggccacactg	ggactgagac	acggcccaga	300
ctcctacggg	aggcagcagt	aggaattttt	ccacaatgga	cgaaagtctg	atggagcaac	360
gccgcgtgaa	cgatgaaggc	tttcgggtcg	taaagttctg	ttgttaggga	agaaacagtg	420
ccatttaaat	aaggtggcac	cttgacggta	cctaacgaga	aagccacggc	taactacgtg	480
ccagcagccg	cggtaatacg	taggtggcaa	gcgttgtccg	gaattattgg	gcgtaaagcg	540
cgcgaggtg	gctatgtaag	tctgatgtta	aagcccgagg	ctcaacctcg	gttcgcattg	600
gaaactgtgt	agcttgagt	caggagagga	aagtgggtatt	ccacgtgtag	cggtgaaatg	660
cgtagagatg	tggaggaaca	ccagtggcga	aggcgacttt	ctggcctgta	actgacactg	720
aggcgcgaaa	gcgtggggag	caaacaggat	tagataccct	ggtagtccac	gccgtaaaacg	780
atgagtgcta	ggtgttaggg	gtttcaatac	ccttagtgcc	gcagctaacg	caataagcac	840
tccgcctggg	gagtacgctc	gcaagagtga	aactcaaagg	aattgacggg	ggccgcgaca	900
agcgggtggag	catgtggttt	aattcgaagc	aacgcgaaga	accttaccag	gtcttgacat	960
cccactgacc	gctctagaga	tagagcttcc	cttcggggca	gtggtgacag	gtggtgcatg	1020
gttgctcgtca	gctcgtgtcg	tgagatgttg	ggttaagtcc	cgcaacgagc	gcaaccctta	1080
tctttagttg	ccagcattca	gttgggcact	ctagagagac	tgccgtcgac	aagacggagg	1140
aaggcgggga	tgacgtcaaa	tcatcatgcc	ccttatgacc	tgggctacac	acgtgctaca	1200
atggttggtg	caacgggatg	ctacttcgcg	agaagatgct	aatctcttaa	aaccaatctc	1260
agttcggatt	gtaggctgca	actcgcctac	atgaagtcgg	aatcgctagt	aatcgcggat	1320
cagcatgccg	cggtgaatac	gttcccgggc	cttgtacaca	ccgcccgtca	caccacggga	1380
gtttgcaaca	cccgaagtgc	gtgaggtaac	cgcaaggagc	cagccgccga	aggtggggta	1440
gataactggg	gtgaagtcgt	aacaaggtat	ccgtaccgga	agg		1483

