

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la
Propiedad Intelectual
Oficina internacional



(10) Número de Publicación Internacional
WO 2015/197900 A1

(43) Fecha de publicación internacional
30 de diciembre de 2015 (30.12.2015) **WIPO | PCT**

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
A01N 63/02 (2006.01) C12N 7/02 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2015/070490

(22) Fecha de presentación internacional:
24 de junio de 2015 (24.06.2015)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P201430956 24 de junio de 2014 (24.06.2014) ES

(71) Solicitantes: **UNIVERSIDAD PÚBLICA DE NAVARRA** [ES/ES]; Campus de Arrosadia s/n (OTRI), Edificio del Rectorado, E-31006 Pamplona (ES). **CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC)** [ES/ES]; C/ Serrano, 117, E-28006 Madrid (ES). **INSTITUTO DE ECOLOGÍA, A.C.** [MX/MX]; Carretera antigua a Coatepec No. 351, El Haya, Xalapa, Veracruz, 91070 (MX).

(72) Inventores: **ARRIZUBIETA, Maite**; Instituto de Agrobiotecnología -, Avda de Pamplona, 123, E-31192 Mutilva, Navarra (ES). **SIMÓN, Oihane**; Instituto de Agrobiotecnología, Avda de Pamplona, 123, E-31192 Mutilva, Navarra (ES). **CABALLERO MURILLO, Primitivo**; Instituto de Agrobiotecnología, Avda de Pamplona, 123, E-31192 Mutilva, Navarra (ES). **WILLIAMS, Trevor**; Instituto de Ecología, A.C., Carretera antigua a Coatepec No. 351, El Haya, Xalapa, Veracruz, 91070 (MX).

(74) Mandatario: **DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**; c/ Miguel Ángel, 21, Madrid, E-28010 Madrid (ES).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

- con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))
- con (una) indicación(es) relativa(s) a material biológico depositado en virtud de lo dispuesto en la Regla 13bis, aparte de la descripción (Reglas 13bis.4(d)(i) y 48.2(a)(viii))
- con la parte de lista de secuencias de la descripción (Regla 5.2(a))

(54) Title: NOVEL GENOTYPES OF THE HELICOVERPA ARMIGERA SINGLE NUCLEOPOLYHEDROVIRUS (HEARSNPV), METHOD FOR THE PRODUCTION THEREOF, AND USE OF SAME AS A BIOLOGICAL CONTROL AGENT

(54) Título : NUEVOS GENOTIPOS DEL NUCLEOPOLIEDROVIRUS SIMPLE DE HELICOVERPA ARMIGERA (HEARSNPV), PROCEDIMIENTO PARA SU PRODUCCIÓN Y USO COMO AGENTE DE CONTROL BIOLÓGICO

(57) Abstract: The invention relates to two novel genotypes of the Helicoverpa armigera single nucleopolyhedrovirus HearSNPV, HearSNPV-SP1 B and HearSNPV-LB6, each one originating from mixtures of genotypes obtained from different locations and cultures. Each one has a specific insecticide activity for controlling Helicoverpa armigera larvae comparable to that of the usual commercial insecticides. Furthermore, the mixture of the two genotypes, especially in a ratio of 1:1, with co-occluded virions of mixed genotypes, can control H. armigera pests in tomato cultures just as effectively as chemical or biological insecticides that are used normally. The use thereof as a bioinsecticide represents a safe technology for vertebrates, specifically arthropods. It can also be produced easily, with a high yield, as a result of the oral inoculation of H. armigera larvae with HearSNPV occlusion bodies.

(57) Resumen: Se describen dos nuevos genotipos del nucleopoliedrovirus simple de Helicoverpa armigera, HearSNPV, HearSNPV-SP1 B y HearSNPV-LB6, cada uno procedente de mezclas de genotipos obtenidas de localizaciones y cultivos diferentes. Cada uno de ellos tiene una actividad insecticida específica frente a larvas de H. armigera comparable a la de los insecticidas comerciales habituales. Además, la mezcla de los dos genotipos, particularmente en proporción 1 : 1 con viriones co-ocuidos de genotipos mezclados, es capaz de controlar las plagas de H. armigera en cultivo de tomate, siendo tan eficaz como los insecticidas utilizados habitualmente, químicos o biológicos. Su uso como bioinsecticida representa una tecnología segura para los vertebrados, por ser específico de artrópodos. Además puede producirse con facilidad y buen rendimiento por inoculación oral de larvas de H. armigera con cuerpos de oclusión de HearSNPV.

WO 2015/197900 A1

DESCRIPCIÓN

Título de la invención

Nuevos genotipos del nucleopoliedrovirus simple de *Helicoverpa armigera* (HearSNPV), procedimiento para su producción y uso como agente de control biológico

Campo de la invención

La invención se adscribe al sector técnico de los plaguicidas biológicos de aplicación al control de plagas de insectos. Concretamente, la invención se refiere a dos nuevos genotipos de un nucleopoliedrovirus que es capaz de infectar a larvas del lepidóptero *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1809), a composiciones que comprendan uno o varios de los nuevos genotipos, a un procedimiento para su producción y su uso para el control de plagas del mencionado insecto.

Antecedentes de la invención

En España el cultivo del tomate ocupa 59.300 hectáreas, con una producción mayor de 4,3 millones de toneladas al año, es el cuarto país productor de tomate, sólo por detrás de Estados Unidos (California), China e Italia (http://www.magrama.gob.es/estadistica/pags/anuario/2011/AE_2011_13_06_27_01.pdf). La mayor parte del tomate se cultiva en Extremadura (73%), Andalucía (13%) y valle del Ebro (10%) (<http://www.navarraagraria.com/n184/artoma11.pdf>). En Portugal, el cultivo de tomate también ocupa un lugar importante, con 15.300 hectáreas y una producción de más de 1,1 millones de toneladas (http://www.ine.pt/ine_novidades/Estatisticas_Agricolas_2011/index.html#). Entre las plagas que afectan al cultivo del tomate, la más importante es el taladro del tomate, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) (Torres-Vila et al., 2003). A escala mundial, pocas plagas causan tantas pérdidas económicas como el noctúido *H. armigera* (Cunningham et al., 1999; Reed y Pawar, 1982). En España *H. armigera* ha sido una de las plagas clave en cultivos extensivos como el algodón y el maíz, pero desde hace algo más de una década está cobrando igual grado de importancia en los invernaderos hortícolas del Levante español, desde donde se ha extendido al resto de las regiones españolas y a Portugal (Torres-Vila et al., 2003). Actualmente está considerada como la especie fitófaga más problemática en gran parte de los cultivos de tomate al aire libre de la región mediterránea (Torres-Vila et al., 2003). Las larvas pueden atacar al cultivo en cualquier estado fenológico, sin embargo, el periodo preferido por las hembras para ovipositar es el de la floración. Su preferencia por las partes de la planta con alta concentración en nitrógeno, como las estructuras reproductivas (flor y fruto) y los puntos de crecimiento, hace que su acción influya de forma muy directa en

la cosecha. Además, es una especie muy polífaga, y posee una gran movilidad, alta fecundidad y multivoltismo, por lo que sus niveles de población pueden variar rápidamente en el espacio y en el tiempo. Los controles de calidad de las empresas conserveras de tomate establecen el límite de daños entre el 2 y el 5% de los tomates cosechados. Si hay larvas presentes, este límite se reduce al 0-2% (Torres-Vila et al., 2003). Estos reducidos límites de calidad ponen de manifiesto la necesidad de un método de control eficaz contra la plaga *H. armigera*.

El control de *H. armigera* se realiza habitualmente mediante la aplicación de insecticidas químicos (Torres-Vila et al., 2003). Sin embargo, el uso indiscriminado de los insecticidas de síntesis ha acarreado diversos problemas, como el incremento de los costes de producción, aparición de resistencias a distintas materias activas, reducción de la fauna útil, disminución de la calidad por el incremento de los residuos químicos en frutos y derivados (Torres-Vila et al., 2000). Estos hechos han favorecido la búsqueda de otros métodos de control, entre ellos virus y otros microorganismos entomopatógenos (Moscardi, 1999).

La familia Baculoviridae (baculovirus) es la más ampliamente estudiada de todas las que afectan a insectos por su utilidad para el hombre, ya que presentan características muy deseables como bioinsecticidas: elevada patogenicidad, compatibilidad con los enemigos naturales de las plagas, alta especificidad (infectan específicamente a artrópodos) (Gröner, 1986), persistencia duradera en lugares protegidos de la luz ultravioleta, elevada transmisión horizontal y, por lo tanto, capacidad para originar epizootias (Caballero et al., 1992; Gelernter y Federici, 1986). Además se pueden formular de igual manera que los insecticidas químicos de síntesis, son perfectamente compatibles con éstos y pueden ser aplicados con equipos convencionales (Cherry y Williams, 2001). Se han recogido aislados de baculovirus en distintos lugares del mundo, los cuales han sido caracterizados a nivel biológico y bioquímico (Gelernter y Federici, 1986; Caballero et al., 1992; Hara et al., 1995). Además, algunos de ellos se encuentran actualmente registrados como insecticidas en varias partes del mundo y se utilizan en el control de plagas (Moscardi, 1999).

Antiguamente los baculovirus se clasificaban en base a la morfología de los cuerpos de oclusión virales (OBs por sus siglas en inglés), comprendiendo dos géneros: *Nucleopolyhedrovirus*, en los que los cuerpos de oclusión están formados por poliedrina, con forma de poliedro irregular, y *Granulovirus* (GV), en los que los cuerpos de oclusión están formados por granulina, con forma de gránulo (Theilmann et al., 2005). Sin embargo, una clasificación más actual, basada en la filogenia (homología a nivel genómico), divide la familia Baculoviridae en cuatro géneros: *Alphabaculovirus* (los nucleopoliedrovirus [NPV] específicos de lepidópteros), *Betabaculovirus* (GV específicos de lepidópteros),

Deltabaculovirus (NPV específicos de dípteros) y *Gammabaculovirus* (NPV específicos de himenópteros) (Jehle et al., 2006).

Los baculovirus poseen un genoma circular de ADN de doble cadena envuelto por una cápsida de naturaleza proteica, formando la nucleocápsida, que a su vez queda rodeada por una envuelta trilaminar compuesta por una capa de proteínas entre dos capas de lípidos, la cual es adquirida durante la replicación del virus, constituyendo el virión (Caballero et al., 2001). Dicha membrana lipoproteica puede ser adquirida de dos maneras diferentes, constituyendo a su vez dos tipos de viriones. Si las nucleocápsidas permanecen en la misma célula en la que han sido formadas adquieren una membrana sintetizada *de novo*, dando lugar a los viriones derivados de cuerpos de oclusión (occlusion derived virus, ODV), los cuáles quedan después envueltos en una matriz formada por una única proteína dando lugar al cuerpo de oclusión (occlusion body, OB). Sin embargo, otras nucleocápsidas, una vez han sido sintetizadas, se mueven y abandonan la célula huésped, adquiriendo la membrana a partir de la membrana del citoplasma de la célula huésped cuando la atraviesa por puntos concretos donde se encuentra insertada una glicoproteína codificada por el virus (GP64 o proteína F, dependiendo del virus). A estos viriones se les denomina viriones brotados (budded virus, BV) y se encuentran libres en la cavidad hemocélica del huésped, siendo los responsables de propagar la infección a las células de distintos tejidos. En esta fase todos los baculovirus sintetizan grandes cantidades de poliedrina (en el caso de los nucleopoliedrovirus, NPVs) o granulina (en el caso de los granulovirus, GVs), las cuales cristalizan formando una matriz o cuerpo de oclusión (OB) con forma de poliedro irregular (poliedrina) o de gránulo (granulina). Por esa razón, a los OB de poliedrina se les conoce también como poliedros y a los de granulina se les conoce también como gránulos. Al final del proceso infeccioso, que se completa entre tres y seis días, la larva muere conteniendo en su cavidad hemocélica grandes cantidades de cuerpos de oclusión que son fácilmente observables al microscopio óptico. Como consecuencia del proceso infeccioso, el tegumento de la larva se degrada liberando millones de cuerpos de oclusión que contaminan el follaje de las plantas, los cuales constituyen el inóculo que sirve para dar origen a un nuevo proceso infeccioso en otros huéspedes susceptibles (Caballero et al., 2001).

Por tanto, los baculovirus presentan dos tipos de viriones o partículas víricas infectivas que son morfológicamente y funcionalmente diferentes. Los ODVs están presentes en todos los baculovirus conocidos, y son las partículas infecciosas responsables de la infección primaria en las células epiteliales del mesenterón (tubo digestivo) y por tanto, responsables de la transmisión horizontal del virus entre los individuos susceptibles. Los BVs por su parte contienen siempre una sola nucleocápsida y son, en todos los casos, morfológicamente iguales (Fig. 1A). Estos BVs son las partículas infecciosas responsables de diseminar la

infección entre los órganos y tejidos de la cavidad hemocélica del huésped que son susceptibles, dando lugar a la infección secundaria, así como en los cultivos celulares *in vitro* (Caballero et al., 2001). En los cuerpos de oclusión de los NPVs quedan incluidos varios ODVs mientras que en el gránulo o GV solamente uno. Morfológicamente, los ODVs de los nucleopoliedrovirus pueden ser de dos tipos distintos: los denominados simples (dando lugar a los nucleopliedrovirus de tipo simple o single nucleopolyhedrovirus, SNPV) que contienen una única nucleocápsida por virión, o de tipo múltiple (nucleopoliedrovirus de tipo múltiple o multiple nucleopolyhedrovirus, MNPV) que contienen de una hasta varias nucleocápsidas por virión (Fig. 1B).

Los cuerpos de oclusión, ya sean poliedros o gránulos, proporcionan protección a los viriones preservando la capacidad infecciosa de estos virus fuera del huésped, ya que son capaces de persistir en el medio durante largos periodos en lugares protegidos de la luz ultravioleta, son insolubles en agua, resistentes a la putrefacción y desintegración por agentes químicos y también a tratamientos físicos como la congelación, la desecación o liofilización. En cambio, los cuerpos de oclusión son solubles en soluciones alcalinas, como las que se producen en el tubo digestivo de algunos insectos (pH 9-11), lo que permite la liberación de los ODVs para que comience la infección (Caballero et al., 2001).

Los baculovirus se han aislado de más de 500 especies de insectos, principalmente del orden Lepidoptera, entre las que se encuentran muchas de las plagas agrícolas más importantes. Además de una importante diversidad interespecífica, los baculovirus presentan una gran diversidad intraespecífica, la cual se ha demostrado tanto en la caracterización de diferentes aislados geográficos del mismo virus como dentro de un mismo aislado, ya que los aislados silvestres comprenden frecuentemente distintas variantes genotípicas. Para diferenciar y caracterizar tanto aislados como genotipos presentes dentro de un mismo aislado se recurre habitualmente al análisis del ADN viral con enzimas de restricción, ya que proporciona perfiles característicos de cada aislado o genotipo (Erlandson et al., 2007; Figueiredo et al., 1999; Harrison y Bonning, 1999).

Estas diferencias genómicas entre los distintos aislados y genotipos de un mismo virus pueden dar lugar a diferencias significativas en sus características insecticidas, como la patogenicidad, que se define como la cantidad de inóculo necesario para matar a un porcentaje de la población, la virulencia, o velocidad con la que se mata al insecto, y la productividad viral. Otras características fenotípicas que se pueden ver afectadas son el espectro de huésped, el tamaño de los cuerpos de oclusión y la licuefacción de las larvas (Cory et al., 2005; Harrison et al., 2012). Conocer la diversidad intrapoblacional de los baculovirus tiene, por tanto, especial importancia a la hora de diseñar bioinsecticidas, cuyas

materias activas deberán incluir las cepas o genotipos con mayor potencial insecticida. Por otro lado, se sabe que poblaciones locales de insectos son más susceptibles a aislados nativos del virus (Barrera et al., 2011; Bernal et al., 2013a), por lo que sería conveniente seleccionar un aislado del virus con el mismo origen geográfico que las poblaciones a las que se desea combatir.

De forma natural las larvas de *H. armigera* se ven infectadas por un nucleopoliedrovirus conocido de forma abreviada como HearSNPV (*Helicoverpa armigera* single nucleopolyhedrovirus, género *Alphabaculovirus*). Se trata de un nucleopoliedrovirus de tipo simple (SNPV) que infecta también larvas de otros miembros de los géneros *Helicoverpa* spp. y *Heliothis* spp., como por ejemplo larvas de *Helicoverpa zea*. Se han caracterizado aislados de HearSNPV en diferentes regiones del mundo, como China o Kenia (Chen et al., 2001; Ogembo et al., 2005). También se han obtenido aislados de este virus en España y Portugal (Figueiredo et al., 1999, 2009), donde provoca epizootias naturales en poblaciones de *H. armigera*. Hasta la fecha se han caracterizado varios aislados de este virus siendo los siguientes los más estudiados:

- Dos genotipos puros procedentes de China, cuyos genomas han sido completamente secuenciados, HearSNPV-G4 (Chen et al., 2001) y HearSNPV-C1 (Zhang et al., 2005), a los que se hará referencia a lo largo de la presente memoria de forma abreviada como HearG4 y HearC1. Guo y colaboradores (2006) compararon la actividad biológica de estos dos genotipos. En términos de la relación concentración/dosis- mortalidad, HearC1 resultó 2,8 veces más patógeno que HearG4 frente a larvas de tercer estadio de una población de *H. armigera* procedente de China. Además, las larvas infectadas con HearC1 murieron 9 horas antes que las infectadas con HearG4. El artículo de Zhang y colaboradores del año 2005 compara los genomas de estos dos genotipos, observando una identidad en la secuencia de nucleótidos del 98,1%. La comparación de estos dos genomas muestra cuatro regiones variables entre estos dos genotipos, las regiones homólogas 1, 4 y 5 (hr1, hr4 y hr5) y la región *bro-b*. Las regiones homólogas (hr) son zonas intergénicas que están presentes en muchos de los baculovirus, y se encuentran localizadas múltiples veces a lo largo del genoma. Se caracterizan por la presencia de múltiples e imperfectas secuencias repetidas. En el genoma de HearSNPV aparecen cinco regiones homólogas. En la figura 1 del artículo de Chen y colaboradores (2000) aparecen los perfiles de restricción con las endonucleasas de restricción *Bam*HI, *Bgl*II, *Eco*RI, *Hind*III, *Kpn*I, *Pst*I, *Sac*I y *Xho*I (Fig. 2 de la presente solicitud). En la Tabla 1 de dicho artículo se muestran los tamaños estimados de los fragmentos de restricción generados por cada una de dichas endonucleasas de restricción (Tabla 1). Los genomas completos de HearG4 y de HearC1 están accesibles en la base de datos del GenBank con los números de acceso AF271059 y AF303045, respectivamente. El

genotipo HearG4 se encuentra actualmente comercializado para el control de *H. armigera* en cultivo de algodón en China (Zhang, 1994).

Tabla 1: Tamaños estimados de los fragmentos de HearG4 obtenidos por digestión con *Bam*HI, *Bgl*II, *Eco*RI, *Hind*III, *Kpn*I, *Pst*I, *Sac*I y *Xho*I y tamaño total estimado del genoma (Chen et al., 2000).

Fragmento	<i>Bam</i> HI	<i>Bgl</i> II	<i>Eco</i> RI	<i>Hind</i> III	<i>Kpn</i> I	<i>Pst</i> I	<i>Sac</i> I	<i>Xho</i> I
A	37,3	24,5	14,1	22,2	55,5	39,0	65,0	36,5
B	31,8	18,5	13,9	16,5	34,2	36,8	22,3	34,6
C	14,4	15,8	9,8	14,7	23,6	32,3	19,3	20,0
D	14,0	14,8	9,1	12,8	9,8	11,8	9,7	11,0
E	12,7	13,7	9,0	11,6	6,1	6,1	9,4	10,9
F	7,7	12,1	6,8	10,8	0,9	3,4	4,4	7,0
G	3,9	7,1	6,4	10,2		0,6		4,4
H	3,3	5,9	6,0	10,1				3,5
I	1,9	4,9	6,0	7,3				2,2
J	1,8	4,3	5,8	6,5				
K	1,3	3,4	5,6	3,2				
L		2,6	4,7	2,7				
M		2,5	4,6	1,5				
N			4,5					
O			4,4					
P			4,3					
Q			3,7					
R			3,3					
S			3,1					
T			1,7					
U			1,0					
V			0,8					
W			0,5					
X			0,5					
Y			0,5					
Total	130,1	130,1	130,1	130,1	130,1	130,1	130,1	130,1

- Un aislado procedente de Kenia, HearSNPV-NNg1, al que se hará referencia en la presente memoria como HearNNg1, cuyo genoma también se encuentra completamente

secuenciado (Ogembo et al., 2009). HearNNg1 fue seleccionado por Ogembo y colaboradores (2007) como el aislado con las mejores características para ser desarrollado como bioinsecticida frente a larvas de *H. armigera* en Japón. HearNNg1 resultó entre 3,2 y 82,6 veces más patogénico que el resto de aislados estudiados, y 311,5 veces más patogénico que el aislado chino HearG4, frente a larvas de tercer estadio. Además, el aislado NNg1 mató a las larvas de tercer estadio de *H. armigera* entre 0,4 y 1,8 días antes que el resto de aislados, y 4,3 días antes que el genotipo HearG4. En la figura 1 de dicho artículo se muestran los perfiles de restricción con las endonucleasas *Bgl*II y *Xba*I de los aislados caracterizados (Fig. 3 de la presente solicitud). En la Tabla 2 del mismo artículo se muestran los tamaños estimados de los fragmentos de restricción de los distintos aislados digeridos con las endonucleasas *Bgl*II, *Xba*I y *Hind*III (Tabla 2).

Tabla 2: Tamaños estimados de los fragmentos de HearNNg1 (NNg1) y otros aislados procedentes de Sudáfrica (NS2), Kenia (NMa1), Zimbabue (NZ3), Tailandia (NT1) y China (G4) obtenidos por digestión con *Bgl*II, *Xba*I y *Hind*III y tamaño total estimado de los genomas (Ogembo et al., 2007).

Fragmento	<i>Bgl</i> II						<i>Xba</i> I					
	NNg1	NS2	NMa1	NZ3	NT1	G4	NNg1	NS2	NMa1	NZ3	NT1	G4
A	23,7	25,5	25,5	23,7	23,7	25,5	14,2	14,2	14,2	14,2	14,2	14,2
B	18,7	18,7	18,7	18,7	18,7	18,7	13,0	13,0	13,0	13,0	13,0	13,0
C	15,3	15,3	15,3	15,3	15,3	15,3	11,9	11,9	11,9	11,9	12,4	11,9
D	15,0	15,0	15,0	15,0	13,3	15,0	10,6	10,6	10,6	10,6	11,9	10,6
E	13,3	13,3	13,3	13,3	12,4	13,3	9,3	9,3	9,3	9,3	10,6	9,3
F	12,4	12,4	12,4	11,5	10,7	12,4	9,1	9,1	7,2	9,1	9,3	9,1
G	10,7	10,7	10,7	10,7	9,4	6,9	7,2	7,2	6,2	7,2	9,1	7,2
H	9,4	6,9	6,9	6,9	8,8	5,8	6,2	6,2	6,1	6,2	6,2	6,2
I	4,3	4,3	4,3	4,3	6,9	5,0	6,1	6,1	5,9	6,1	5,9	5,9
J	3,3	3,3	3,3	3,3	4,3	4,3	5,9	5,9	5,7	5,8	5,7	5,8
K	2,7	2,6	2,6	3,2	3,3	3,3	5,7	5,7	5,5	5,7	5,5	5,7
L	2,5	1,3	1,3	2,6	2,7	2,6	5,5	5,5	5,4	5,5	4,0	5,5
M	-	-	-	1,3	2,5	2,5	5,4	5,4	4,8	5,4	3,6	4,0
N							3,4	4,8	4,6	4,8	3,3	3,3
O							3,2	4,6	3,6	3,4	3,2	3,2
P							3,1	4,4	3,2	3,2	2,1	2,5
Q							1,9	3,6	1,6	1,6	1,6	2,1

R							1,6	3,1	1,2	1,2	1,2	1,9
S							1,2	1,9	1,1	1,1	1,1	1,6
T							1,1	1,6	1,0	1,0	1,0	1,3
U							1,0	1,2	-	-	-	1,2
V								1,1	-	-	-	1,1
W								1,0	-	-	-	-
Total	129,3	131,3	129,3	129,8	132	130,6	137,4	126,6	122,1	126,2	124,9	126,6

Tabla 2 Continuación

Fragmento	<i>HindIII</i>					
	NNg1	NS2	NMa1	NZ3	NT1	G4
A	22,6	22,6	22,6	22,6	22,6	22,6
B	14,5	17,1	17,1	17,1	14,5	14,5
C	13	13,5	13,5	13,5	14,5	14,5
D	11	13	13	13	13	13
E	10,8	11	11	11	11	11
F	10,7	10,8	10,4	10,8	10,8	10,7
G	10,4	10,4	10	10,4	10,4	10,4
H	10	10	8,2	10	10	10
I	7,7	8,2	7,5	7,5	7,5	7,5
J	7,5	7,5	4	3,3	6,7	6,7
K	6,7	3,3	3,3	2,6	4	3,3
L	3,3	2,6	3	1,9	2,6	2,6
M	2,6	1,5	2,6	1,5	1,5	1,5
N	1,5		1,5	-	-	-
O						
P						
Q						
R						
S						
T						
U						
V						
W						
Total	131,5	132,3	127,7	125,2	132,2	131,4

Por otro lado, el artículo de Ogembo y colaboradores (2009) compara el genoma de HearNNg1 con los genomas de los genotipos chinos HearC1 y HearG4, así como con el genoma del nucleopoliedrovirus simple de *Helicoverpa zea* (HzSNPV). El genotipo NNg1 muestra las mayores diferencias con los genomas de HearC1, HearG4 y HzSNPV en las regiones homólogas (hr) y en los genes *bro*, al igual que ocurría en la comparación de los genomas de HearC1 y HearG4. El genoma completo de HearNNg1 está accesible en la base de datos del GenBank con el número de acceso AP010907.

- Un aislado procedente de Australia, HearSNPV-Aus, al que se hará referencia en la presente memoria de la forma abreviada HearAus, cuyo genoma ha sido completamente secuenciado y está disponible en la base de datos del GenBank con el número de acceso JN584482.

- Siete aislados procedentes de la Península Ibérica, cinco españoles, HearSP1, HearSP2, HearSP4, HearSP7 y HearSP8, y dos portugueses, HearPT1 y HearPT2 (Arrizubieta et al., 2014; Figueiredo et al., 1999, 2009). Figueiredo y colaboradores (1999) seleccionaron el aislado HearSP1 como el aislado con las mejores características insecticidas, ya que fue dos veces más patogénico que el aislado HearSP2 frente a larvas de segundo estadio de una población de *H. armigera* procedente de Portugal. Posteriormente, en un nuevo estudio realizado por Figueiredo y colaboradores (2009) se determinó que los aislados HearSP7, HearPT1 y HearPT2 presentaban las características más favorables como bioinsecticidas, pero en este trabajo no se incluyó el aislado HearSP1. En un estudio realizado recientemente en nuestro laboratorio en el que se compararon todos estos aislados de la Península Ibérica, se seleccionó el aislado HearSP1 por sus mejores características insecticidas contra *H. armigera*, ya que aunque presenta la misma patogenicidad que el resto de aislados estudiados, es el más virulento y además se encuentra entre los más productivos en términos de la cantidad de cuerpos de oclusión producidos en cada insecto infectado (Arrizubieta et al., 2014). En la figura 1B del artículo de Figueiredo y colaboradores (2009) aparecen los perfiles de restricción con la endonucleasa *Bgl*II de los aislados españoles HearSP1, HearSP2, HearSP3, HearSP4, HearSP7 y HearSP8, y de los aislados portugueses HearPT1 y HearPT2 (Fig. 4A de la presente solicitud). La figura 1 del artículo de Arrizubieta y colaboradores (2014) muestra los perfiles de los aislados HearSP1, HearSP2, HearSP4, HearSP7, HearSP8, HearPT1, HearPT2 y HearG4 con la endonucleasa *Eco*RI (Fig. 4B de la presente solicitud), y en la Tabla 1 de dicho artículo se indican los tamaños de los fragmentos de restricción (Tabla 3).

Tabla 3. Tamaños estimados de los fragmentos de HearSP1, HearSP2, HearSP4, HearSP7, HearSP8, HearPT1, HearPT2 y HearG4, y tamaño real de los fragmentos de HearG4 generados *in silico* (G4*) a partir de la secuencia (AF271059) obtenidos por digestión con *EcoRI* y tamaño total estimado de los genomas (Arrizubieta et al., 2014).

Fragmento	Aislados HearSNPV								
	SP1	SP2	SP4	SP7	SP8	PT1	PT2	G4	G4*
A	13,4	13,4	13,4	13,2	13,4	13,4	13,4	14,3	14,13
B	10,7	13,2	10,7	10,0	10,7	10,7	10,7	13,4	13,45
C	9,3	10,7	9,3	9,3	9,0	9,3	9,3	10,1	10,15
D	9,2	9,3	9,2	9,0	8,2	9,0	9,2	9,0	9,05
E	8,2	9,2	8,2	8,2	7,5	8,2	8,2	6,6	6,64
F	7,1	7,1	7,1	7,1	6,3	7,5	7,5	6,4	6,36
G	6,3	6,3	6,3	6,3	6,0	6,3	6,3	6,3	6,29
H	6,0	6,0	6,0	6,0	5,9	6,0	6,0	6,0	5,99
I	5,9	5,9	5,9	5,9	5,8	5,9	5,9	5,8	5,84
J	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8	5,84
K	5,8	5,7	5,8	5,8	5,7	5,8	5,8	5,7	5,67
L	5,7	5,3	5,7	5,7	4,9	5,3	5,7	4,8	4,75
M	5,3	4,9	4,9	4,9	4,6	4,9	5,3	4,6	4,58
N	4,9	4,6	4,6	4,6	4,4	4,6	4,9	4,4	4,42
O	4,6	4,4	4,4	4,4	4,4	4,4	4,6	4,4	4,40
P	4,4	4,4	4,4	4,4	3,3	4,4	4,4	4,1	4,14
Q	4,4	3,3	3,3	3,3	3,0	3,3	4,4	3,7	3,68
R	3,3	3,0	3,0	3,0	2,8	3,0	3,3	3,4	3,36
S	3,0	2,8	2,8	2,8	1,7	2,8	3,0	3,0	3,0
T	2,8	1,7	1,7	1,7	1,0	1,7	2,8	2,8	2,83
U	1,7	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,7	1,7	1,74
V	1,0	1,0	1,0	1,0	0,8	1,0	1,0	1,5	1,48
X	1,0	0,8	0,8	0,8	-	0,8	1,0	1,0	1,00
Y	0,8	-	-	-	-	-	0,8	0,8	0,78
Z	0,5	-	-	-	-	-	-	-	0,48
a	0,4	-	-	-	-	-	-	-	0,45

b	0,4	-	-	-	-	-	-	-	0,41
c	0,3	-	-	-	-	-	-	-	0,31
d	0,18	-	-	-	-	-	-	-	0,18
e	0,02	-	-	-	-	-	-	-	0,02
Total	132,4	129,8	125,3	124,2	116,2	125,1	131,0	129,6	131,4

La diferencia en el número de fragmentos de los distintos genotipos con los del genotipo HearG4 generados *in silico* se debe a que su genoma se encuentra completamente secuenciado, por lo que se detectan fragmentos de pequeño tamaño que son imposibles de detectar mediante el análisis de patrones de bandas ya que no son visibles en los perfiles REN. En el caso de HearSP1, los fragmentos de pequeño tamaño fueron detectados mediante amplificación por PCR y secuenciación del fragmento amplificado utilizando primers diseñados en los extremos de los fragmentos clonados (Arrizubieta et al., 2014).

Tras la selección de la materia activa adecuada, antes de comercializar un bioinsecticida es necesario realizar ensayos de campo para comprobar su eficiencia en las condiciones en las que se va a aplicar, ya que su efectividad en campo puede variar respecto a la obtenida en condiciones controladas de laboratorio. Sin embargo, para llevar a cabo dichos ensayos y poder tratar así superficies extensas de cultivo se necesitan conseguir grandes cantidades de cuerpos de oclusión, siendo necesario desarrollar un sistema de producción masiva del virus. Actualmente, la metodología empleada para la producción masiva de la mayoría de los baculovirus es la producción *in vivo* en huéspedes permisivos (Kalia et al., 2001; Lasa et al., 2007). Esta técnica consiste en alimentar larvas susceptibles con dieta artificial contaminada superficialmente con una suspensión de cuerpos de oclusión. Algunos de los aspectos esenciales de esta metodología, como la dieta artificial de insectos o los métodos de cría masiva deben ser desarrollados específicamente para cada sistema huésped-patógeno (Lasa et al., 2007). Por otro lado, en Estados Unidos se ha desarrollado un sistema de producción de HearSNPV que implica tanto la producción *in vivo* como *in vitro* (Patente de EEUU nº US 7521219 B2). Esta técnica consiste en multiplicar primero el virus en larvas de *H. armigera*, y posteriormente realizar un número limitado de pases seriados en células para conseguir una gran cantidad de cuerpos de oclusión.

Como consecuencia de las cada vez más frecuentes resistencias desarrolladas por las larvas de *H. armigera* a los insecticidas químicos de síntesis, la cantidad aplicada necesaria para que este tipo de sustancias consiga el efecto deseado se están viendo incrementada progresivamente. En la Península Ibérica, debido a la gran superficie cultivada de tomate,

entre otros, este hecho se está convirtiendo en un problema cuyas consecuencias son tremendamente negativas para agricultores, consumidores y el medio ambiente.

La contaminación de los suelos, acuíferos y demás espacios naturales, el efecto sobre otros organismos vivos, así como el aumento de los costes de producción de los productos agrícolas y la disminución de la calidad de los mismos suponen una seria amenaza para varios sectores estratégicos en la Península Ibérica. Debido a las resistencias desarrolladas por las larvas de *H. armigera* a los insecticidas químicos de síntesis, sería interesante disponer de una alternativa con buena capacidad insecticida y que además tuviera un espectro de huéspedes muy reducido, para no perjudicar a los enemigos naturales ni otros organismos beneficiosos, como por ejemplo un agente de control biológico. Dentro de ellos, sería especialmente deseable que fuera un método de control eficiente para la Península Ibérica, y que fuera lo suficientemente potentes para solventar las amenazas y problemas que presentan las plagas de *H. armigera* en la Península Ibérica. Además de presentar una elevada eficacia para las plagas de la Península Ibérica, sería interesante que su método de producción también lo fuera, para que el coste de su producción y la cantidad de insecticida a aplicar no implicara elevaciones de costes que no lo hicieran competitivo.

La invención proporciona una solución eficaz a ese problema.

Sumario de la invención

La presente invención se basa en la obtención de nuevos genotipos del nucleopoliedrovirus simple de *Helicoverpa armigera*, los cuales fueron aislados mediante purificación *in vitro*. Dos de estos genotipos se purificaron a partir del aislado HearSNPV-SP1 (HearSP1) (Figueiredo et al., 1999), denominados HearSNPV-SP1A y HearSNPV-SP1B (o de forma abreviada HearSP1A y HearSP1B), mientras que otros seis genotipos se aislaron a partir de larvas muertas durante una epizootia producida en laboratorio en la segunda generación de una población de *H. armigera* procedente de un cultivo de algodón de Lebrija (Sevilla), denominados HearSNPV-LB1, HearSNPV-LB2, HearSNPV-LB3, HearSNPV-LB4, HearSNPV-LB5 y HearSNPV-LB6 (o de forma abreviada HearLB1, HearLB2, HearLB3, HearLB4, HearLB5 y HearLB6). Dichos genotipos son distintos de todos los aislados y genotipos caracterizados hasta el momento.

Sorprendentemente, los ensayos realizados con estos genotipos demuestran que dos de los nuevos genotipos aislados HearSNPV-SP1B (CNCM I-4806) y HearSNPV-LB6 (CNCM I-4807), y en particular, la mezcla de los mismos HearSNPV-SP1B:LB6 en proporción 1:1, se encuentran entre los nucleopoliedrovirus más activos que han sido desarrollados como bioinsecticidas hasta la fecha.

Este producto representa una tecnología limpia y segura ya que no deja residuos tóxicos sobre los suelos ni las cosechas y no es tóxico para el hombre ni otros animales, incluidos los enemigos naturales de las plagas, como los depredadores y parasitoides.

Además, estos nucleopoliedrovirus tienen la ventaja adicional de la facilidad y buen rendimiento en su producción.

Así, en un primer aspecto, el objeto de la presente invención se refiere a un nucleopoliedrovirus simple de *H. armigera* (HearSNPV) que pertenece a un genotipo seleccionado del grupo de:

- i) los genotipos de HearSNPV depositados en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM) con los números de depósito CNCM I-4806 (HearSNPV-SP1B), CNCM I-4807 (HearSNPV-LB6), o
- ii) los genotipos cuyo genoma está representado por SEQ ID NO:13 (HearSNPV-SP1B), o SEQ ID NO:14 (HearSNPV-LB6).

Dicho nucleopoliedrovirus puede estar en distintas formas, ya sea la de partícula vírica o virión, o en forma de cuerpos de oclusión, que es la forma en la que los nucleopoliedrovirus se encuentran en la naturaleza, y por tanto la forma que ingieren las larvas. Un cuerpo de oclusión puede contener viriones de solo uno de los genotipos HearSNPV-SP1B (CNCM I-4806) o HearSNPV-LB6 (CNCM I-4807), o viriones de más de uno de dichos genotipos co-ocuidos dentro del mismo cuerpo de oclusión. Los viriones pueden ser viriones derivados de los cuerpos de oclusión (ODV) (la forma de propagación que queda incluida en los cuerpos de oclusión y que se libera en el intestino de las larvas tras la disolución de la poliedrina), o viriones brotados (BV) (la forma mediante la cual se propaga la infección a los distintos tejidos de un insecto infectado, y que puede encontrarse también en cultivos celulares).