<210> 4
 <211> 1483
 <212>ADN
 <213> Brevibacillus laterosporus
 <400> 4

acgctggcgg	cgtgcctaata	acatgcaagt	cgagcgaggg	ttttcggacc	ctagcggcgg	60
acgggtgagt	aacacgtagg	caacctgcct	gtaagactgg	gataacatag	ggaaacttat	120
gctaataaccg	gatagagttt	tgcttcgcat	gaagcgaaac	ggaaagatgg	cgcaagctat	180
cacttgacaga	tgggcctgcg	gcgcattagc	tagttggtga	ggtaaaggct	caccaaggcg	240
acgatgcgta	gccgacctga	gagggtgacc	ggccacactg	ggactgagac	acggcccaga	300
ctcctacggg	aggcagcagt	agggaaat	ccacaatgga	cgaaagtctg	atggagcaac	360
gccgcgtgaa	cgatgaaggc	tttcgggtcg	taaagttctg	ttgttaggga	agaaacagtg	420
ccatttaaat	aagggtggac	cttgacggta	cctaacgaga	aagccacggc	taactacgtg	480
ccagcagccg	cggtaatagc	taggtggcaa	gcgttgctcg	gaattattgg	gcgtaaagcg	540
cgcgacgggtg	gctatgtaag	tctgatgta	aagccccggg	ctcaacctcg	gttcgcattg	600
gaaactgcgt	agcttgagt	caggagagga	aagtggatt	ccacgtgtag	cggtgaaatg	660
cgtagagatg	tggaggaaca	ccagtggcga	aggcgacttt	ctggcctgta	actgacactg	720
aggcgcgaaa	gcgtggggag	caaacaggat	tagataccct	ggtagtccac	gccgtaaacg	780
atgagtgcga	ggtgttaggg	gtttcaatac	ccttagtgcc	gcagctaacg	caataagcac	840
tccgcctggg	gagtacgctc	gcaagagtga	aactcaaagg	aattgacggg	ggccccgaca	900
agcgggtggag	catgtggttt	aattcgaagc	aacgcgaaga	accttaccag	gtcttgacat	960
cccactgacc	gctctagaga	tagagcttcc	cttcggggca	gtggtgacag	gtggtgcatg	1020
gttgctcgta	gctcgtgtcg	tgagatgttg	ggttaagtcc	cgcaacgagc	gcaaccctta	1080
tctttagttg	ccagcattca	gttgggcact	ctagagagac	tgccgtcgac	aagacggagg	1140
aaggcgggga	tgacgtcaaa	tcacatgcc	ccttatgacc	tgggctacac	acgtgctaca	1200
atggttggtg	caacgggatg	ctacttcgcg	agaagatgct	aatctcttaa	aaccaatctc	1260
agttcggatt	gtaggctgca	actcgcctac	atgaagtcgg	aatcgctagt	aatcgcggat	1320
cagcatgccg	cgggtgaatac	gttccccggc	cttgtaacaca	ccgcccgtca	caccacggga	1380
gtttgcaaca	cccgaagtcg	gtgaggtaac	cgcaaggagc	cagccgccga	aggtggggta	1440
gataactggg	gtgaagtcgt	aacaaggat	ccgtaccgga	agg		1483

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una cepa aislada de *Brevibacillus laterosporus* con actividad insecticida contra al menos una especie de Lepidoptera y al menos una especie de Diptera, en la que la cepa aislada de *Brevibacillus laterosporus* se selecciona de la cepa NMI n.º V12/001946 de *Brevibacillus laterosporus*, cepa NMI n.º V12/001945 de *Brevibacillus laterosporus* y cepa NMI n.º V12/001944 de *Brevibacillus laterosporus*.
- 10 2. Uso de una cepa aislada de *Brevibacillus laterosporus* de acuerdo con la reivindicación 1, para controlar al menos una de una polilla dorso de diamante (*Plutella xylostella*) y un gusano gris de la col (*Trichoplusia ni*).
3. Uso de una cepa aislada de *Brevibacillus laterosporus* de acuerdo con la reivindicación 1 para controlar una especie de Lepidoptera seleccionada de una especie de Tortricidae y una especie de Plutellidae.
- 15 4. Uso de una cepa aislada de *Brevibacillus laterosporus* de acuerdo con la reivindicación 1 para controlar una especie de mosquito.
5. El uso de la reivindicación 4 en el que la especie de mosquito se selecciona de *Culex pervigilans* y *Opifex fuscus*.
- 20 6. Uso de una cepa aislada de *Brevibacillus laterosporus* de acuerdo con la reivindicación 1 para controlar al menos una de la polilla dorso de diamante (*Plutella xylostella*) y al menos una especie de mosquito.
7. Una cepa aislada de *Brevibacillus laterosporus* de acuerdo con la reivindicación 1, que se proporciona en la forma de un cultivo biológicamente puro.
- 25 8. Un cultivo biológicamente puro de la cepa NMI n.º V12/001946 de *Brevibacillus laterosporus*,
9. Un cultivo biológicamente puro de la cepa NMI n.º V12/001945 de *Brevibacillus laterosporus*.
- 30 10. Un cultivo biológicamente puro de la cepa NMI n.º V12/001944 de *Brevibacillus laterosporus*.
11. Una composición que comprende al menos una cepa de *B. laterosporus* de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 y 8 a 10, y un soporte agrícolamente aceptable.
- 35 12. Una composición de acuerdo con la reivindicación 11, que comprende dos o tres cepas de *B. laterosporus* de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 y 8 a 10.
13. Un método para controlar al menos una plaga, comprendiendo el método la puesta en contacto de al menos una plaga con una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 y 12, o una o más cepas de *B. laterosporus* de acuerdo con la reivindicación 1 y 8 a 10.
- 40 14. Un método de acuerdo con la reivindicación 13, en el que el al menos una plaga se selecciona entre: un insecto, un nematodo y una avispa.