También es un aspecto de la presente invención un cuerpo de oclusión que contiene varios viriones, en el que al menos uno de ellos pertenece a un genotipo del nucleopoliedrovirus simple de *H. armigera* seleccionado del grupo de HearSNPV-SP1B (CNCM I-4806) y HearSNPV-LB6 (CNCM I-4807). El cuerpo de oclusión puede contener varios viriones de un mismo genotipo o bien viriones de genotipos diferentes co-ocuidos en el mismo cuerpo de oclusión. Cuando los viriones sean de un mismo genotipo, éste podrá ser cualquiera de los genotipos HearSNPV-SP1B ó HearSNPV-LB6. Mientras que cuando se trate de viriones co-ocuidos, los genotipos co-ocuidos podrán ser de cualquiera de HearSNPV-SP1B y/o HearSNPV-LB6, en distintas proporciones. Además, también pueden estar incluidos en la mezcla viriones de otros genotipos del nucleopoliedrovirus simple de *H. armigera* o puede ser que todos los viriones pertenezcan a alguno de los genotipos del grupo de HearSNPV-

SP1B y HearSNPV-LB6. En cualquiera de los casos los viriones contenidos en los cuerpos de oclusión serán viriones derivados de los cuerpos de oclusión (ODVs).

Los genotipos HearSNPV-SP1B y HearSNPV-LB6 pueden distinguirse por la secuencia específica que presentan en ciertas zonas de sus genomas, de gran variabilidad, como son las regiones del genoma conocidas como regiones homólogas (hr) 1 y 5 (hr1 y hr5), tal como se describe en los ejemplos de la presente solicitud. Así, son también posibles realizaciones de este aspecto de la invención los cuerpos de oclusión que contienen al menos un virión (ODV) cuyo genoma comprende un fragmento de ADN cuya secuencia está representada por:

- i) SEQ ID NO:5 o SEQ ID NO:6 (las secuencias específicas de la región homóloga 1 (hr1) amplificadas por PCR utilizando los cebadores F-hr1 y R-hr1 en ejemplos de la presente solicitud, pertenecientes, respectivamente, a los genotipos HearSNPV-SP1B (CNCM I-4806) y HearSNPV-LB6 (CNCM I-4807)).
- ii) SEQ ID NO:7 o SEQ ID NO:8 (las secuencias específicas de la región homóloga 5 (hr5) amplificadas por PCR utilizando los cebadores F-hr5 y R-hr5 en ejemplos de la presente solicitud, pertenecientes, respectivamente, a los genotipos HearSNPV-SP1B (CNCM I-4806) y HearSNPV-LB6 (CNCM I-4807)).
- iii) SEQ ID NO:9 o SEQ ID NO:10 (las secuencias completas de la región homóloga 1 (hr1), pertenecientes, respectivamente, a los genotipos HearSNPV-SP1B (CNCM I-4806) y HearSNPV-LB6 (CNCM I-4807)).
- iv) SEQ ID NO:11 o SEQ ID NO:12 (las secuencias completas de la región homóloga 5 (hr5), pertenecientes, respectivamente, a los genotipos HearSNPV-SP1B (CNCM I-4806) y HearSNPV-LB6 (CNCM I-4807)).

Otro aspecto de la invención es una composición que contiene nucleopoliedrovirus de al menos uno de los genotipos HearSNPV-SP1B (CNCM I-4806) y HearSNPV-LB6 (CNCM I-4807), o combinaciones de los mismos. Como en el caso anterior, los nucleopoliedrovirus pueden estar en distintas formas, como la de viriones libres o, preferiblemente, en forma de cuerpos de oclusión, que pueden tener un número variable de viriones co-ocluidos (viriones que, como se comentó previamente, serán viriones derivados de los cuerpos de oclusión (ODVs)). En este caso, los viriones contenidos en el cuerpo de oclusión pueden ser de un solo genotipo o de varios, siempre y cuando al menos uno de los genotipos sea HearSNPV-SP1B (CNCM I-4806) o HearSNPV-LB6 (CNCM I-4807). Por tanto, este aspecto de la invención se refiere a una composición que comprenda un nucleopoliedrovirus de la invención o un cuerpo de oclusión de la invención. En particular, son realizaciones posibles

de la invención las que comprendan las mezclas de viriones de distintos genotipos con las que se realizaron los ensayos descritos más adelante en los ejemplos de la presente invención, con preferencia por las composiciones que comprendan una mezcla de viriones de los genotipos HearSNPV-SP1B (CNCM I-4806) y HearSNPV-LB6 (CNCM I-4807).

Los distintos genotipos pueden estar en cualquier proporción relativa, preferiblemente en la proporción que mostró los mejores resultados en los ejemplos que se describen más adelante, es decir, aquella en la que los genotipos HearSNPV-SP1B (CNCM I-4806) y HearSNPV-LB6 (CNCM I-4807) están en la proporción HearSNPV-SP1B:HearSNPV-LB6 1:1.

Adicionalmente, las composiciones de la invención pueden comprender cualquier excipiente o vehículo apropiado en el sector agrícola, con preferencia por aquellos que lo hagan apto para ser aplicado según cualquiera de los métodos habituales en agricultura: pulverización, ya sea a nivel de suelo o aérea, aplicación en suspensión o en forma de polvo, o por cualquier tipo de sistema de riego. La composición podrá estar en cualquier forma, como puede ser en forma acuosa o en forma sólida. La composición podrá contener cualquier otro componente, preferiblemente aquellos de particular interés agrícola; así, los nucleopoliedrovirus simples de *H. armigera* podrán estar mezclados, por ejemplo, con un abono, un fertilizante o un plaguicida, o mezclas de los mismos. Un caso concreto puede ser aquel en la que la composición de la invención comprende adicionalmente un insecticida basado en la bacteria *Bacillus thuringiensis* seleccionado entre endosporas de dicha bacteria, cristales de proteínas Cry o mezclas de los mismos.

Por otro lado, posibles realizaciones de dicha invención son también las composiciones que pueden comprender agentes potenciadores del efecto patogénico del nucleopoliedrovirus sobre el lepidóptero.

Un aspecto adicional de la invención es el uso como insecticida de al menos uno de los nucleopoliedrovirus de la presente invención, o de una composición que contenga al menos uno de ellos. El insecto que se desea controlar es preferiblemente *H. armigera*, en concreto cuando se encuentra en forma de larva u oruga. Se prefiere que los nucleopoliedrovirus estén en forma de cuerpos de oclusión, ya que es la forma que comúnmente ingieren las larvas. Se prefiere también que la composición contenga una mezcla de los genotipos HearSNPV-SP1B (CNCM I-4806) y HearSNPV-LB6 (CNCM I-4807), preferiblemente las mezclas en las que dichos genotipos estén en la proporción HearSNPV-SP1B:HearSNPV-LB6 1:1.

Otro aspecto de la invención es un procedimiento para la producción de cuerpos de oclusión que comprende una etapa en la que se alimentan larvas de *H. armigera* con una dieta artificial que contiene cuerpos de oclusión del nucleopoliedrovirus de *H. armigera* con viriones de uno cualquiera de los genotipos HearSNPV-SP1B (CNCM I-4806) o HearSNPV-LB6 (CNCM I-4807) o mezclas de los mismos.

Es también un aspecto de la invención un método para identificar la presencia en una muestra de un genotipo del nucleopoliedrovirus simple de *H. armigera* seleccionado entre HearSNPV-SP1B (CNCM I-4806) y HearSNPV-LB6 (CNCM I-4807) que comprende las etapas de:

- i) amplificar mediante PCR el ADN extraído de dicha muestra utilizando una pareja de cebadores, que amplifican en la región homóloga (hr, del inglés homologous region) 1 o 5, que se selecciona entre las formadas por:
 - a. SEQ ID NO:1 (F-hr1) y SEQ ID NO:2 (R-hr1), o
 - b. SEQ ID NO:3 (F-hr5) y SEQ ID NO:4 (R-hr5);
- ii) analizar el fragmento amplificado para determinar su tamaño o su secuencia;
- iii) digerir el fragmento amplificado con la endonucleasa *Ndel*;
- iv) analizar los fragmentos generados tras la digestión para determinar el número de fragmentos y el tamaño de cada uno de ellos;
- v) concluir que está presente uno de los genotipos HearSNPV-SP1B (CNCM I-4806) o HearSNPV-LB6 (CNCM I-4807) si:
 - a. el fragmento amplificado por la pareja de SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:2 tiene:
 - i. un tamaño de 2.177 (HearSNPV-SP1B) ó 2.117 (HearSNPV-LB6) nucleótidos;
 - ii. la digestión de dicho fragmento con la endonucleasa *Ndel* genera 6 fragmentos de 857, 508, 381, 306, 78 y 47 nucleótidos (HearSNPV-SP1B) ó 5 fragmentos de 1.210, 475, 307, 78 y 47 nucleótidos (HearSNPV-LB6);
 - iii. la secuencia representada por SEQ ID NO:5 (HearSNPV-SP1B) o SEQ ID NO:6 (HearSNPV-LB6);

o, alternativamente,

- b) el fragmento amplificado por la pareja de SEQ ID NO:3 y SEQ ID NO:4 tiene:

- i. un tamaño de 2.326 (HearSNPV-SP1B) ó 2.330 (HearSNPV-LB6) nucleótidos;
- ii. la digestión de dicho fragmento con la endonucleasa *NdeI* genera 4 fragmentos de 1.120, 917, 211 y 78 nucleótidos (HearSNPV-SP1B) ó 3 fragmentos de 1.120, 998 y 212 nucleótidos (HearSNPV-LB6);
- iii. la secuencia representada por SEQ ID NO:7 (HearSNPV-SP1B) o SEQ ID NO:8 (HearSNPV-LB6).

La invención se explicará con más detalle mediante las Figuras y Ejemplos que aparecen a continuación.

Descripción de las figuras

Figura 1. (A) Fotos al microscopio de transmisión y representación esquemática de viriones derivados de los cuerpos de oclusión (ODVs) y de viriones brotados (BVs), y (B) de nucleopoliedrovirus de tipo múltiple (MNPV) con viriones con un número variable de nucleocápsidas, y de tipo simple (SNPV) con viriones con una única nucleocápsida.

Figura 2. Perfiles de restricción del aislado HearSNPV-G4 obtenidos tras la digestión del ADN genómico con las endonucleasas *Bam*HI, *Bgl*II, *Eco*RI, *Hind*III, *Kpn*I, *Pst*I, *Sac*I y *Xho*I. A la izquierda de la figura se muestra el marcador de peso molecular Lambda (λ) digerido con *Bam*HI-*Eco*RI-*Hind*III, y sus tamaños se indican en kilobases (Chen et al., 2000).

Figura 3. Perfiles de restricción de distintos aislados de HearSNPV: NNg1 (procedente de Kenia), NS2 (Sudáfrica), NMa1 (Kenia), NZ3 (Zimbabwe) y NT1 (Tailandia) obtenidos tras la digestión del ADN genómico con las endonucleasas *Bgl*II (A) y *Xba*I (B). A la izquierda de las figuras se muestra el marcador de peso molecular Lambda (λ) digerido con *Hind*III (MI) y con *Eco*RI-*Hind*III (MII), y sus tamaños se indican en kilobases (Ogembo et al., 2007).

Figura 4. (A) Perfiles de restricción de los aislados HearSP1, HearSP2, HearSP3, HearSP4, HearSP5, HearSP6, HearSP7, HearSP8, HearPT1 y HearPT2 tras la digestión del ADN genómico con la endonucleasa *Bgl*II; a la izquierda de la figura se muestra el marcador de peso molecular Lambda (λ) digerido con *Hind*III, y sus tamaños se indican en pares de bases (Figueiredo et al., 2009). (B) Perfiles de restricción de los aislados HearSP1, HearSP2, HearSP4, HearSP7, HearSP8, HearPT1, HearPT2 y HearG4 con la endonucleasa *Eco*RI; a la izquierda de la figura se muestra el marcador de peso molecular HyperLadder I (Bioline), y sus tamaños se indican en kilobases (Arrizubieta et al., 2014).

Figura 5. Patrón de bandas obtenido en gradiente continuo de sacarosa tras la centrifugación de los ODVs obtenidos de (A) HearSNPV y (B) AcMNPV. Los asteriscos blancos indican las bandas que representan los ODVs. Como se puede observar en el panel A sólo es visible una banda, por tanto todos los viriones presentan la misma morfología, conteniendo una única nucleocápsida. Sin embargo, en el panel B se observan varias bandas, cada una de ellas representa ODVs con un número determinado de nucleocápsidas, dependiendo del número de nucleocápsidas tendrán mayor o menor peso, apareciendo a menor o mayor altura.

Figura 6. Representación esquemática de una mezcla de cuerpos de oclusión de distintos genotipos, donde cada cuerpo de oclusión está formado por ODVs de un mismo genotipo, y de una mezcla de genotipos co-ocuidos en un mismo cuerpo de oclusión, donde cada cuerpo de oclusión está formado por ODVs de distintos genotipos.

Figura 7. (A) Electroforesis de los fragmentos de restricción obtenidos al tratar el ADN viral del aislado HearSP1 y de los genotipos HearSP1A y HearSP1B con las endonucleasas de restricción *Bgl*II y *Eco*RI. (B) Electroforesis de los fragmentos de restricción obtenidos al tratar el ADN viral de los aislados HearSP1, HearSP2, HearSP4, HearSP7, HearSP8, HearPT1 y HearPT2 y de los genotipos HearG4, HearSP1A, HearSP1B, HearLB1, HearLB2, HearLB3, HearLB4, HearLB5 y HearLB6 con la endonucleasa de restricción *Eco*RI. (C) Electroforesis de los fragmentos de restricción obtenidos al tratar el ADN viral de los aislados HearSP1, HearSP2, HearSP4, HearSP7, HearSP8, HearPT1 y HearPT2 y de los genotipos HearG4, HearSP1A, HearSP1B, HearLB1, HearLB2, HearLB3, HearLB4, HearLB5 y HearLB6 con la endonucleasa de restricción *Bgl*II. A la izquierda de las figuras se muestra el marcador de peso molecular 1 kb (NIPPON Genetics, Europe GmbH), y los tamaños de sus fragmentos se indican en kilobases.

Figura 8. (A) Fragmentos obtenidos al amplificar mediante PCR las zonas de variabilidad de la región homóloga hr1 (cebadores identificados por SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:2) y hr5 (cebadores identificados por SEQ ID NO:3 y SEQ ID NO:4) de los genotipos HearSP1B y HearLB6, del aislado HearSP1 y del genotipo chino HearG4, siendo c-: control negativo sin ADN viral. A la izquierda de la figura se muestra el marcador de peso molecular 1 kb (NIPPON), y los tamaños de sus fragmentos se indican en kilobases. (B) Fragmentos obtenidos tras digerir con la endonucleasa *Nde*I los fragmentos obtenidos mediante PCR de las zonas de variabilidad hr1 y hr5 de los genotipos HearSP1B y HearLB6, del aislado HearSP1 y del genotipo chino HearG4. A la izquierda de la figura se muestra el marcador de peso molecular 100 pb (NIPPON Genetics, Europe GmbH), y los tamaños de sus fragmentos se indican en pares de bases.

Figura 9. (A) Alineamiento de las secuencias de nucleótidos de los fragmentos amplificados mediante PCR de la región homóloga 1 (hr1) correspondiente a los genotipos HearSP1B y HearLB6 y a los aislados HearG4, HearC1, HearNNg1 y HearAus. (B) Alineamiento de las secuencias de nucleótidos de los fragmentos amplificados mediante PCR de la región homóloga 5 (hr5) correspondiente a los genotipos HearSP1B y HearLB6 y a los aislados HearG4, HearC1, HearNNg1 y HearAus.

Figura 10. Producción media de cuerpos de oclusión ($\times 10^7$ cuerpos de oclusión/larva) en larvas de segundo estadio de *H. armigera* tras ser infectadas con los genotipos individuales HearSP1A y HearSP1B y con el aislado HearSP1. Las barras verticales indican el error estándar. Las letras de significación iguales que acompañan a los valores indican que no hay diferencias significativas entre los tratamientos ($P > 0,05$).

Figura 11. Producción media de cuerpos de oclusión ($\times 10^8$ cuerpos de oclusión/larva) en larvas de segundo estadio de *H. armigera* tras ser infectadas con los genotipos individuales HearLB1, HearLB2, HearLB3, HearLB4, HearLB5 y HearLB6 y con el aislado HearSP1. Las barras verticales indican el error estándar. Las letras de significación diferentes que acompañan a los valores indican que hay diferencias significativas entre los tratamientos ($P < 0,05$).

Figura 12. Producción media de cuerpos de oclusión ($\times 10^7$ cuerpos de oclusión/larva) en larvas de segundo estadio de *H. armigera* tras ser infectadas con los genotipos individuales HearSP1A, HearSP1B, HearLB1, HearLB3 y HearLB6 y con las mezclas co-ocuidas HearSP1A:SP1B (1:1), HearSP1A:SP1B (1:2), HearLB1:LB3, HearLB3:LB6, HearLB1:LB3:LB6, HearLBmix, HearSP1B:LB1 y HearSP1B:LB6. Las barras verticales indican el error estándar. Las letras de significación diferentes que acompañan a los valores indican que hay diferencias significativas entre los tratamientos ($P < 0,05$).

Figura 13. Porcentaje de mortalidad debido a la infección, de supervivencia (o alcanzaron el estado de pupa) y de canibalismo en larvas de tercer, cuarto y quinto estadio (L_3 , L_4 y L_5), sanas e infectadas con la concentración letal 90% (CL_{90}) de la mezcla co-ocuida HearSP1B:LB6 a diferentes densidades larvarias (1, 5, 10 y 20 larvas por caja). Las letras de significación diferentes que acompañan a los valores indican que hay diferencias significativas entre los tratamientos ($P < 0,05$).

Figura 14. Porcentaje de mortalidad larvaria tras inocular larvas de *H. armigera* recién mudadas al tercer, cuarto y quinto estadio (L_3 , L_4 y L_5) y un día después de la muda (L_3+1 , L_4+1 y L_5+1) con una concentración letal 95% (CL_{95}), 90% (CL_{90}) ó 80% (CL_{80}) de la mezcla co-ocuida HearSP1B:LB6. Las barras verticales indican el error estándar. Las letras de

significación diferentes que acompañan a los valores indican que hay diferencias significativas entre los tratamientos ($P < 0,05$).

Figura 15. (A) Producción media de cuerpos de oclusión ($\times 10^8$ cuerpos de oclusión/larva) en larvas de *H. armigera* recién mudadas al tercer, cuarto y quinto estadio (L_3 , L_4 y L_5) y un día después de la muda a dichos estadios (L_3+1 , L_4+1 y L_5+1) inoculadas con una concentración letal 95% (CL_{95}), 90% (CL_{90}) ó 80% (CL_{80}) de la mezcla co-ocluida HearSP1B:LB6. (B) Producción media de cuerpos de oclusión ($\times 10^{10}$ cuerpos de oclusión/100 larvas) en larvas de *H. armigera* recién mudadas a L_3 , L_4 y L_5 y un día después de la muda a dichos estadios (L_3+1 , L_4+1 y L_5+1) inoculadas con la CL_{95} , CL_{90} y CL_{80} de la mezcla co-ocluida HearSP1B:LB6. Las barras verticales indican el error estándar. Las letras de significación diferentes que acompañan a los valores indican que hay diferencias significativas entre los tratamientos ($P < 0,05$).

Figura 16. Producción media de cuerpos de oclusión ($\times 10^9$ cuerpos de oclusión/larva) en larvas de quinto estadio (L_5) de *H. armigera* inoculadas con la concentración letal 95% (CL_{95}) de la mezcla co-ocluida HearSP1B:LB6 e incubadas a 23, 26 y 30°C. Las barras verticales indican el error estándar. Las letras de significación iguales que acompañan a los valores indican que no hay diferencias significativas entre los tratamientos ($P > 0,05$).

Figura 17. Porcentaje de mortalidad obtenido en larvas de segundo estadio de *H. armigera* recogidas en plantas de tomate tratadas en condiciones de laboratorio. Las larvas fueron recogidas a los 1, 3 y 5 días después de la aplicación de HearSNPV a tres concentraciones (10^6 , 10^7 y 10^8 cuerpos de oclusión/ml) de la mezcla co-ocluida HearSP1B:LB6, y criadas individualmente en el laboratorio en vasos con dieta semisintética hasta la muerte o pupación.

Figura 18. Porcentaje de frutos dañados en cultivo de tomate en invernadero 10 días después de la aplicación de Turex, Spintor y HearSNPV. Las letras de significación diferentes que acompañan a los valores indican que hay diferencias significativas entre los tratamientos ($P < 0,05$).

Figura 19. Porcentaje de mortalidad larvaria observada en cultivo de tomate en invernadero 10 días después de la aplicación de Turex, Spintor y HearSNPV. Las letras de significación diferentes que acompañan a los valores indican que hay diferencias significativas entre los tratamientos ($P < 0,05$).

Figura 20. Porcentaje de actividad insecticida residual (Turex, Spintor y HearSNPV) en las hojas de tomate en invernadero a lo largo del tiempo, respecto a la cantidad de insecticida

presente en las hojas de tomate a una hora después de la aplicación de los tratamientos. Las barras verticales indican el error estándar.

Figura 21. Cantidad de actividad insecticida residual por gramo de hoja de tomate en invernadero 1, 72, 144 y 216 horas (0, 3, 6 y 9 días) después de la aplicación de los tratamientos: A) Turex (mg), B) Spintor (μ l) y C) HearSNPV (cuerpos de oclusión). Las barras verticales indican el error estándar.

Figura 22. Porcentaje de frutos dañados, ya sean cicatrizados o frescos, en cultivo de tomate al aire libre después de la aplicación de HearSP1B:LB6, HearSP1, Spintor, Turex y Dursban durante (A) la primera, (B) segunda, (C) tercera, y (D) cuarta quincena. Las letras de significación diferentes que aparecen en las columnas en cada grupo indican que hay diferencias significativas dentro de cada grupo entre los distintos tratamientos ($P < 0,05$).

Figura 23. Porcentaje de frutos dañados cosechados, ya sean rojos podridos, rojos cicatrizados o verdes picados, en cultivo de tomate al aire libre, después de la aplicación de HearSP1B:LB6, HearSP1, Spintor, Turex y Dursban. Las letras de significación diferentes que aparecen en las columnas en cada grupo indican que hay diferencias significativas dentro de cada grupo entre los distintos tratamientos ($P < 0,05$).

Figura 24. Toneladas de A) tomates verdes, tanto picados como sanos y B) tomates rojos sanos, cicatrizados o podridos por hectárea en cultivo al aire libre después de la aplicación de HearSP1B:LB6, HearSP1, Spintor, Turex y Dursban. Las letras de significación diferentes que aparecen en las columnas en cada grupo indican que hay diferencias significativas dentro de cada grupo entre los distintos tratamientos ($P < 0,05$).

Figura 25. Porcentaje de actividad insecticida residual (HearSP1B:LB6, HearSP1, Spintor, Turex y Dursban) presente en hojas de tomate en cultivo al aire libre a lo largo del tiempo, respecto a la cantidad de insecticida presente en las hojas de tomate a una hora después de la aplicación de los tratamientos. Las barras verticales indican el error estándar.

Figura 26. Cantidad de actividad insecticida residual por gramo de hoja de tomate en cultivo al aire libre 1, 72, 168 y 240 horas (0, 3, 7 y 10 días) después de la aplicación de los tratamientos: A) HearSP1B:LB6 (cuerpos de oclusión), B) HearSP1 (cuerpos de oclusión), C) Spintor (μ l), D) Turex (mg) y E) Dursban (mg). Las barras verticales indican el error estándar.

Descripción detallada de la invención

El objeto de la presente invención se refiere a la obtención de nuevos genotipos del nucleopoliedrovirus simple de *Helicoverpa armigera* (Fig. 5). Dichos genotipos se han aislado de dos maneras diferentes:

- i) a partir del aislado HearSNPV-SP1 (o, de forma más abreviada HearSP1), mediante un ensayo de placa con cultivo celular *in vitro*. Los genotipos presentes en dicho aislado, diferentes de todos los aislados y genotipos caracterizados hasta el momento, se han denominado HearSNPV-SP1A y HearSNPV-SP1B (o, de forma abreviada, HearSP1A y HearSP1B).
- ii) a partir de larvas muertas durante una epizootia en laboratorio en la segunda generación de una población de *H. armigera* procedente de un cultivo de algodón de Lebrija (Sevilla). Los genotipos obtenidos de dichas larvas, distintos de todos los aislados y genotipos caracterizados hasta el momento, se han denominado HearSNPV-LB1, HearSNPV-LB2, HearSNPV-LB3, HearSNPV-LB4, HearSNPV-LB5 y HearSNPV-LB6 (o, de forma más abreviada, HearLB1, HearLB2, HearLB3, HearLB4, HearLB5 y HearLB6). Cada uno de estos genotipos procede de una larva individual muerta por dicha epizootia. La ausencia de bandas submolares en los perfiles de restricción, sugiere que estos genotipos son genotipos puros ya que dichas bandas submolares se producen por la presencia de varios genotipos en distintas proporciones. Sin embargo, con el fin de tener la certeza de su pureza, se llevó a cabo la clonación *in vitro* de los distintos aislados mediante ensayo de dilución límite (end point dilution, EPD). Dicha clonación y su posterior análisis mediante enzimas de restricción, confirmó la pureza de los mismos, demostrando que cada una de las larvas había muerto por la infección de un único genotipo.

Por otro lado, los perfiles de restricción obtenidos tras la digestión del genoma de cada uno de estos genotipos con distintas enzimas (endonucleasas) de restricción confirmaron que se trataban de genotipos diferentes (HearSP1A, HearSP1B, HearLB1, HearLB2, HearLB3, HearLB4, HearLB5 y HearLB6) (Fig. 7) y además eran diferentes a otros aislados y genotipos caracterizados hasta el momento (Tabla 4), como los genotipos chinos HearC1 y HearG4 (Fig. 2), el aislado procedente de Kenia HearNNG1 (Fig. 3) y los aislados de la Península Ibérica HearSP1, HearSP2, HearSP4, HearSP7, HearSP8, HearPT1 y HearPT2 (Fig. 4).

De los distintos genotipos encontrados, se seleccionaron dos de ellos, denominados HearSP1B y HearLB6, que pueden distinguirse fácilmente unos de otros y diferenciarse de otros aislados y genotipos de HearSNPV por los perfiles obtenidos al tratar sus genomas con enzimas de restricción, como pueden ser *EcoRI* y *BglII*. En las figuras 2, 3, 4 se

muestran los perfiles de restricción obtenidos para los aislados de HearSNPV caracterizados previamente, mientras que en la figura 7 se muestran los perfiles de restricción de los genotipos HearSP1A, HearSP1B, HearLB1, HearLB2, HearLB3, HearLB4, HearLB5 y HearLB6, así como los correspondientes a los aislados españoles HearSP1, HearSP2, HearSP4, HearSP7 y HearSP8, a los aislados portugueses HearPT1 y HearPT2, y al genotipo chino HearG4. La diferenciación se basa en la presencia de fragmentos polimórficos característicos en los perfiles de restricción de cada genotipo o aislado. Las bandas submolares (bandas que contienen una menor cantidad de moléculas que el resto de las bandas del mismo perfil de DNA) indican la presencia de una mezcla de aislados como se observa en el caso de HearSP1 en la Figura 7A. Otro ejemplo es el genotipo HearSP1B que al ser digerido con la enzima *NdeI* muestra una banda de 9,73 kb que no se observa en el perfil del aislado HearSP1 (Figura 8B). Además, el aislado HearSP1 muestra varias bandas submolares en torno a 6,5-7 kb, que no se observan en el perfil del genotipo puro HearSP1B (Figura 8B). Por otro lado, en los perfiles obtenidos con la endonucleasa *BglII*, el aislado HearSP1 muestra una banda submolar de 18,8 kb que no se observa en el perfil del genotipo HearSP1B. La presencia de dichas bandas submolares pone de manifiesto que el aislado silvestre HearSP1 está compuesto por una mezcla heterogénea de genotipos.

Con el fin de diferenciar más claramente los genotipos HearSP1B y HearLB6, y diferenciarlos también de otros aislados de HearSNPV cuyos genomas han sido completamente secuenciados (HearG4, HearC1, HearNNg1 y HearAus), se muestran en la Tabla 4 los valores numéricos de los tamaños de los fragmentos de restricción generados tras digerir dichos aislados y genotipos con la endonucleasa *EcoRI*.

Tabla 4: Tamaños (kb) estimados de los fragmentos de ADN generados tras la digestión del ADN genómico de distintos aislados y genotipos con la endonucleasa *EcoRI* y tamaño total estimado de los genomas. Los fragmentos de ADN se nombran alfabéticamente, siendo el fragmento A el de mayor tamaño.

Fragmento	Tamaño (kb)					
	HearSP1B	HearLB6	HearG4	HearC1	HearNNg1	HearAus
A	13,54	13,55	14,13	14,13	13,51	13,44
B	10,18	10,50	13,45	12,84	10,20	10,15
C	9,73	9,74	10,15	9,75	9,73	9,48

D	9,20	9,38	9,05	9,05	9,20	9,06
E	8,21	8,26	6,64	6,91	8,23	8,23
F	6,52	6,45	6,36	6,54	6,60	6,68
G	6,30	6,29	6,29	6,30	6,30	6,28
H	6,15	5,98	5,99	6,00	6,23	6,00
I	5,98	5,93	5,84	5,84	6,00	5,94
J	5,93	5,85	5,84	5,84	6,00	5,84
K	5,84	5,84	5,67	5,67	5,80	5,84
L	5,69	5,68	4,75	4,74	5,80	5,70
M	5,25	5,25	4,58	4,65	5,70	4,83
N	4,73	4,73	4,42	4,57	4,75	4,75
O	4,57	4,57	4,40	4,41	4,57	4,57
P	4,42	4,42	4,14	4,40	4,41	4,41
Q	4,40	4,40	3,68	4,14	4,40	4,40
R	3,34	3,32	3,36	3,36	3,34	3,68
S	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,35
T	2,83	2,83	2,83	2,83	2,83	3,00
U	1,74	1,01	1,74	1,74	1,74	1,74
V	1,01	0,98	1,48	1,00	1,00	1,00
X	0,97	0,78	1,00	0,78	0,80	0,80
Y	0,78	0,48	0,78	0,48	0,48	0,48
Z	0,47	0,45	0,48	0,45	0,45	0,45
a	0,45	0,42	0,45	0,42	0,41	0,41
b	0,42	0,41	0,41	0,41	0,41	0,30
c	0,41	0,31	0,31	0,31	0,31	0,18

d	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,02
e	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	
f						
Total	132,26	130,99	131,42	130,76	132,4	131,01

Al realizar la comparación de los datos reflejados en la Tabla 4, se observa que hay diferencias en el número y tamaño de los fragmentos, lo que indica que los genotipos HearSP1B y HearLB6 son diferentes de los ya conocidos y, por tanto, nuevos. Por ejemplo, el fragmento *EcoRI*-B del genotipo HearLB6 (10,50 kb) es mayor que el del genotipo HearSP1B (10,18 kb). El fragmento *EcoRI*-F (6,45 kb) del genotipo HearLB6 no se encuentra en los perfiles de HearSP1B ni en los de los genotipos secuenciados. Sin embargo, el fragmento *EcoRI*-U (1,74) del genotipo HearSP1B no aparece en el perfil del genotipo HearLB6, pero si aparece en los genotipos secuenciados. Esto mismo puede observarse en la figura 7.

Los genotipos HearSP1B y HearLB6 también se diferencian entre sí y respecto a otros aislados y genotipos de HearSNPV descritos en la literatura, por las secuencias de nucleótidos específicas que cada uno presenta en regiones concretas del genoma. Puede utilizarse, por ejemplo, la región del genoma conocida como región homóloga 1 (hr1), tomando como referencia la secuencia correspondiente de los genomas de dos aislados de China, HearG4 (Chen et al., 2001; con el número de acceso en GenBank AF271059) y HearC1 (Zhang et al., 2005; GenBank AF303045), de un aislado de Kenia, HearNNG1 (Ogembo et al., 2007; GenBank AP010907) y de un aislado de Australia, HearAus (GenBank JN584482). También puede recurrirse a la región en la que se encuentra la hr5 (región homóloga 5).

Así, una diferenciación rápida y precisa de cada uno de estos dos genotipos puede obtenerse empleando la técnica de la amplificación por PCR y posterior digestión con la endonucleasa de restricción *NdeI* de los fragmentos amplificados utilizando cebadores específicos que amplifican, por ejemplo, en una de las siguientes regiones alternativas:

- i) La región homóloga 1, hr1. En esta región del genoma de HearSNPV, se ha comprobado que los cebadores específicos F-hr1 (5'-CGAAATCGACAACACCATGCA-3') y R-hr1 (5'-ACTTTTGTACGCCAGAGACGA-3') amplifican un fragmento de 2.177 y 2.117 nucleótidos para los genotipos HearSP1B y HearLB6, respectivamente. La digestión de estos fragmentos amplificados con la

endonucleasa de restricción *NdeI* produce perfiles únicos para cada genotipo: siendo para HearSP1B de seis fragmentos de 857, 508, 381, 306, 78 y 47 nucleótidos o de cinco fragmentos de 1.210, 475, 307, 78 y 47 nucleótidos en el caso de HearLB6. A su vez estos perfiles son diferentes de los obtenidos para los genotipos secuenciados (Tabla 6, Fig. 8B). Concretamente y a modo de ejemplo, en la Figura 8B se aprecia como las banda de 508 y 381 nucleótidos no coinciden con ninguna otra banda del gel, al estar las bandas del aislado HearSP1 levemente por encima, indicando un tamaño superior a los de HearSP1B.

- ii) En la región homóloga 5, hr5. En esta región del genoma de HearSNPV, se ha comprobado que los cebadores específicos F-hr5 (5'-CTAGCCGGTCCGTTTCTGTT-3') y R-hr5 (5'-GCCCCACCCAAAACATAACG-3') amplifican un fragmento de 2.326 y 2.330 nucleótidos para los genotipos HearSP1B y HearLB6, respectivamente. En este caso, la digestión de estos fragmentos amplificados con la endonucleasa de restricción *NdeI* también produce perfiles únicos para cada genotipo: siendo de cinco fragmentos de 1.120, 917, 211 y 78 nucleótidos para HearSP1B ó de tres fragmentos de 1.120, 998 y 212 nucleótidos para HearLB6. A su vez estos perfiles son diferentes de los obtenidos para los genotipos secuenciados (Tabla 6, Fig. 8B).

La figura 8, en su panel A, muestra la fotografía obtenida tras someter a electroforesis los fragmentos amplificados por PCR utilizando los cebadores específicos para las regiones hr1 y hr5. En el panel B se muestra la fotografía tras someter a electroforesis los fragmentos obtenidos tras digerir con la endonucleasa *NdeI* los fragmentos amplificados por PCR para la hr1 y la hr5, del punto anterior. En dicha fotografía puede apreciarse que los fragmentos obtenidos para cada genotipo son diferentes y distinguibles unos de otros. También puede apreciarse que los fragmentos obtenidos para cada genotipo son diferentes y distinguibles unos de otros. Por ejemplo, en el caso de la hr1, el fragmento de 1.210 bp es característico del genotipo HearLB6, mientras que el genotipo HearSP1B presenta un fragmento característico de 857 bp. En el caso de la hr5, el genotipo HearSP1B presenta un fragmento de 917 bp, mientras que el genotipo HearLB6 presenta uno de 998 bp.

De esta forma, con una única reacción de PCR seguido de una digestión con la endonucleasa *NdeI* pueden diferenciarse los distintos genotipos entre sí y con respecto a cualquier otro genotipo del virus descrito en la literatura (véase la Tabla 6 más adelante, en el Ejemplo 2).

En el caso de aislados naturales o de mezclas artificiales que puedan contener mezclas de genotipos, la proporción de los dos genotipos HearSP1B y HearLB6 en la mezcla puede determinarse mediante una PCR cuantitativa, utilizando cebadores específicos para cada

uno de los genotipos, como se menciona posteriormente en la sección de materiales y métodos de ejemplos.

Por otro lado la secuenciación de dichos fragmentos generados por PCR también permitiría comprobar la identidad de los distintos genotipos en la mezcla. Así, las secuencias representadas por SEQ ID NO:5 y SEQ ID NO:6 corresponden a las secuencias de los fragmentos amplificados utilizando los cebadores F-hr1 y R-hr1 que amplifican en la hr1 de los genotipos HearSP1B y HearLB6, respectivamente, mientras que las SEQ ID NO:7 y SEQ ID NO:8 se corresponden con las secuencias de los fragmentos amplificados para la hr5, para los mismos genotipos.

Tal como se comenta más adelante, se ha obtenido la secuencia del genoma completo de cada uno de esos dos genotipos HearSP1B y HearLB6, secuencias que se muestran, respectivamente, como SEQ ID NO:13 y SEQ ID NO:14 y que pueden utilizarse para diferenciar unos genotipos de otros. En concreto, por su variabilidad, se muestran de forma individualizada las secuencias completas de las zonas de variabilidad correspondientes a la región homóloga 1 (hr1) (SEQ ID NO:9 y SEQ ID NO:10, correspondientes, respectivamente, a los genotipos HearSP1B y HearLB6) y a la región homóloga 5 (hr5) (SEQ ID NO:11 y SEQ ID NO:12, correspondientes, respectivamente, a los genotipos HearSP1B y HearLB6). Tanto en el caso de la región homóloga 1 (hr1) como la 5 (hr5) dichas secuencias se indican en el sentido en el que aparecen en la secuencia del genoma completo. Al ser zonas intergénicas, localizadas entre dos pautas de lectura abiertas, no hay una dirección codificante como ocurre en las pautas de lectura. Éstas últimas pueden transcribirse en sentido (secuencia codificante) o antisentido (secuencia complementaria a la secuencia codificante).