FIGURA 1

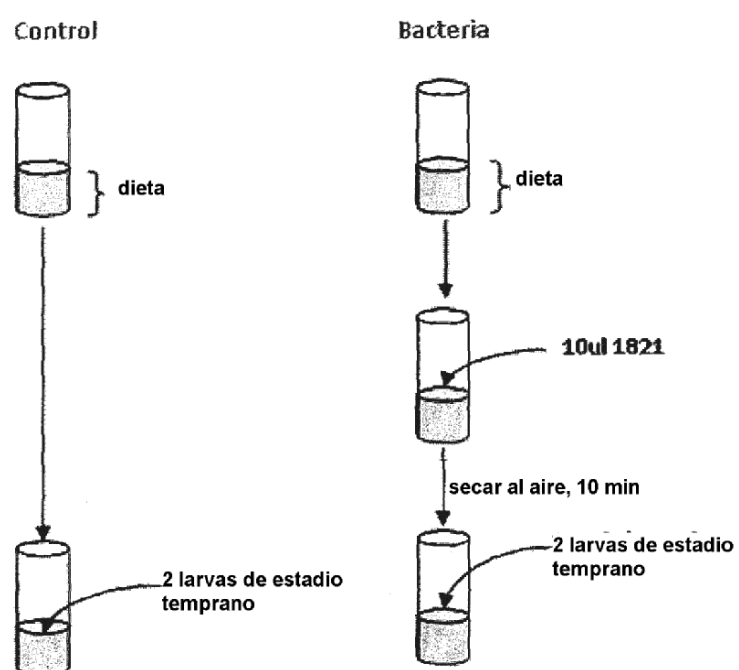


FIGURA 2

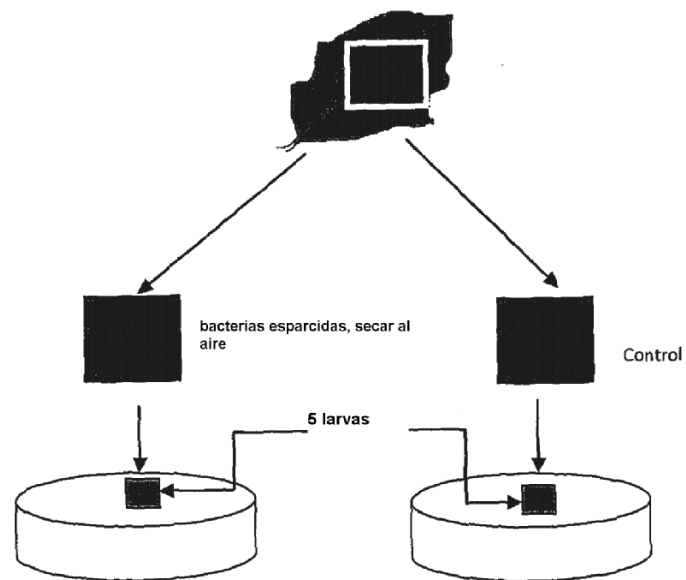


FIGURA 3

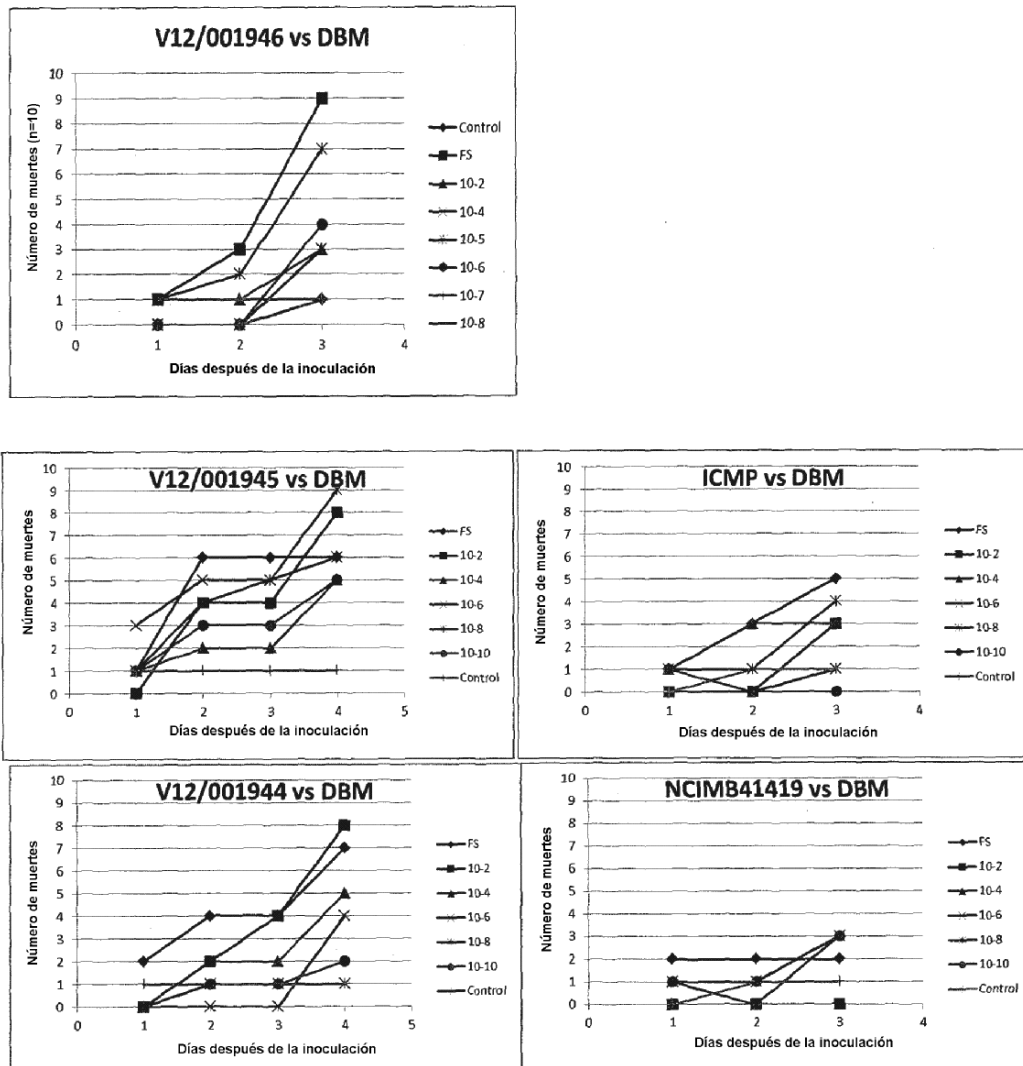


FIGURA 4

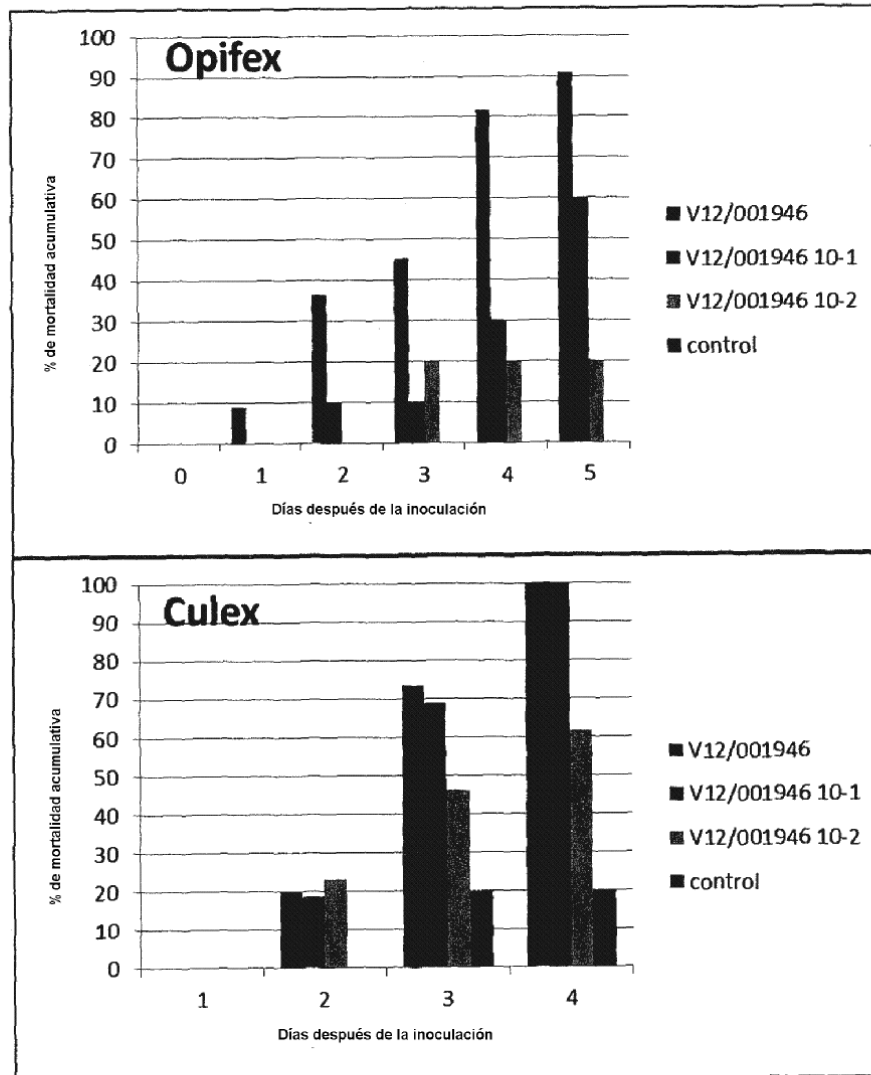


FIGURA 5

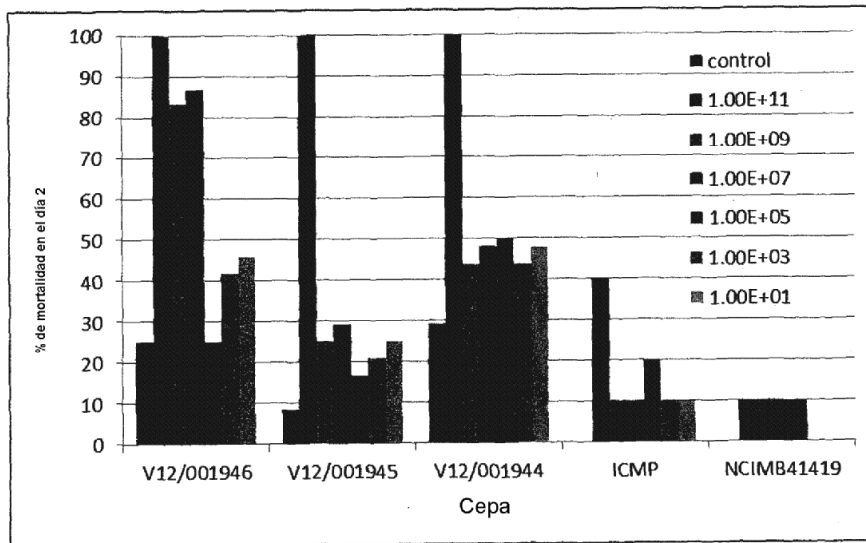


FIGURA 6

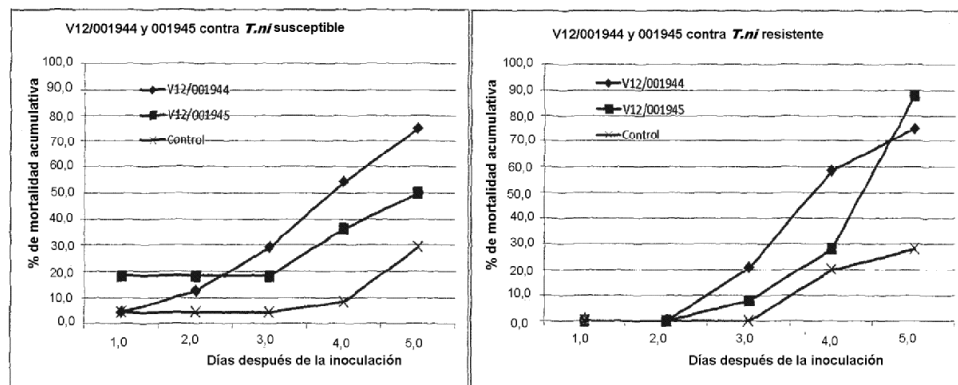


FIGURA 7

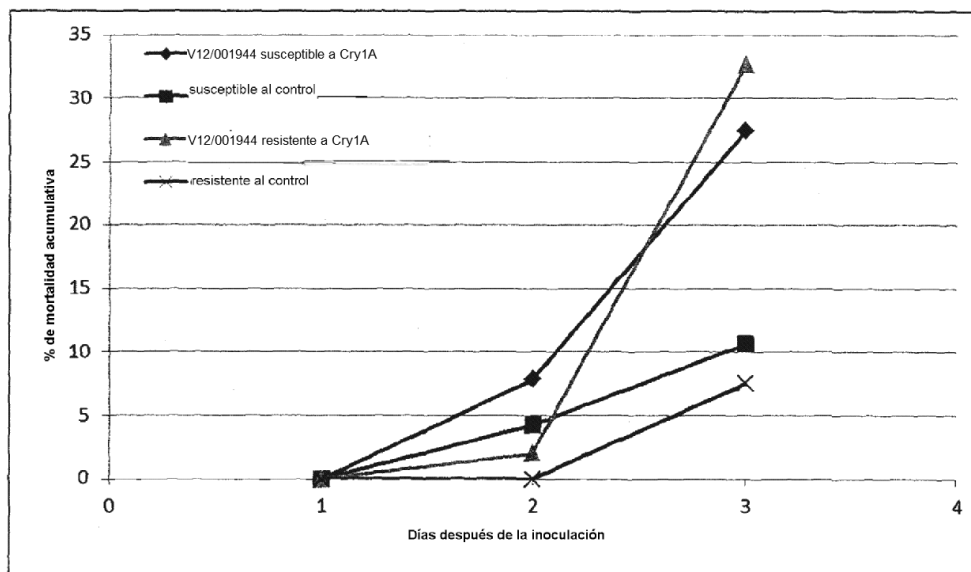


FIGURA 8

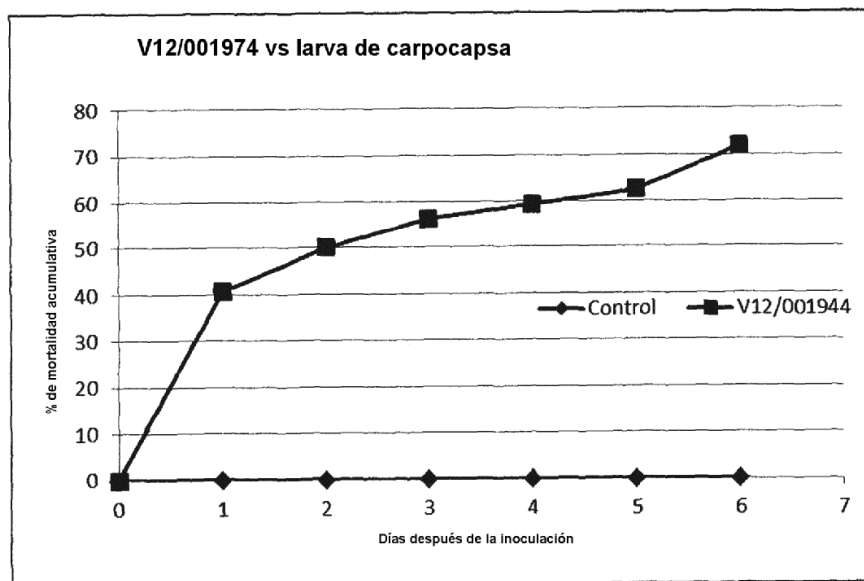


FIGURA 9

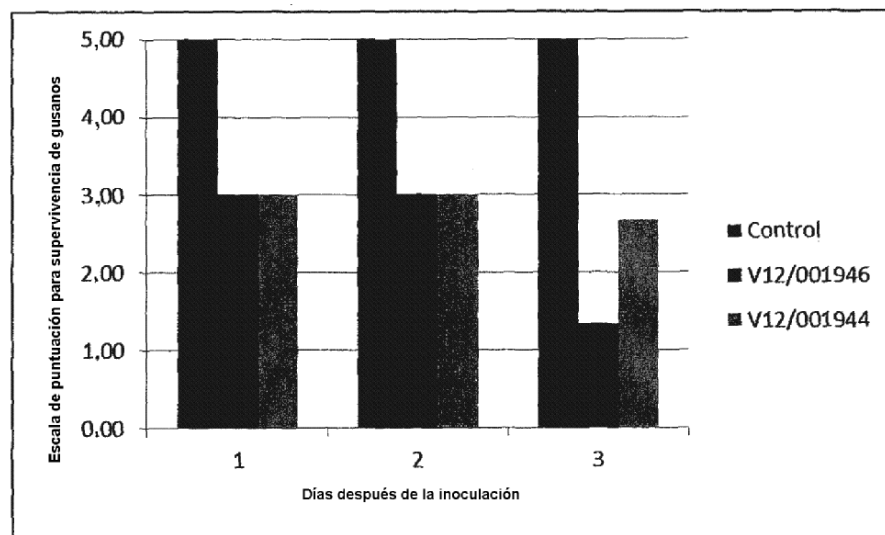


FIGURA 10

V12/001946	ACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAGGG	40
V12/001944	-----	40
V12/001945	-----	40
NCIMB41419	-----	40
V12/001946	TCTTCGGACCCTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTAGG	80
V12/001944	-----	80
V12/001945	-----	80
NCIMB41419	-T-----	80
V12/001946	CAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACATAGGGAACTTAT	120