En la presente invención, se han obtenido las secuencias completas del genoma de cada uno de estos dos genotipos HearSP1B (SEQ ID NO:13) y HearLB6 (SEQ ID NO:14), rasgo característico y definitorio de cada uno de ellos. Por ello, dichos genotipos quedan descritos en la presente solicitud de tal manera que un experto puede reproducir la invención. Además, las secuencias completas de cada uno de los genomas se complementan con los datos que se aportan en la presente solicitud de que el nucleopoliedrovirus de *Helicoverpa armigera* es un nucleopoliedrovirus de tipo simple (SNPV), es decir, cada partícula vírica completa o virión contiene una única nucleocápsida, y por lo tanto, una única copia del genoma del nucleopoliedrovirus. También se aportan datos adicionales para identificar cada uno de los genotipos según el perfil obtenido tras digerir su genoma con distintas endonucleasas de restricción, así como por el tamaño y la secuencia de los fragmentos obtenidos al amplificar por PCR las zonas de variabilidad de las regiones homólogas 1 y 5

(hr1 y hr5), utilizando los cebadores de SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:3 y SEQ ID NO:4, respectivamente, como por el patrón de bandas obtenidos tras digerir estos fragmentos de PCR con la enzima *NdeI*. En los Ejemplos también se muestran datos sobre la actividad insecticida de cada genotipo y de mezclas de cuerpos de oclusión que contienen viriones co-ocuidos de distintos genotipos dentro de un mismo cuerpo de oclusión, así como la forma de obtener las distintas mezclas. Las diferencias en la patogenicidad, virulencia y productividad resultan ser significativas entre genotipos, y entre las mezclas de los genotipos de la invención, siendo la mezcla de los dos genotipos HearSP1B y HearLB6, en proporción 1:1, más patogénica que el resto de genotipos y mezclas e igual de virulenta que los genotipos más rápidos.

El gran número de combinaciones de genotipos posibles y las diferencias entre las mismas en cuanto a su potencia relativa, hace que en ningún caso se hubiera podido predecir *a priori* que la combinación de la presente invención pudiera dar mejores resultados que el resto.

De todas las mezclas de genotipos construidas, la mezcla HearSP1B:LB6 en proporción 1:1 fue la que presentó los efectos con actividad sinérgica más deseables desde el punto de vista bioinsecticida. Sin embargo, esta actividad sinérgica no se observa en otras muchas mezclas de genotipos (en la que simplemente puede darse un efecto aditivo o incluso antagonista) y no hay forma de predecir en qué mezclas se va a producir dicha actividad. Es un resultado que no es obvio o predecible, más aún teniendo presente que los genotipos provienen de distintas zonas geográficas (Badajoz y Lebrija) y que ambos genotipos (HearSP1B y HearLB6) no habían sido obtenidos puros, hasta la fecha, a partir de mezclas silvestres complejas como los aislados de campo.

Además, se aportan datos sobre el depósito de los dos genotipos según el Tratado de Budapest, posibilitando la referencia a dichos genotipos por su número de depósito: CNCM I-4806 (HearSP1B) y CNCM I-4807 (HearLB6).

Respecto a las posibles aplicaciones de los nucleopoliedrovirus de la presente invención, se ha comprobado que cada uno de los nuevos genotipos HearSP1B y HearLB6 posee una actividad insecticida específica frente a las larvas de *H. armigera*, que pueden considerarse todas ellas comparables a las de los insecticidas químicos, como Dursban y Spintor, o a las de tipo biológico basados en *Bacillus thuringiensis*, como Turex, comúnmente utilizados frente a *H. armigera*. Pero se ha encontrado además que la mezcla de los dos genotipos HearSP1B:LB6 en una proporción concreta (1:1), como cuerpos de oclusión que incluyen ODVs que han quedado co-ocuidos de forma que un mismo cuerpo de oclusión puede contener distintos genotipos del HearSNPV, posee una actividad insecticida mejor que la de

cada uno de los genotipos individuales o que cualquiera de los aislados silvestres de HearSNPV actualmente conocidos, puesto que presenta mayor patogenicidad que el resto de genotipos y mezclas, y el mismo tiempo medio de mortalidad (TMM) que los genotipos más rápidos. Esto supone una ventaja significativa, puesto que los mayores inconvenientes a la hora de desarrollar los baculovirus como materia activa de bioinsecticidas son su patogenicidad y su velocidad de acción. Por otro lado, este virus se puede producir en poco tiempo ya que inoculando 100 larvas recién mudadas al quinto estadio (L_5) e incubándolas con dieta a 30°C, se consiguen del orden de 5×10^{11} cuerpos de oclusión en un periodo de tiempo de unos 5 o 6 días.

Además los ensayos en planta de tomate, tanto en laboratorio como en invernadero o al aire libre, han puesto de manifiesto que concentraciones del orden de 10^{13} cuerpos de oclusión/hectárea del nucleopoliedrovirus de la presente invención son capaces de controlar de forma efectiva las plagas producidas por las larvas de esta oruga, con la misma eficiencia que los insecticidas que se utilizan habitualmente para combatir esta plaga en cultivo de tomate (Spintor, a base de dos toxinas spinosinas (spinosad); Turex, a base de *Bacillus thuringiensis* var. Aizawai; y Dursban, a base del insecticida químico clorpirifos). Dichas aplicaciones consiguen una reducción significativa del número de frutos dañados cosechados, tanto verdes como maduros, respecto al tratamiento control, y no presentan diferencias con el resto de insecticidas comúnmente usados.

El hecho de que el espectro de huéspedes de los baculovirus esté restringido a invertebrados, y la gran especificidad de HearSNPV en particular (que parece afectar sólo a larvas de unas pocas especies de polillas del género *Helicoverpa*, todas ellas muy relacionadas filogenéticamente) hace que el producto represente una tecnología limpia y segura, ya que no deja residuos tóxicos sobre los suelos ni las cosechas y no es tóxico para el hombre ni otros animales, incluidos los enemigos naturales como parasitoides o depredadores.

Sorprendentemente, los resultados presentados en la presente solicitud de patente demuestran que la mezcla co-ocluida de estos dos genotipos clonados (HearSP1B y HearLB6) en una proporción 1:1 se encuentra entre los nucleopoliedrovirus más activos de entre los que han sido desarrollados como bioinsecticidas hasta la fecha.

Al tratarse de aislados de HearNPV nativos de la Península Ibérica, HearSP1B y HearLB6 están mejor adaptados a las condiciones medioambientales reinantes en el sur de Europa que los aislados procedentes de otros orígenes geográficos. Este hecho es especialmente significativo teniendo en cuenta el efecto negativo que ejerce la radiación UV sobre los depósitos de una aplicación del bioinsecticida, que requiere que los NPV se mantengan

activos hasta el momento de la ingestión por parte de *H. armigera* donde pueden ejercer su efecto insecticida. Además, se ha observado que existe cierta predisposición a que los aislados naturales de una determinada zona geográfica sean más patogénicos y virulentos para las larvas propias de la misma zona.

Una ventaja adicional de estos nucleopoliedrovirus es que se pueden producir masivamente. Sus cuerpos de oclusión, en los cuales radica la actividad insecticida, pueden producirse de forma masiva *in vivo* inoculando larvas de *H. armigera* con cuerpos de oclusión previamente obtenidos tras la infección oral de larvas con las mezclas 1:1 de los cuerpos de oclusión puros HearSP1B y HearLB6. Los cuerpos de oclusión pueden contener viriones de uno cualquiera de los genotipos HearSP1B o HearLB6, si se quieren obtener cuerpos de oclusión con viriones de un único genotipo, o mezclas de los mismos, si se quieren obtener viriones de distintos genotipos co-ocuidos dentro de un mismo cuerpo de oclusión. El procedimiento concreto utilizado para la producción de los nuevos cuerpos de oclusión puede ser cualquiera de los conocidos por los expertos en la materia o el mismo que se ha utilizado en los Ejemplos de la presente solicitud descritos más adelante. En dichos Ejemplos se describe también un ejemplo de la composición de la dieta artificial, la cual es compatible con el procedimiento de producción de cuerpos de oclusión de la presente invención. Así, el procedimiento de producción de cuerpos de oclusión puede comprender las etapas de:

- i) alimentar larvas de quinto estadio de *H. armigera* con una dieta artificial que comprende cuerpos de oclusión del nucleopoliedrovirus de *H. armigera* que contienen viriones de uno cualquiera de los genotipos HearSP1B (CNCM I-4806) y HearLB6 (CNCM I-4807) o mezclas de los mismos;
- ii) mantener las larvas individualizadas a 30°C hasta que se produce su muerte;
- iii) purificar los cuerpos de oclusión generados en las larvas triturando los cadáveres de las larvas en agua, filtrando la suspensión resultante, precipitando los cuerpos de oclusión, lavando el precipitado y volviendo a precipitarlos;
- iv) resuspender el precipitado final en agua a pH neutro;
- v) opcionalmente, almacenar la suspensión obtenida en una de las siguientes condiciones:
 - a) a temperatura ambiente
 - b) en refrigeración

- c) liofilizar la suspensión y conservarla a temperatura ambiente.

Tal como se utiliza en la presente solicitud, se entiende por condiciones de refrigeración aquellas en las que el producto se mantiene entre 0°C y 8°C, y condiciones de congelación corresponderían al mantenimiento por debajo de 0°C. Para los efectos de la presente invención, se prefiere que las condiciones de refrigeración se mantengan entre 0°C y 6°C y las de congelación entre -20°C y -80°C.

También puede llevarse a cabo la producción de dichos cuerpos de oclusión alimentando las larvas de quinto estadio con una solución acuosa, que contiene sacarosa al 10% junto con la mezcla co-ocluida seleccionada a una concentración letal al 95% (CL₉₅). Este método fue descrito por Hughes y Wood en 1986, y consiste en administrar en forma de gotas una suspensión que contiene suspendidos los cuerpos de oclusión a la concentración deseada, así como un colorante que indica si las larvas han ingerido la gota, como es el colorante alimenticio de color azul Fluorella blue (Hilton-Davis, Cincinnati, Ohio). Este método es menos engorroso que el anterior, ya que en el de la dieta artificial hay que impregnar bien la dieta con la suspensión viral, y lleva más tiempo la preparación de los taquitos de dieta impregnados de virus.

La dieta artificial mediante la cual las larvas son alimentadas o infectadas se administra en forma sólida, mediante pastillas que adicionalmente a los cuerpos de oclusión del nucleopoliedrovirus de *Helicoverpa armigera* (cuando el objetivo sea la infección de dichas larvas) contienen 7,2% germen de trigo, 2,5% proteína de soja, 1,4% levadura de cerveza, 1,9% agar, 2,9% azúcar, 1% sales mixtas, 0,1% colesterol, 0,4% ácido ascórbico, 0,2% ácido sórbico, 0,02% estreptomina, 0,04% clortetraciclina hidróclorido, 0,1% nipagina, 0,1% nipasol, 0,2% ácido benzoico, 0,1% cloruro de colina, 0,01% vitaminas, 15% agar y 80% agua destilada. Las larvas pueden ser infectadas administrándose los cuerpos de oclusión tanto en una suspensión acuosa en forma de gotas o como dieta artificial en forma sólida. Normalmente se prepara un volumen de varios litros de dieta, mezclando los ingredientes mencionados anteriormente, que posteriormente se autoclava para esterilizar y permitir que el agar se disuelva, y antes de que se enfríe totalmente (a una temperatura de 50°C) se incluyen los antibióticos, y tras mezclarlos bien se hacen alícuotas de la misma en placas Petri cuadradas de 120x120 mm. Posteriormente, la dieta de las placas Petri se corta en cubos de 5x5 mm.

En el Ejemplo 4 de la presente solicitud se muestra el método de producción masiva puesto a punto para el sistema huésped-patógeno descrito en esta solicitud, *H. armigera*-HearSNPV. Hay muchos factores que pueden influenciar la producción final de cuerpos de oclusión, como puede ser el estadio larvario, la concentración del inóculo inicial, o incluso la

temperatura. Dichos parámetros pueden modificarse de forma que se obtienen distintas producciones finales. En los ensayos realizados en nuestro laboratorio se ha comprobado que se tiene preferencia por unas condiciones determinadas puesto que son con las que se obtienen mejores resultados y por tanto mayor producción final de cuerpos de oclusión. A continuación se muestran los distintos parámetros que se pueden modificar indicando la preferencia de los mismos:

- i) larvas de *H. armigera* de los estadios tercero (L_3), cuarto (L_4) y quinto (L_5), aunque se tiene preferencia por las larvas del quinto estadio;
- ii) distintas concentraciones de cuerpos de oclusión suministrados en la dieta artificial, como demuestran los ensayos con distintas concentraciones del rango de $5,5 \times 10^6$ a $1,5 \times 10^8$ cuerpos de oclusión/ml, aunque se tiene preferencia para las larvas L_5 la concentración de $1,5 \times 10^8$ cuerpos de oclusión/ml;
- iii) larvas individualizadas en placas de 12 pocillos, para evitar el canibalismo,
- iv) larvas incubadas a 30°C hasta el momento de su muerte.

El estudio de distintas edades larvarias y distintas dosis virales demostró que la producción óptima de cuerpos de oclusión se obtiene cuando se tratan larvas recién mudadas al quinto estadio, inoculando las larvas con una concentración cercana a la concentración que da lugar a la muerte del 95% de las larvas de dicho estadio (CL_{95}), que en este caso es una concentración de $1,5 \times 10^8$ cuerpos de oclusión/ml, y manteniéndolas de manera individualizada, debido al alto grado de canibalismo que presentan las larvas de esta especie, con dieta a 30°C hasta su muerte. Estas condiciones permiten obtener aproximadamente 5×10^9 cuerpos de oclusión/larva en un periodo de 5 a 6 días. Así, infectando 100 larvas se obtendrían del orden de 5×10^{11} cuerpos de oclusión.

Los cuerpos de oclusión producidos en larvas de *H. armigera* pueden ser purificados, formulados de forma sólida o líquida y pulverizados como suspensiones acuosas, las cuales protegen de forma muy efectiva a los cultivos de tomate, tanto en invernadero como al aire libre, de las plagas ocasionadas por larvas de *H. armigera*.

El nucleopoliedrovirus también podrá ser aplicado mediante otros métodos, como pulverización a nivel de tierra o aérea, o aplicación en suspensión, en forma de polvo, o riego. Además, como se ha expuesto anteriormente, los cuerpos de oclusión pueden estar mezclados con excipientes, y usados con vehículos apropiados en el sector agrícola, especialmente aquellos que faciliten la preparación en la forma adecuada para el método de aplicación que se desee. En la misma composición también puede haber, por ejemplo, un

abono, un fertilizante o un plaguicida. Además, también puede contener un agente potenciador del efecto patógeno del nucleopoliedrovirus sobre *H. armigera*.

Es conveniente incluir mojantes agrícolas a los productos que incluyen estos cuerpos de oclusión, como es el caso del producto comercial Agral® (Syngenta), que se utiliza en Ejemplos de la presente solicitud. El compuesto mojante presente en el producto es el alcohol isotridecílico etoxilado, que aumenta la acción biológica de los insecticidas, herbicidas, fungicidas y pesticidas en general, ya que se consigue una mejor cobertura y penetración del producto en el cultivo a tratar. En la página web en la que se describen sus características

(http://www.syngenta.com/country/es/sp/productos/proteccion_cultivos/mojantes/Paginas/agral.aspx) se indica que se trata de un mojante y dispersante tensoactivo no iónico, especialmente indicado para mezclar con toda clase de insecticidas, fungicidas y agroquímicos.

También es otro caso de especial interés aquel en el que la composición contiene otro plaguicida, de forma que se aumenta el espectro de acción a otras posibles plagas que afecten a los mismos cultivos, sin restringirlo únicamente a *H. armigera*. El plaguicida puede ser, por ejemplo, otro insecticida biológico, como los basados en *Bacillus thuringiensis* (Bt) previamente mencionados el caso del producto Turex® utilizado posteriormente en el Ejemplo 6 de la presente solicitud, que se utiliza para cultivos atacados por *H. armigera*. La mezcla con insecticidas basados en Bt es interesante, ya que se han descrito casos de interacciones sinérgicas de la actividad insecticida entre dichos productos y los baculovirus frente a noctuidos (Granados et al., 2001).

En los ensayos descritos en los Ejemplos de la presente solicitud que se describen más adelante se muestra que cada uno de estos dos genotipos posee una actividad insecticida característica frente a las larvas de *H. armigera*, determinada por la patogenicidad, el tiempo medio de mortalidad (TMM) y por la capacidad de producir cuerpos de oclusión en las larvas de *H. armigera*.

En trabajos realizados previamente en el grupo de investigación de los presentes inventores se ha observado que las mezclas de cuerpos de oclusión o mezclas de viriones co-ocuidos en un mismo cuerpo de oclusión en ocasiones presentan mejores cualidades insecticidas que los genotipos individuales (Bernal et al., 2013b; López-Ferber et al., 2003; Simón et al., 2005) o incluso que el aislado silvestre (Muñoz et al., 1998). Por otro lado, las mezclas de viriones de distintos genotipos co-ocuidos en el mismo cuerpo de oclusión pueden tener una actividad diferente a la mezclas de cuerpos de oclusión donde los viriones de cada cuerpo de oclusión pertenecen a un único genotipo (López-Ferber et al., 2003), dado que puede

haber sinergismo o antagonismo entre algunos genotipos. Por ello, en la presente invención se ha realizado el estudio de la actividad insecticida de distintas mezclas de viriones co-ocuidos en un mismo cuerpo de oclusión, para comprobar si dichas mezclas presentaban características insecticidas diferentes a los cuerpos de oclusión de un único genotipo, si los genotipos presentaban actividad antagónica o sinérgica, y determinar las variaciones que pudieran darse entre distintas combinaciones y distintos tipos de mezclas.

La mezcla de los dos genotipos HearSP1B:LB6, co-ocuidos en el mismo cuerpo de oclusión en la proporción 1:1 (es decir cada uno de esos cuerpos de oclusión contiene los dos genotipos en esa proporción), en contra de lo esperado se vio que tiene una actividad insecticida en términos de patogenicidad, mayor que la de los genotipos individuales. Pero, por otra parte, su virulencia (TMM) es similar a la de los genotipos más rápidos matando a las larvas. Por esta razón, se seleccionaron para su aplicación estos genotipos, en su forma co-ocuida en un mismo cuerpo de oclusión, frente a los restantes genotipos individuales aislados de HearSNPV.

En el Ejemplo 3 de la presente invención se describen los ensayos de la actividad insecticida de los diferentes genotipos y mezclas, que sorprendentemente demuestran que los nuevos nucleopoliedrovirus aislados, y en especial su combinación, se encuentran entre los insecticidas biológicos con mayor actividad contra plagas de insectos. Por ello, se propone su uso como insecticida, particularmente para el control de insectos de los géneros sobre los que se conoce que actúa, *Helicoverpa* o *Heliothis*, con especial preferencia por el uso para el control de *H. armigera*.