V12/001944	-----	120
V12/001945	-----	120
NCIMB41419	-----	120
V12/001946	GCTAATACCGGATAGGGTTTTGCTTCTCCTGAAGCGAAAC	160
V12/001944	-----	160
V12/001945	-----G-----	160
NCIMB41419	-----A-----G-A-----	160
V12/001946	GGAAAGATGGCGCAAGCTATCACTTACAGATGGGCCTGCG	200
V12/001944	-----G-----	200
V12/001945	-----	200
NCIMB41419	-----G-----	200
V12/001946	GCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCG	240
V12/001944	-----	240
V12/001945	-----	240
NCIMB41419	-----A-----	240
V12/001946	ACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTG	280
V12/001944	-----	280
V12/001945	-----	280
NCIMB41419	-----	280
V12/001946	GGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT	320
V12/001944	-----	320
V12/001945	-----	320
NCIMB41419	-----	320
V12/001946	AGGGAATTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAAC	360
V12/001944	-----	360
V12/001945	-----	360
NCIMB41419	-----	360
V12/001946	GCCGCGTGAACGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAGTTCTG	400
V12/001944	-----	400
V12/001945	-----	400
NCIMB41419	-----	400
V12/001946	TTGTTAGGGAAGAAACAGTGCCATTTAAATAAGGTGGCAC	440
V12/001944	-----	440
V12/001945	-----	440
NCIMB41419	-----	440
V12/001946	CTTGACGGTACCTAACGAGAAAGCCACGGCTAACTACGTG	480
V12/001944	-----	480
V12/001945	-----	480
NCIMB41419	-----	480