De entre las combinaciones elegidas, no existe ningún tipo de experiencia y/o predicción anticipada que sugiera que la combinación de ambos genotipos vaya a mostrar unos resultados en cuanto a la potencia relativa notablemente superiores al resto de aislados. La actividad sinérgica que ocurre en el caso de HearSP1B:LB6 no se observa en muchas otras mezclas de genotipos, dándose incluso casos en los que se produce un efecto claramente antagónico. Dicha actividad es sorprendente al no ser esperable la actividad sinérgica de dos genotipos distintos que de modo natural se encuentran en zonas geográficas alejadas.

Las plantas en las que se aplique este formulado pueden ser cualquiera que dañe esta especie de lepidóptero y donde se quieran controlar los daños producidos por este insecto, tanto si crecen o se cultivan en invernadero como al aire libre, destacando los cultivos de tomate, especialmente en la Península Ibérica, donde se ha comprobado su efectividad, tanto en cultivo de tomate en invernadero como al aire libre.

Teniendo en cuenta todos estos datos, puede decirse que:

- i) cada uno de los nuevos genotipos aislados, HearSP1B y HearLB6 es nuevo, pues cada uno de ellos es distinto de los otros genotipos y diferente de los nucleopoliedrovirus de *H. armigera* hasta ahora conocidos, de los cuales puede distinguirse tanto por las diferencias en la secuencias de sus genomas (particularmente, en las zonas de las regiones homólogas 1 y 5, hr1 y hr5) así como por las diferencias en los perfiles generados por la digestión con enzimas de restricción de dichos genomas, en particular *EcoRI* y/o *BglII*.
- ii) los dos nuevos genotipos aislados comparten, entre otras, las características técnicas de:
 - a) su actividad insecticida y su productividad, de forma individual, es superior o igual a la de cualquiera de los aislados naturales previamente conocidos;
 - b) sus mezclas, en particular la mezcla co-ocluida de los dos, HearSP1B:LB6, en proporción 1:1, presenta una patogenicidad y virulencia frente a la larvas de *H. armigera* mejor o igual que la de los aislados silvestres de este virus y comparable a la de los insecticidas (aunque sin los inconvenientes) que se usan habitualmente contra esta plaga, como los insecticidas comercializados bajo el nombre Dursban®, Spintor® o el insecticida biológico basado en Bt, Turex®;
 - c) dado que los dos genotipos han sido aislados en zonas geográficas relativamente próximas, es de esperar que sean especialmente activos frente a las posibles variantes de *H. armigera* de dicha zona geográfica, el sur de la Península Ibérica o Andalucía y Extremadura concretamente.

Ejemplos

Para llevar a cabo los ensayos que se describen en la presente solicitud se utilizaron los siguientes materiales y métodos:

- Insectos

No hay cepas o estirpes de *H. armigera* reconocidas oficialmente. Las larvas de *H. armigera* utilizadas para la amplificación de los diferentes virus, para la realización de los bioensayos en laboratorio y para los ensayos en invernadero, se obtuvieron de un cultivo de laboratorio de la Universidad Pública de Navarra (UPNA) establecido a partir de pupas recibidas del Centre for Ecology and Hydrology (NERC-CEH) de Oxford (Reino Unido). La población se mantiene en el insectario de la UPNA a $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, con una humedad relativa del $70\pm 5\%$ y un fotoperiodo de 16:8 (luz: oscuridad). Las larvas se alimentan con una dieta artificial descrita

anteriormente por Greene et al. (1976) y los adultos *ad libitum* con miel diluida al 30% (peso/volumen).

Las larvas de *H. armigera* utilizadas para la realización de los ensayos de campo al aire libre procedían de una infestación natural del cultivo de tomate en Guadajira (Badajoz).

- Aislamiento y amplificación de los cuerpos de oclusión

Los cuerpos de oclusión (occlusion bodies, OBs) o cuerpos de oclusión se extrajeron de larvas muertas triturando los cadáveres en agua bidestilada estéril con dodecil sulfato sódico (SDS) al 0,1% (peso/volumen) y filtrando la suspensión resultante a través de muselina. Los cuerpos de oclusión se sedimentan por centrifugación a 6.000 x *g* durante 10 minutos. Posteriormente se realizaron 2 lavados con agua y se sedimentaron los cuerpos de oclusión en las mismas condiciones. Finalmente, los cuerpos de oclusión purificados se resuspendieron en agua bidestilada estéril y se determinó su concentración mediante un recuento de muestras por triplicado utilizando un hemocitómetro mejorado de Neubauer (Hawksley, Laucing, Reino Unido) bajo microscopía de contraste de fases a 400x.

Los cuerpos de oclusión de los diferentes aislados se multiplicaron mediante un único pase en larvas de cuarto estadio de *H. armigera*. Grupos de 24 larvas procedentes de la colonia de laboratorio se individualizaron y mantuvieron sin alimento durante aproximadamente 12 horas. Pasado ese tiempo fueron infectadas *per os* mediante el método de la gota (Hughes y Wood, 1981) con una concentración de 10⁶ cuerpos de oclusión/ml, sacarosa al 10% (peso/volumen) y 0.001% (peso/volumen) del colorante alimenticio Fluorella Blue (Hilton-Davis, Cincinnati, Ohio). El colorante alimenticio permite diferenciar las larvas que han ingerido la suspensión de cuerpos de oclusión de las que no lo han hecho. Las larvas con intestinos azules, y por tanto las que bebieron la suspensión, se criaron de forma individual con dieta artificial hasta su muerte. La ventaja de este método de la gota es que la dosis o concentración viral se ingiere en un corto periodo de tiempo, lo cual es de especial importancia a la hora de calcular algunos parámetros como el tiempo medio de mortalidad (TMM).

Los cuerpos de oclusión purificados se almacenaron a -20°C hasta su caracterización molecular y biológica.

- Purificación de genotipos mediante ensayo de placa

Para realizar la purificación de los distintos genotipos presentes en el aislado HearSP1 se procedió a un ensayo de placa (Muñoz et al., 2001). Para ello, se infectaron oralmente 25 larvas de cuarto estadio de *H. armigera* con la concentración que producía el 90% de

mortalidad (CL_{90}) de 10^6 cuerpos de oclusión/ml. A las 48 horas después de la infección se realizó una pequeña incisión en el último par de pseudópodos de las larvas con el fin de extraer la hemolinfa. En este momento la hemolinfa está llena de BVs (viriones brotados) que contienen una única nucleocápsida y por tanto un único genotipo. La hemolinfa se filtró a través de un filtro de $0,45\ \mu\text{m}$ para eliminar posibles contaminantes como las bacterias, y se diluyó posteriormente de forma seriada con un factor de dilución 5 con medio EX-CELL 420 (Sigma). Posteriormente se incubaron 2×10^6 células HzAM1 en placas de seis pocillos (35 mm de diámetro) a 27°C durante tres horas para permitir la deposición de las células. Pasado este tiempo se sustituyó el medio por $100\ \mu\text{l}$ de las diluciones de hemolinfa. Al cabo de una hora se sustituyó el inóculo viral contenido en las diluciones de hemolinfa por medio EX-CELL 420 nuevo con antibióticos al 1% (penicilina-estreptomicina) (Lonza) y agarosa al 2% para evitar una excesiva propagación de la infección. Al cabo de 5 días se tiñeron las células con rojo neutro con el fin de diferenciar las células sanas de las infectadas, ya que las células sanas se tiñen de una coloración rojiza, mientras que las infectadas dan lugar a una zona no coloreada denominada placa o calva, que se corresponde con un conjunto de células muertas debido a la infección por un único BV, y por tanto, por un único genotipo. Estas zonas de infección única (placas) se extrajeron con una pipeta Pasteur estéril y se diluyeron individualmente en $50\ \mu\text{l}$ de medio EX-CELL 420. Cada suspensión se inyectó posteriormente en larvas de cuarto estadio de *H. armigera* para su multiplicación *in vivo* y así obtener grandes cantidades de cuerpos de oclusión, los cuales se analizaron a nivel de ADN molecular con el fin de determinar el número de genotipos diferentes.

- Purificación de genotipos mediante dilución de punto límite

Para realizar la purificación de los genotipos obtenidos a partir de larvas muertas durante una epizootia en laboratorio en la segunda generación de una población de *H. armigera* procedente de un cultivo de algodón de Lebrija, se infectaron oralmente 25 larvas de cuarto estadio de *H. armigera* con 10^6 cuerpos de oclusión/ml. A las 48 horas después de la infección se extrajo la hemolinfa, se filtró a través de un filtro de $0,45\ \mu\text{m}$, y se diluyó posteriormente de forma seriada con un factor de dilución 5 con medio EX-CELL 420 (Sigma) con antibióticos al 1% (penicilina-estreptomicina) (Lonza). A un volumen de $100\ \mu\text{l}$ de cada dilución se mezclaron $900\ \mu\text{l}$ de una suspensión de células HzAM1 a una concentración de 2×10^5 células/ml. Se añadieron $100\ \mu\text{l}$ de la suspensión virus-células a los 10 primeros pocillos de una fila de una placa de 96, dejando los dos últimos con una suspensión que contenía sólo células (sin virus) como control negativo. Se realizaron un total de cuatro repeticiones. Estas placas se incubaron a 28°C durante 7 días. Pasado ese tiempo, se observaron todos los pocillos al microscopio para determinar la presencia de células infectadas. Los núcleos de las células infectadas se encuentran llenas de cuerpos de

oclusión. En las diluciones en la que se encontró menos de un 10% de los pocillos infectados, indicativo de que la infección del pocillo se ha realizado por único virión brotado (y por tanto un solo genotipo), se extrajo el sobrenadante de dichos pocillos con una pipeta Pasteur estéril. Este sobrenadante contiene viriones brotados (BVs) que se inyectaron en larvas de cuarto estadio de *H. armigera* para su multiplicación, de forma que se obtuvieron cuerpos de oclusión suficientes para poder realizar su caracterización molecular, y poder determinar la pureza de cada genotipo o el número de genotipos diferentes.

- Determinación del número de nucleocápsidas por virión

Para determinar si los viriones derivados de los cuerpos de oclusión (ODVs) de los aislados españoles del nucleopoliedrovirus de *H. armigera* eran de tipo simple o múltiple, se liberaron los ODVs que se encontraban dentro de los cuerpos de oclusión al incubar una suspensión de 10^9 cuerpos de oclusión con una solución alcalina (1 volumen de Na_2CO_3 0,1 M) durante 30 minutos a 28°C. La poliedrina y otros restos se sedimentaron mediante centrifugación a baja velocidad ($2.500 \times g$) durante 5 minutos. Para separar las distintas bandas (si son múltiples) o la única banda (tipo simple) el sobrenadante que contenía los viriones se centrifugó en equilibrio de densidad ($90.000 \times g$) durante 1 hora en un gradiente continuo de sacarosa al 30-60% (peso/volumen). Tras ello, se realizó una inspección visual y se fotografió, de forma que se pudo determinar la naturaleza de los mismos.

- Extracción de ADN y análisis con endonucleasas de restricción

Para extraer el ADN, 100 μl de una suspensión de cuerpos de oclusión a la concentración de 10^9 cuerpos de oclusión/ml se incubaron con 100 μl de carbonato de sodio (Na_2CO_3) 0,5 M, 50 μl de SDS al 10% (peso/volumen) y 250 μl de H_2O a 60°C durante 10 minutos, para disolver la poliedrina y liberar los viriones. Los cuerpos de oclusión no disueltos y otros restos se retiraron mediante centrifugación a baja velocidad ($3.800 \times g$) durante 5 minutos. El sobrenadante que contenía los viriones se incubó con 500 μg de proteinasa K a 50°C durante 1 hora. El ADN viral se extrajo dos veces con un volumen de fenol saturado, seguido de uno con cloroformo, y se precipitó con 1/10 volumen de acetato de sodio 3 M (pH 5,2) y 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío a $12.000 \times g$ durante 10 minutos. Posteriormente, se lavó con etanol frío al 70% y se centrifugó durante 5 minutos. Finalmente, el ADN se resuspendió en 100 μl de tampón TE 0,1x (Tris-EDTA, pH 8) a 60°C durante 10 minutos. La concentración se estimó leyendo la absorción óptica a 260 nm en un espectrofotómetro (Biophotometer Plus, Eppendorf, Freiberg, Alemania).

Para el análisis mediante endonucleasas de restricción, 2 μg del ADN viral, o de los fragmentos amplificados por PCR, se incubaron con 10 U de una de las siguientes enzimas:

EcoRI y *BglII* (Takara Bio Inc., Japón) durante 4 a 12 horas a 37°C. En el caso de los fragmentos de PCR, se utilizó la enzima *NdeI*, del mismo proveedor. Las reacciones se pararon por la adición de 4 µl de tampón de carga (azul de bromofenol al 0,25% (peso/volumen), sacarosa al 40% (peso/volumen)). Las electroforesis se llevaron a cabo utilizando geles horizontales de agarosa al 1% (peso/volumen) en tampón TAE (Tris-acetato 0,04 M, EDTA 0,001 M, pH 8,0) a 20 V durante 12 a 16 horas. Los fragmentos de ADN se tiñeron con bromuro de etidio y se visualizaron sobre un transiluminador de ultravioleta (Chemi-Doc, BioRad, California, EE.UU.).

- Secuenciación completa de los genomas

Para la secuenciación completa de los dos genotipos HearSP1B y HearLB6, se llevó a cabo la purificación de ADN en cloruro de cesio (CICs) (King y Possee, 1997). Inicialmente, se realizó la liberación y purificación de ODVs como se indica en el apartado de determinación del número de nucleocápsidas por virión. Para ello, se mezclaron 500 µl de cuerpos de oclusión (10^9 cuerpos de oclusión/ml) con 500 µl de carbonato de sodio (Na_2CO_3) 0,1 M, y tras centrifugar en un gradiente continuo de sacarosa se obtuvo la única banda para cada uno de los tres genotipos. Con una aguja y jeringuilla de 1 ml se pinchó en el tubo de centrifugación donde se encontraba la banda y se aspiró, de forma que se recogió la totalidad de la banda, es decir, los ODVs de tipo simple. Estos viriones se diluyeron 1:3 en búfer TE (Tris-EDTA, pH 8), y para concentrarlos se sedimentaron a 24.000 rpm durante 1 hora, y se resuspendieron en 400 µl de TE. Para la extracción del ADN, estos 400 µl de viriones purificados se mezclaron con 100 µl de una suspensión que contiene 20% (peso/volumen) de sarcosil (Sodio Lauroil Sarcosina ó *N*-Laurylsarcosine sodium salt, Sigma) y se incubaron a 60°C durante 30 minutos. Esto permitió la lisis de los viriones y ruptura de las nucleocápsidas liberando el ADN al medio. Inmediatamente, se transfirió este lisado sobre 5 ml de una suspensión de cloruro de cesio (50% en TE (peso/peso)) que contenía a su vez 12,5 µl de bromuro de etidio (10 mg/ml), lo que permitió la tinción del ADN y por tanto su visualización, y posteriormente se centrifugó a 35.000 rpm durante al menos 18 h a 20°C. Tras la centrifugación, el ADN era visible como dos bandas naranjas (debido al bromuro de etidio). Las dos bandas se correspondían con el ADN súper-enrollado (la banda de abajo) y ADN abierto circular (la banda de arriba). Mediante el uso de una aguja y jeringuilla de 1 ml se pinchó sobre el tubo y se extrajeron ambas bandas. Una vez extraídas, se retiró el bromuro de etidio con varios pases de butanol. Para ello, se añadió el mismo volumen de butanol, se mezcló y se centrifugó, y se eliminó la fase de arriba que contenía el butanol y el bromuro de etidio. Este paso se repitió varias veces hasta que la solución se vio clara. Finalmente, se dializó la muestra en un vaso de precipitados que contenía 500 ml de búfer TE en agitación a 4°C, realizando entre 2-3 cambios de TE cada 8 h. Tras la diálisis,

se transfirió el ADN a un tubo, se cuantificó en un espectrofotómetro y se guardó a 4°C hasta su uso. También se realizó un análisis de restricción con las endonucleasas *EcoRI* y *BglII* para confirmar la identidad y calidad del ADN.

La secuenciación del ADN de los dos genotipos la llevó a cabo la empresa Lifesequencing S.L. (Paterna, Valencia), mediante la tecnología PacBio. Se utilizaron entre 5 y 10 µg del ADN purificado por CICs. Básicamente, se realizó una librería genómica en un vector de secuenciación con el ADN de cada uno de los genotipos, con insertos de 10kb. Se llevaron a cabo 24.627 y 3.731 lecturas para los genomas de HearSP1B y HearLB6, respectivamente. Finalmente, se realizó el ensamblaje de toda la información, siendo necesario el uso del programa HGAP v2.0.2. Las secuencias completas obtenidas para cada uno de los genotipos se compararon con las ya existentes de otros aislados de HearSNPV (HearSNPV-G4, HearSNPV-C1, HearSNPV-NNg1 y HearSNPV-Aus) y entre sí, usando el programa informático Clone Manager (Scientific & Educational Software, 1994-2007).

- Construcción de las mezclas de genotipos

Con el fin de encontrar la mezcla de genotipos que tuviera las mejores propiedades insecticidas para el control de *H. armigera*, se realizaron mezclas con distintos genotipos. Para ello se seleccionaron cinco genotipos en base a sus características insecticidas con el fin de poder optimizar la actividad biológica y obtener así una mezcla con mayor patogenicidad, virulencia y/o productividad viral. Por un lado, se seleccionaron los dos únicos genotipos obtenidos a partir del aislado HearSP1, HearSP1A y HearSP1B, ya que HearSP1 es el aislado con las mejores características insecticidas contra larvas de *H. armigera* en España (Arrizubieta et al., 2014). Por otro lado, se seleccionaron los siguientes tres genotipos procedentes de larvas infectadas colectadas en Lebrija: HearLB1, porque es uno de los más virulentos y uno de los más productivos en términos de la cantidad de cuerpos de oclusión producidos en insectos infectados: HearLB3 porque es uno de los más rápidos; y HearLB6 por ser el más virulento. En total se hicieron ocho mezclas de genotipos. Entre las que incluyen únicamente los genotipos de HearSP1 encontramos HearSP1A:HearSP1B en proporción 1:1, a la que se hará referencia a lo largo de la presente memoria como HearSP1A:SP1B (1:1) y HearSP1A:HearSP1B en proporción 1:2, a la que se hará referencia como HearSP1A:SP1B (1:2). Por otro lado, también se construyeron cuatro mezclas que contenían únicamente los genotipos de Lebrija como son HearLB1:HearLB3 en proporción 1:1, a la que se hará referencia como HearLB1:LB3, HearLB3:HearLB6 en proporción 1:1 también y a la que se hará referencia como HearLB3:LB6, HearLB1:HearLB3:HearLB6 en proporción 1:1:1 y a la que se referirá

HearLB1:LB3:LB6 y finalmente también se hizo una mezcla con los seis genotipos de Lebrija en las proporciones encontradas en la población, a la que se le llamó HearLBmix. Finalmente, se construyeron dos mezclas que incluían un genotipo del aislado HearSP1 y otro de Lebrija, así la mezcla HearSP1B:HearLB1 contenía el genotipo HearSP1B y HearLB1 en proporción 1:1, a la que se hará referencia como HearSP1B:LB1, y la mezcla HearSP1B:HearLB6 que contiene el genotipo HearSP1B y HaerLB6 también en proporción 1:1, y la que se hará referencia como HearSP1B:LB6.

Por otro lado, es sabido que las mezclas co-ocluidas, al estar los genotipos en una proporción dentro del mismo cuerpo de oclusión, la proporción se mantiene a la hora de entrar en el huésped (Bernal et al., 2013b; Clavijo et al., 2010). Pero cuando se mezclan simplemente cuerpos de oclusión con un mismo genotipo, la proporción no tiende a mantenerse a la hora de entrar a las células epiteliales del mesenterón. Además en un trabajo realizado recientemente en nuestro laboratorio se ha podido comprobar que las mezclas co-ocluidas son más rápidas en matar al huésped que las mezclas de cuerpos de oclusión (Bernal et al., 2013b). Así, para la construcción de las mezclas co-ocluidas inicialmente se homogenizaron las concentraciones de los distintos genotipos, diluyéndolos a una misma concentración de 10^9 cuerpos de oclusión/ml y mezclando posteriormente el mismo volumen de cada uno de ellos, por lo que las proporciones fueron en todos los casos 1:1, excepto en el caso de la mezcla HearSP1A:SP1B (1:2), en la que se mezcló el doble de volumen de HearSP1B que de HearSP1A. En estas mezclas los cuerpos de oclusión contienen viriones del mismo genotipo. Posteriormente para co-ocluidos los distintos genotipos dentro de un mismo cuerpo de oclusión (mezclas co-ocluidas), se infectaron oralmente larvas de *H. armigera* del cuarto estadio con las diferentes mezclas de cuerpos de oclusión a una concentración de 10^6 cuerpos de oclusión/ml (las mezclas de cuerpos de oclusión producidas antes se diluyeron por un factor de mil (10^3) antes de infectar las larvas). De esta forma, la mezcla de cuerpos de oclusión con viriones (ODVs) del mismo genotipo entra en el tubo digestivo, y tras la liberación de los viriones, se produce una mezcla de viriones de distintos genotipos (provenientes de distintos cuerpos de oclusión). Al entrar y replicarse en la misma célula se co-ocluyen en el mismo cuerpo de oclusión, formándose las mezclas co-ocluidas donde los viriones de distintos genotipos quedan co-ocluidos en un mismo cuerpo de oclusión y es más en la misma proporción en la que han sido inoculados (Bernal et al., 2013b; López-Ferber et al., 2003) (Fig. 6).

Resumiendo, en total se construyeron ocho mezclas co-ocluidas: HearSP1A:SP1B (1:1), HearSP1A:SP1B (1:2), HearLB1:LB3 (1:1), HearLB3:LB6 (1:1), HearLB1:LB3:LB6 (1:1:1), HearLBmix (seis genotipos en su proporción natural, HearLB1-6), HearSP1B:LB1 (1:1) y HearSP1B:LB6 (1:1).

- Identificación de genotipos en las mezclas mediante PCR y análisis de restricción del producto de PCR

Con el fin de determinar la naturaleza de los distintos genotipos puros, aparte del análisis de restricción del genoma completo, el ADN viral obtenido de los mismos se sometió a una amplificación por PCR usando las parejas de cebadores F-hr1/R-hr1 y F-hr5-/R-hr5. Para la PCR se mezclaron 20,5 µl H₂O, 2,5 µl de tampón polimerasa (10x), 0,75 µl de cloruro de magnesio (50 mM MgCl₂), 0,25 µl de dNTPs (nucleótidos fosfatados), 0,25 µl de los respectivos cebadores (R-hr1/F-hr1 o F-hr5/R-hr5), 0,25 µl de Taq polimerasa y 0,25 µl de ADN extraído. Las condiciones de las reacciones fueron de un periodo de desnaturalización a 94°C durante 2 minutos, seguido de 35 ciclos que incluyen la desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, el alineamiento que se produce a 60°C durante 1 minuto y la elongación a 72°C durante 3 minutos, seguido finalmente de 10 minutos a 72°C para terminar la elongación.

Posteriormente, los fragmentos amplificados por PCR para la *hr1* y la *hr5* se digirieron con la endonucleasa *NdeI* de la manera descrita anteriormente.

- Bioensayos sobre insectos

La actividad insecticida de los genotipos de HearSNPV purificados a partir del aislado HearSP1 (HearSP1A y HearSP1B) y los procedentes de Lebrija (Sevilla) (HearLB1, HearLB2, HearLB3, HearLB4, HearLB5 y HearLB6), así como de las mezclas co-ocuidas HearSP1A:SP1B (1:1), HearSP1A:SP1B (1:2), HearLB1:LB3, HearLB3:LB6, HearLB1:LB3:LB6, HearLBmix, HearSP1B:LB1 y HearSP1B:LB6, se comparó con la del aislado silvestre HearSP1, seleccionado anteriormente como el aislado de la Península Ibérica con las mejores características insecticidas (Arrizubieta et al., 2014). Las curvas de concentración–mortalidad (concentración letal 50, CL₅₀), el tiempo medio de mortalidad (TMM) y la productividad viral (número de cuerpos de oclusión producidos por una sola larva, cuerpos de oclusión/larva) se determinaron mediante ensayos *per os* (por vía oral), llevados a cabo utilizando el método de la alimentación de la gota, descrito anteriormente.

Para determinar la CL₅₀ de los distintos genotipos, de las mezclas de estos y del aislado HearSP1 se utilizaron cinco concentraciones virales: 5,7 x 10⁵, 1,9 x 10⁵, 6,3 x 10⁴, 2,1 x 10⁴ y 7,0 x 10³ cuerpos de oclusión/ml para larvas de segundo estadio, que previamente se había determinado que matan entre el 95% y el 5% de los insectos experimentales, aproximadamente. Las larvas que ingirieron la suspensión en los 10 minutos siguientes se transfirieron a pocillos individuales de una placa de cultivo de 24 pocillos que contenían la dieta artificial en forma de cubo como se ha descrito anteriormente. Los bioensayos con 24

larvas por concentración viral y 24 larvas como controles negativos se llevaron a cabo en tres ocasiones. Las larvas se criaron a 25°C y se tomaron datos de la mortalidad cada 24 horas hasta que los insectos murieron o se transformaron en pupas. Los resultados de mortalidad inducida por virus se sometieron a análisis logit utilizando el programa POLO-PC (Le Ora Software, 1987).

El tiempo medio de mortalidad (TMM) de los genotipos individuales, de las diferentes mezclas de genotipos y del aislado HearSP1 se determinó mediante bioensayo sobre larvas de *H. armigera* de segundo estadio. Las larvas se inocularon por ingestión con la CL₉₀ (concentración que mata aproximadamente al 90% de las larvas inoculadas) de cada virus calculada en los ensayos de patogenicidad descritos anteriormente ($2,0 \times 10^5$, $1,8 \times 10^5$, $9,9 \times 10^4$, $1,5 \times 10^5$, $1,5 \times 10^5$, $2,5 \times 10^5$, $3,5 \times 10^5$, $1,5 \times 10^5$, $9,8 \times 10^4$, $1,0 \times 10^5$, $1,5 \times 10^5$, $1,2 \times 10^5$, $1,8 \times 10^5$, $9,3 \times 10^4$, $1,2 \times 10^5$, $5,8 \times 10^4$ y $5,1 \times 10^4$ cuerpos de oclusión/ml para el aislado silvestre HearSP1 y los genotipos puros HearSP1A, HearSP1B, HearLB1, HearLB2, HearLB3, HearLB4, HearLB5, HearLB6, y para las mezclas co-ocuidas HearSP1A:SP1B (1:1), HearSP1A:SP1B (1:2), HearLB1:LB3, HearLB3:LB6, HearLB1:LB3:LB6, HearLBmix, HearSP1B:LB1 y HearSP1B:LB6, respectivamente). Como testigo se incluyó un grupo de larvas tratadas con la misma solución sin cuerpos de oclusión. Las larvas se mantuvieron individualmente con dieta a 25°C y se registró la mortalidad cada 8 horas hasta que todas las larvas murieron o puparon. Se infectaron 24 larvas por tratamiento y se realizaron tres repeticiones independientes. Los datos de mortalidad según el tiempo se sometieron a un análisis de supervivencia de Weibull utilizando el programa de Modelado Interactivo Lineal Generalizado (GLIM) (Crawley, 1993). La distribución de la mortalidad según el tiempo de los diferentes aislados se analizó gráficamente. Mediante observación microscópica de las larvas muertas se pudieron identificar aquellas que habían muerto por enfermedad causada por nucleopoliedrovirus, y fueron las que se incluyeron en el análisis.

La producción de cuerpos de oclusión de los genotipos puros, de las mezclas de genotipos y del aislado HearSP1 se determinó en larvas de segundo estadio de *H. armigera* infectadas mediante el método de la gota y con las concentraciones de cuerpos de oclusión que producen el 90% de mortalidad (las mismas concentraciones usadas en el estudio del tiempo medio de mortalidad). Todas las larvas que murieron de enfermedad causada por nucleopoliedrovirus se recogieron y se almacenaron a -20°C hasta ser utilizadas para el recuento de cuerpos de oclusión. Para ello, cada larva se homogeneizó en 100 µl de agua destilada y el rendimiento total de cuerpos de oclusión por larva se estimó mediante un recuento de muestras por triplicado utilizando un hemocitómetro mejorado de Neubauer. Los datos se normalizaron mediante una transformación log y se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) utilizando el programa SPSS 15.0.

Ejemplo 1: Aislamiento de nuevos genotipos del nucleopoliedrovirus de *H. armigera*

1.1. A partir del aislado HearSNPV-SP1

El aislado HearSNPV-SP1, o de forma más abreviada HearSP1, ha sido seleccionado en estudios anteriores como el aislado de la Península Ibérica con las mejores características insecticidas contra *H. armigera* (Figueiredo et al., 1999; Arrizubieta et al., 2014). Además, los perfiles de restricción realizados con diferentes endonucleasas en dichos estudios mostraron bandas submolares, lo que indica la presencia de diferentes variantes genotípicas dentro del aislado silvestre (Fig. 4, 7, 8).

Para aislar los posibles genotipos dentro del aislado HearSP1 se realizó un ensayo de placa *in vitro* como se describe en la sección de material y métodos. De esta forma se obtuvieron 145 clones, constituidos cada uno de ellos por un único genotipo. Mediante el empleo de técnicas moleculares basadas en el uso de endonucleasas de restricción se identificaron dos genotipos diferentes entre los distintos clones aislados, a los que se denominó HearSNPV-SP1A y HearSNPV-SP1B, o de forma abreviada, HearSP1A y HearSP1B (Fig. 7A). El genotipo HearSP1A se encontró en el 69% de los clones, mientras que el genotipo HearSP1B se encontró en el 31% (Fig. 7A).

1.2. A partir de cadáveres de insectos muertos durante una epizootia en laboratorio

Durante una epizootia ocurrida en la segunda generación de una población de *H. armigera* establecida en laboratorio a partir de larvas recogidas en cultivo de algodón en Lebrija (Sevilla) en agosto de 2009, se recogieron individualmente 17 cadáveres con típicos signos de muerte por enfermedad causada por nucleopoliedrovirus. Los cuerpos de oclusión de cada cadáver individual se purificaron como se menciona en la sección de materiales y métodos descrita anteriormente. A veces la cantidad de cuerpos de oclusión que se obtiene de una sola larva no es suficiente para realizar una caracterización y es necesario amplificar estos aislados inoculando a larvas sanas de una colonia de laboratorio mediante el método de la gota. Por ello, se realizó la amplificación de las muestras en larvas en condiciones de laboratorio, como se menciona anteriormente en el apartado de aislamiento y amplificación de los cuerpos de oclusión. Entre los 17 aislados multiplicados sólo se pudieron identificar 6 perfiles diferentes, a los que se denominó HearSNPV-LB1, HearSNPV-LB2, HearSNPV-LB3, HearSNPV-LB4, HearSNPV-LB5 y HearSNPV-LB6 o, de forma abreviada, HearLB1, HearLB2, HearLB3, HearLB4, HearLB5 y HearLB6 (Fig. 7B y 7C). Los 6 genotipos se encontraron en diferentes proporciones, siendo el genotipo HearLB3 el más abundante, ya que se aisló en 6 larvas diferentes (lo que representa el 35,3% del total de genotipos),

seguido por HearLB1 y HearLB2, los cuales se aislaron en 4 larvas (23,5%), y por último los genotipos HearLB4, HearLB5 y HearLB6, que se aislaron en una sola larva cada uno (5,9%).

Posteriormente con el fin de determinar la pureza de los seis aislados identificados se llevó a cabo un ensayo de dilución límite (EPD, end point dilution) como se describe en la sección de material y métodos. Tras la infección oral de larvas de *H. armigera* con los distintos aislados se extrajo la hemolinfa, la cual se diluyó de forma seriada y se utilizó para la infección de células. Posteriormente, se seleccionaron 20 pocillos con presencia de cuerpos de oclusión en la dilución que produjo menos de 10% de infección viral (alrededor de 1/500 para todos los aislados). Los BVs obtenidos se multiplicaron en larva mediante inyección intrahemócelica y se analizó el ADN viral de los cuerpos de oclusión obtenidos con las endonucleasas *Bgl*II y *Eco*RI como se menciona en la sección de material y métodos. Todos los clones/pocillos obtenidos a partir de un solo aislado presentaron el mismo perfil de restricción que el del aislado original, a partir del cual se obtuvieron los clones, por lo que se deduce que cada uno de los 6 aislados está compuesto por un solo genotipo.

Ejemplo 2: Caracterización molecular de los nuevos genotipos de HearSNPV

2.1. Determinación del número de nucleocápsidas por virión

Para determinar si los diferentes genotipos eran de tipo simple o múltiple se realizó una liberación de los ODVs y una centrifugación de los mismos en gradiente continuo de sacarosa. Todos los genotipos presentaron una única banda, lo que indica que todos los viriones contienen una única nucleocápsida (Fig. 5A). Si se tratara de aislados de tipo múltiple se observarían varias bandas, y cada una de ellas contendría ODVs con diferente número de nucleocápsidas, ya que el peso de los viriones varía en función del número de nucleocápsidas que contienen (Fig. 5B). De esta observación se concluyó que todos los aislados de HearNPV eran de tipo simple con una sola nucleocápsida por virión (ODV).

2.2. Perfiles de restricción

La digestión del ADN viral de los distintos genotipos con la endonucleasa de restricción *Eco*RI produce un perfil característico y único para cada uno de ellos (Fig. 7A, 7B y 7C; Tabla 5), pudiendo utilizarse algunos de los fragmentos de restricción generados por esta enzima como marcadores para diferenciarlos. Por ejemplo, el fragmento *Eco*RI-B del genotipo HearLB4 (11,0 kb) es mayor que en los genotipos HearLB2, HearLB3 y HearLB6 (10,5 kb), los genotipos HearSP1A y HearSP1B (10,18 kb) y el genotipo HearLB1 (10,15 kb), mientras que no se encuentra en el genotipo HearLB5. Los genotipos HearLB1 (*Eco*RI-D),

HearSP1A (*EcoRI*-D) y HearSP1B (*EcoRI*-E) presentan un fragmento único común a los tres genotipos (9,20 kb), mientras que en los genotipos HearLB2 (*EcoRI*-D), HearLB3 (*EcoRI*-D), HearLB4 (*EcoRI*-D), HearLB5 (*EcoRI*-C) y HearLB6 (*EcoRI*-D) dicho fragmento es de 9,38 kb. El fragmento *EcoRI*-E (9,01 kb) del genotipo HearLB1 sólo está presente en este genotipo, al igual que el fragmento *EcoRI*-E (8,70 kb) del genotipo HearLB4 que sólo se encuentra en el genotipo HearLB5 (*EcoRI*-D). Por otro lado, el fragmento *EcoRI*-F (7,16 kb) del genotipo HearSP1A solo se localiza en el perfil del genotipo HearLB2 (*EcoRI*-F), aunque su tamaño es menor (7,10 kb), mientras que el fragmento *EcoRI*-M del genotipo HearSP1A (5,26 kb) no está presente en los genotipos HearLB2 ni HearLB3. El genotipo HearLB5 presenta un fragmento único de 3,10 kb (*EcoRI*-S), mientras que no presenta un fragmento de 2,83 kb, presente en el resto de genotipos. No se observaron bandas submolares en los perfiles de restricción de estos genotipos tras un pase en larva y los perfiles se mantuvieron a lo largo de los pases, lo que indica la estabilidad y pureza de los genotipos.

Los perfiles de restricción de estos genotipos también se diferencian mediante el uso de otras endonucleasas de restricción, como *Bgl*II (Fig. 7A y 7C).

En los perfiles obtenidos con ambas enzimas se observa claramente la presencia de bandas submolares en el aislado silvestre HearSP1, poniendo de manifiesto que el aislado silvestre está compuesto por una mezcla heterogénea de genotipos. Así, en el perfil generado con la enzima *EcoRI* el aislado HearSP1 muestra varias bandas submolares en torno a 6,5-7 kb, que no se observan en el perfil del genotipo puro HearSP1B. Igualmente, en el perfil obtenido con la endonucleasa *Bgl*II el aislado HearSP1 muestra una banda submolar de 18,8 kb, que no aparece en el perfil del genotipo HearSP1B. Por el contrario, la ausencia de dichas bandas en los genotipos puros demuestra la pureza de los mismos, así el genotipo HearSP1B muestra una banda de 9,73 kb que no se observa en el perfil del aislado HearSP1.

En la Tabla 5 se muestran los tamaños estimados de los fragmentos de restricción generados tras la digestión del ADN viral de los distintos genotipos con la enzima *EcoRI*. La diferencia en el número de fragmentos de los genotipos HearSP1A, HearSP1B, HearLB1, HearLB3, HearLB6, HearG4, HearC1, HearNNg1 y HearAus con los genotipos HearLB2, HearLB4 y HearLB5 se debe a que sus genomas se encuentran completamente secuenciados, por lo que se detectan fragmentos de pequeño tamaño que no se pueden detectar mediante el análisis de patrones de bandas ya que no son visibles en los perfiles de restricción (señalado con un asterisco [*] en la Tabla 5).

Tabla 5: Tamaños estimados de los fragmentos de los genotipos HearSP1A, HearSP1B, HearLB1, HearLB2, HearLB3, HearLB4, HearLB5 y HearLB6, y de los aislados HearG4,

HearC1, HearNNG1 y HearAus obtenidos por digestión con *EcoRI*, y tamaño total estimado de los genomas.