ES 2 698 100 T3

V12/001946	CCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCG	520
V12/001944	-----	520
V12/001945	-----	520
NCIMB41419	-----	520
V12/001946	GAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGCTATGTAAG	560
V12/001944	-----	560
V12/001945	-----	560
NCIMB41419	-----	560
V12/001946	TCTGATGTTAAAGCCCGAGGCTCAACCTCGGTTCGCATTG	600
V12/001944	-----	600
V12/001945	-----	600
NCIMB41419	-----G-----	600
V12/001946	GAAACTGTGTAGCTTGAGTGCAGGAGAGGAAAGTGGTATT	640
V12/001944	-----	640
V12/001945	-----	640
NCIMB41419	-----C-----	640
V12/001946	CCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACA	680
V12/001944	-----	680
V12/001945	-----	680
NCIMB41419	-----	680
V12/001946	CCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGCCTGTAAGTACACTG	720
V12/001944	-----	720
V12/001945	-----	720
NCIMB41419	-----	720
V12/001946	AGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCT	760
V12/001944	-----	760
V12/001945	-----	760
NCIMB41419	-----	760
V12/001946	GGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAGGTGTTAGGG	800
V12/001944	-----	800
V12/001945	-----	800
NCIMB41419	-----	800
V12/001946	GTTTCAATACCCTTAGTGCCGCAGCTAACGCAATAAGCAC	840
V12/001944	-----	840
V12/001945	-----	840
NCIMB41419	-----	840
V12/001946	TCCGCCTGGGGAGTACGCTCGCAAGAGTGAAACTCAAAGG	880
V12/001944	-----	880
V12/001945	-----	880
NCIMB41419	-----	880
V12/001946	AATTGACGGGGGCGCCGACACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTT	920
V12/001944	-----	920
V12/001945	-----	920
NCIMB41419	-----	920
V12/001946	AATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACAT	960
V12/001944	-----	960
V12/001945	-----	960
NCIMB41419	-----	960

ES 2 698 100 T3

V12/001946	CCCACTGACCGCTCTAGAGATAGAGCTTCCCTTCGGGGCA	1000
V12/001944	-----	1000
V12/001945	-----	1000
NCIMB41419	-----	1000
V12/001946	GTGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTG	1040
V12/001944	-----	1040
V12/001945	-----	1040
NCIMB41419	-----	1040
V12/001946	TGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTA	1080
V12/001944	-----	1080
V12/001945	-----	1080
NCIMB41419	-----	1080
V12/001946	TCTTTAGTTGCCAGCATTTCAGTTGGGCACTCTAGAGAGAC	1120
V12/001944	-----	1120
V12/001945	-----	1120
NCIMB41419	-----	1120
V12/001946	TGCCGTCGACAAGACGGAGGAAGGCGGGGATGACGTCAAA	1160
V12/001944	-----	1160
V12/001945	-----	1160
NCIMB41419	-----	1160
V12/001946	TCATCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACA	1200
V12/001944	-----	1200
V12/001945	-----	1200
NCIMB41419	-----	1200
V12/001946	ATGGTTGGTACAACGGGATGCTACTTCGCGAGAAGATGCT	1240
V12/001944	-----	1240
V12/001945	-----	1240
NCIMB41419	-----	1240
V12/001946	AATCTCTTAAACCAATCTCAGTTCCGATTGTAGGCTGCA	1280
V12/001944	-----	1280
V12/001945	-----	1280
NCIMB41419	-----	1280
V12/001946	ACTCGCCTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGAT	1320
V12/001944	-----	1320
V12/001945	-----	1320
NCIMB41419	-----	1320
V12/001946	CAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACA	1360
V12/001944	-----	1360
V12/001945	-----	1360
NCIMB41419	-----	1360
V12/001946	CCGCCCCGTCACACCACGGGAGTTTGCAACACCCGAAGTCG	1400
V12/001944	-----	1400
V12/001945	-----	1400
NCIMB41419	-----	1400
V12/001946	GTGAGGTAACCGCAAGGAGCCAGCCGCCGAAGGTGGGGTA	1440
V12/001944	-----	1440
V12/001945	-----	1440
NCIMB41419	-----	1440

ES 2 698 100 T3

V12/001946	GATAACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTATCCGTACCGGA	1480
V12/001944	-----	1480
V12/001945	-----	1480
NCIMB41419	-----	1480
V12/001946	AGG (SEQ ID NO: 1)	1483
V12/001944	--- (SEQ ID NO: 2)	1483
V12/001945	--- (SEQ ID NO: 3)	1483
NCIMB41419	--- (SEQ ID NO: 4)	1483