Fragmento	Tamaño (kb)						
	HearSP1A	HearSP1B	HearLB1	HearLB2	HearLB3	HearLB4	HearLB5
A	13,55	13,54	13,55	13,55	13,58	13,55	13,55
B	10,18	10,18	10,15	10,50	10,5	11,00	9,74
C	9,73	9,73	9,80	9,74	9,74	9,74	9,38
D	9,20	9,20	9,20	9,38	9,38	9,38	8,70
E	8,23	8,21	8,26	8,26	8,26	8,70	8,26
F	7,16	6,52	6,49	7,10	6,39	8,26	6,45
G	6,30	6,30	6,29	6,45	6,30	6,45	6,29
H	5,98	6,15	5,99	6,29	6,23	5,98	5,98
I	5,93	5,98	5,96	5,98	5,98	5,93	5,93
J	5,85	5,93	5,86	5,93	5,93	5,85	5,85
K	5,85	5,84	5,84	5,85	5,84	5,84	5,84
L	5,68	5,69	5,68	5,84	5,68	5,68	5,68
M	5,26	5,25	5,26	5,68	4,73	5,25	5,25
N	4,73	4,73	4,74	4,73	4,57	4,73	4,73
O	4,57	4,57	4,57	4,57	4,42	4,57	4,57
P	4,42	4,42	4,42	4,42	4,40	4,42	4,42
Q	4,40	4,40	4,40	4,40	3,32	4,40	4,40
R	3,34	3,34	3,34	3,32	3,00	3,32	3,32
S	3,00	3,00	3,00	3,00	2,82	3,00	3,10
T	2,83	2,83	2,83	2,83	1,01	2,83	3,00
U	1,74	1,74	1,74	1,70	0,78	1,70	1,70
V	1,01	1,01	1,01	1,01	0,48	1,01	1,01
X	0,99	0,97	0,98	0,98	0,45*	0,98	0,98
Y	0,97	0,78	0,78	0,78	0,42*	0,78	0,78
Z	0,78	0,47	0,48	0,48	0,41*	0,48	0,48
a	0,48	0,45*	0,45*		0,31*		
b	0,42*	0,42*	0,41*		0,18*		
c	0,41*	0,41*	0,31*		0,02*		
d	0,31*	0,18*	0,18*				
e	0,18*	0,02*	0,02*				
	0,02*						
Total	132,48	132,26	131,97	132,77	130,95	133,83	129,39

* Fragmentos de pequeño tamaño detectados por secuenciación que no son visibles en los perfiles de restricción.

Continuación Tabla 5:

Fragmento	Tamaño (kb)				
	HearLB6	HearG4	HearC1	HearNNg1	HearAus
A	13,55	14,13	14,13	13,51	13,44
B	10,50	13,45	12,84	10,20	10,15
C	9,74	10,15	9,75	9,73	9,48
D	9,38	9,05	9,05	9,20	9,06
E	8,26	6,64	6,91	8,23	8,23
F	6,45	6,36	6,54	6,60	6,68
G	6,29	6,29	6,30	6,30	6,28
H	5,98	5,99	6,00	6,23	6,00
I	5,93	5,84	5,84	6,00	5,94
J	5,85	5,84	5,84	6,00	5,84
K	5,84	5,67	5,67	5,80	5,84
L	5,68	4,75	4,74	5,80	5,70
M	5,25	4,58	4,65	5,70	4,83
N	4,73	4,42	4,57	4,75	4,75
O	4,57	4,40	4,41	4,57	4,57
P	4,42	4,14	4,40	4,41	4,41
Q	4,40	3,68	4,14	4,40	4,40
R	3,32	3,36	3,36	3,34	3,68
S	3,00	3,00	3,00	3,00	3,35
T	2,83	2,83	2,83	2,83	3,00
U	1,01	1,74	1,74	1,74	1,74
V	0,98	1,48	1,00	1,00	1,00
X	0,78	1,00	0,78	0,80	0,80
Y	0,48	0,78	0,48	0,48	0,48
Z	0,45*	0,48	0,45*	0,45*	0,45*
a	0,42*	0,45*	0,42*	0,41*	0,41*
b	0,41*	0,41*	0,41*	0,41*	0,30*
c	0,31*	0,31*	0,31*	0,31*	0,18*
d	0,18*	0,18*	0,18*	0,18*	0,02*
e	0,02*	0,02*	0,02*	0,02*	
Total	130,99	131,42	130,76	132,40	131,01

* Fragmentos de pequeño tamaño detectados por secuenciación que no son visibles en los perfiles de restricción.

2.2. Diferenciación por amplificación por PCR y digestión del fragmento amplificado

Una diferenciación más precisa de cada genotipo se obtiene mediante la amplificación de regiones del genoma características para cada uno de los genotipos mediante la técnica de la PCR (reacción en cadena de la polimerasa), utilizando cebadores específicos diseñados en las zonas de variabilidad, seguido de una digestión de los fragmentos amplificados por PCR con endonucleasas de restricción.

Las comparaciones de los genomas completos secuenciados hasta el momento de HearSNPV han mostrado que las zonas de variabilidad se corresponden principalmente con las regiones homólogas (hr1, hr2, hr3, hr4 y hr5) y con los genes *bro* (Zhang et al., 2005; Ogembo et al., 2009). En este caso se diseñaron cebadores específicos para amplificar las regiones homólogas hr1 y hr5.

Así, se diseñaron los siguientes cebadores:

- Para la hr1:

- directo F-hr1: 5'- CGAAATCGACAACACCATGCA-3 (SEQ ID NO:1),

- inverso R-hr1: 5'- ACTTTTGTACGCCAGAGACGA-3' (SEQ ID NO:2).

- Y para la hr5:

- directo: F-hr5: 5'- CTAGCCGGTCCGTTTCTGTT-3' (SEQ ID NO:3),

- inverso: R-hr5: 5'- GCCCCACCCAAAACATAACG-3' (SEQ ID NO:4).

Se comprobó su utilidad para la amplificación de las regiones homólogas 1 y 5 (hr1 y hr5), respectivamente, mediante PCR como se indica en el apartado sobre las técnicas utilizadas. El resultado obtenido tras someter a electroforesis los fragmentos amplificados se muestra en la figura 8A. Para la hr1 se obtuvieron fragmentos amplificados de 2.177 y 2.117 nucleótidos para HearSP1B y HearLB6, respectivamente, y para la hr5 se obtuvieron fragmentos de 2.326 y 2.330 nucleótidos para HearSP1B y HearLB6.

Para poder diferenciar los genotipos de forma clara, los fragmentos amplificados por PCR para la hr1 y hr5 se digirieron con la endonucleasa *NdeI*. Dichos fragmentos, una vez digeridos, fueron sometidos a electroforesis, como se describe anteriormente. El resultado obtenido tras someter a electroforesis los fragmentos digeridos se muestra en la figura 8B y Tabla 6. En el caso de la hr1, la digestión con *NdeI* generó 6 fragmentos de 857, 508, 381,

306, 78 y 47 nucleótidos para HearSP1B, y 5 fragmentos de 1.210, 475, 307, 78 y 47 nucleótidos para HearLB6. En el caso de la hr5, la digestión con *NdeI* generó cuatro fragmentos de 1.120, 917, 211 y 78 nucleótidos para HearSP1B, y 3 fragmentos de 1.120, 998 y 212 nucleótidos para HearLB6.

Las secuencias completas de la región homóloga 1 (hr1) correspondientes a cada uno de los dos genotipos HearSP1B y HearLB6 están representadas por SEQ ID NO:9 y SEQ ID NO:10, respectivamente. Por otro lado, las secuencias completas de la región homóloga 5 (hr5) correspondientes a cada uno de los dos genotipos HearSP1B y HearLB6 están representadas por SEQ ID NO:11 y SEQ ID NO:12, respectivamente. Los alineamientos de dichas secuencias con las de las zonas análogas de los genomas de HearG4, HearC1, HearNNg1 y HearAus se muestran en la figura 9.

Tabla 6: Cebadores específicos diseñados en la hr1 y hr5, secuencia de nucleótidos, tamaño de los fragmentos amplificados para cada genotipo, número de fragmentos obtenidos tras digerir el fragmento amplificado por PCR con la endonucleasa *NdeI*, tamaño de dichos fragmentos y número de referencia de la secuencia del fragmento amplificado por PCR.

Cebadores (secuencia)	Genotipo	Tamaño amplícón	Nº fragmentos generados tras digestión <i>NdeI</i>	Tamaño fragmentos generados tras digestión <i>NdeI</i>	SEQ ID NO
F-hr1 (SEQ ID NO:1)	HearSP1B	2.177	6	857, 508, 481, 306, 78, 47	5
	HearLB6	2.117	5	1.210, 475, 307, 78, 47	6
R-hr1 (SEQ ID NO:2)	HearG4	2.358	6	1.251, 425, 383, 189, 77, 33	
	HearC1	2.252	6	1.145, 425, 197, 189, 77, 33	
	HearNNg1	2.260	5	963, 505, 385, 360, 47	
	HearAus	2.345	6	1.237, 425, 383, 189, 77, 34	
F-hr5 (SEQ ID NO:3)	HearSP1B	2.326	4	1.120, 917, 211, 78	7
	HearLB6	2.330	3	1.120, 998, 212	8
	HearG4	2.475	6	1.120, 778, 211, 210, 78, 78	
	HearC1	1.872	4	1.119, 464, 211, 78	
R-hr5 (SEQ ID NO:4)	HearNNg1	2.330	4	1.119, 920, 213, 78	
	HearAus	2.475	6	1.120, 778, 211, 210, 78, 78	

Ejemplo 3: Actividad insecticida de los genotipos individuales y de las mezclas de genotipos co-ocuidos

Para la construcción de las mezclas se emplearon distintas combinaciones de genotipos en varias proporciones como se describe en el apartado anterior de técnicas referido a "Construcción de mezclas de genotipos". Brevemente, para obtener las mezclas co-ocuidas se inocularon oralmente (*per os*) larvas L₄ de *H. armigera* con las mezclas de cuerpos de oclusión, que se obtuvieron mediante la preparación de mezclas de cuerpos de oclusión de distintos genotipos en las proporciones deseadas, y tras el proceso de infección se obtuvieron cuerpos de oclusión con viriones de los distintos genotipos co-ocuidos en el mismo cuerpo de oclusión en las proporciones deseadas.

3.1. Actividad insecticida del aislado silvestre HearSP1 y de los genotipos puros HearSP1A y HearSP1B

Con el fin de determinar la actividad biológica de los genotipos individuales purificados a partir del aislado HearSP1 se determinó la actividad biológica de los dos genotipos individualmente y del aislado silvestre HearSP1 (Figueiredo et al., 1999; Arrizubieta et al., 2014). La Tabla 7 muestra los valores de la CL₅₀ y la potencia relativa de los genotipos individuales HearSP1A y HearSP1B en comparación con la del aislado silvestre HearSP1. Las potencias relativas se refieren al ratio entre la CL₅₀ de los distintos genotipos respecto al aislado silvestre HearSP1.

Los bioensayos de patogenicidad mostraron que la patogenicidad del genotipo HearSP1B es 2,8 veces superior a la del aislado silvestre HearSP1. Sin embargo, el genotipo HearSP1A presenta una patogenicidad intermedia, siendo similar tanto a la del aislado silvestre HearSP1 como a la del genotipo HearSP1B (Tabla 7).

Tabla 7. Actividad insecticida relativa de cuerpos de oclusión del aislado silvestre HearSP1 y de los genotipos individuales HearSP1A y HearSP1B.

	Tratamiento	CL ₅₀ (cuerpos de oclusión/ml)	Potencia relativa	Límites fiduciales 95%		TMM (h)	Límites fiduciales 95%	
				Inferior	Superior		Inferior	Superior
Aislado silvestre	HearSP1	3,6 x 10 ⁴	1	-	-	102,8 a*	100,0	105,7
Genotipos	HearSP1A	2,4 x 10 ⁴	1,5	0,8	2,7	99,6 a	96,5	102,8
individuales	HearSP1B	1,3 x 10 ⁴	2,8	1,6	4,9	98,3 a	95,3	101,4

*Las letras iguales que acompañan a los valores indican que no hay diferencias significativas entre los tratamientos (*t*-test, P>0,05).

No se observan diferencias significativas en los tiempos medios de mortalidad (TMM) entre los genotipos puros y el aislado silvestre, siendo HearSP1A y HearSP1B estadísticamente igual de rápidos matando las larvas de segundo estadio de *H. Armígera* que aislado silvestre (Tabla 7).

Además, los genotipos HearSP1A ($5,2 \times 10^7$ cuerpos de oclusión/larva) y HearSP1B ($5,3 \times 10^7$ cuerpos de oclusión/larva) son igual de productivos que el aislado HearSP1 ($7,3 \times 10^7$ cuerpos de oclusión/larva), en larvas inoculadas en el segundo estadio de *H. armigera* (Fig. 10).

Por tanto podemos concluir que el genotipo puro HearSP1B presenta mejores cualidades insecticidas ya que su patogenicidad es mayor que la del aislado silvestre o el genotipo puro HearSP1A, mientras que su virulencia (TMM) y producción de cuerpos de oclusión no son inferiores a las de los otros aislados/genotipos.

3.2. Actividad insecticida de los genotipos individuales de Lebrija (HearLB)

Con el fin de realizar la caracterización biológica de los genotipos individuales procedentes de Lebrija se determinó la actividad biológica de los distintos genotipos individualmente y se comparó con el aislado HearSP1 (Figueiredo et al., 1999; Arrizubieta et al., 2014) en términos de patogenicidad, virulencia y productividad como se ha descrito en el apartado 3.1.

La Tabla 8 muestra los valores de la CL_{50} y la potencia relativa del aislado HearSP1 y de los genotipos individuales HearLB1, HearLB2, HearLB3, HearLB4, HearLB5 y HearLB6. Estos valores permiten observar como los límites fiduciales al 95% de las potencias relativas calculadas para la CL_{50} se solapan ampliamente en todos los tratamientos, lo que indica que la patogenicidad es similar para los genotipos puros y el aislado HearSP1.

Tabla 8. Actividad insecticida relativa de cuerpos de oclusión del aislado silvestre HearSP1 y de los genotipos individuales HearLB1, HearLB2, HearLB3, HearLB4, HearLB5 y HearLB6.

	Tratamiento	CL_{50} (cuerpos de oclusión/ml)	Potencia relativa	Límites fiduciales 95%		TMM (h)	Límites fiduciales 95%	
				Inferior	Superior		Inferior	Superior
Genotipos individuales	HearLB1	$1,2 \times 10^4$	1	-	-	109,8 a*	108,1	111,5
	HearLB2	$1,6 \times 10^4$	0,8	0,4	1,4	108,0 a	106,4	109,7
	HearLB3	$1,5 \times 10^4$	0,8	0,4	1,5	116,3 bc	114,5	118,2
	HearLB4	$1,6 \times 10^4$	0,7	0,5	1,4	118,4 c	116,9	119,9

	HearLB5	$1,4 \times 10^4$	0,8	0,5	1,5	109,1 a	107,3	110,9
	HearLB6	$1,3 \times 10^4$	0,9	0,5	1,6	108,9 a	107,4	110,6
Aislado	HearSP1	$1,6 \times 10^4$	0,8	0,4	1,4	114,5 b	112,6	116,4

*Las letras diferentes que acompañan a los valores indican que hay diferencias significativas entre los tratamientos (*t*-test, $P < 0,05$).

Por otro lado, los genotipos HearLB1, HearLB2, HearLB5 y HearLB6 fueron significativamente más rápidos para matar a las larvas de segundo estadio de *H. armigera* que el resto de genotipos y el aislado HearSP1 (Tabla 8).

Los datos de producción de cuerpos de oclusión fueron analizados mediante análisis ANOVA y Test de Tukey con el programa estadístico SPSS 15.0 (Fig. 11). El genotipo HearLB1 es el más productivo ($5,3 \times 10^8$ cuerpos de oclusión/larva), aunque no presenta diferencias significativas con el genotipo HearLB4 ($4,2 \times 10^8$ cuerpos de oclusión/larva). Además, los genotipos HearLB1, HearLB4 y HearLB5 son más productivos que el aislado HearSP1 en larvas de segundo estadio de *H. armigera*.

3.3. Actividad insecticida de las mezclas co-ocluídas obtenidas con los cinco genotipos seleccionados en los apartados anteriores (punto 3.2 y 3.3), y de la mezcla HearLBmix

En base a las mínimas diferencias de actividad insecticida observada entre los distintos genotipos se seleccionaron cinco de ellos en los apartados anteriores (punto 3.2 y 3.3) y se realizaron varias mezclas con el fin de optimizar la actividad biológica y obtener así una mezcla con mejores cualidades insecticidas. Para ello, se hicieron ocho mezclas co-ocluídas que incluían:

- HearSP1A:SP1B en una proporción 1:1. El objetivo de esta mezcla es aumentar la patogenicidad ya que el genotipo HearSP1B es más patogénico que HearSP1, y en esta mezcla se encuentra en mayor proporción que en el aislado silvestre HearSP1 (proporción natural 2:1).
- HearSP1A:SP1B en una proporción 1:2. El objetivo de esta mezcla es también aumentar la patogenicidad ya que el genotipo HearSP1B es más patogénico que HearSP1, y en esta mezcla se encuentra incluso en mayor proporción que en la mezcla anterior.
- HearLB1:LB3 en una proporción 1:1. El genotipo HearLB1 es uno de los más rápidos y además está entre los más productivos. Por otro lado, el genotipo HearLB3 está entre los más productivos, debido a que es el más lento. El objetivo de esta mezcla es mantener la virulencia del genotipo HearLB1 y la productividad de ambos.

- HearLB3:LB6 en una proporción 1:1. El genotipo HearLB6 es uno de los genotipos más rápidos y de los menos productivos, mientras que HearLB3 está entre los más productivos. En este caso, se pretende mantener la virulencia de HearLB6 y la productividad de HearLB3.
- HearLB1:LB3:LB6 en una proporción 1:1:1. Esta mezcla podría mantener la virulencia de los genotipos HearLB1 y HearLB6, y la productividad de HearLB1 y HearLB6.
- HearLBmix (HearLB1-6) en proporción 4:4:6:1:1:1. Esta mezcla incluye los seis genotipos de Lebrija en la proporción en la que se aislaron. El hecho de que cada uno de los genotipos se haya aislado en una proporción tras una epizootia puede tener algún significado a nivel biológico.
- HearSP1B:LB1 en una proporción 1:1. Esta mezcla podría mantener la patogenicidad del genotipo HearSP1B y la virulencia de HearLB1, y aumentar la productividad, ya que HearLB1 es uno de los genotipos más productivos.
- HearSP1B:LB6 en una proporción 1:1. En este caso se pretende mantener la patogenicidad de HearSP1B y la virulencia de HearLB6.

La actividad insecticida de las diferentes mezclas co-ocuidas se comparó en términos de patogenicidad, virulencia y productividad como se ha descrito en el apartado 3.1. Los genotipos individuales HearSP1A, HearSP1B, HearLB1, HearLB3 y HearLB6 se incluyeron como referencia.

Tabla 9: Actividad insecticida relativa de las mezclas de cuerpos de oclusión HearSP1A:SP1B (1:1), HearSP1A:SP1B (1:2), HearLB1:LB3, HearLB3:LB6, HearLB1:LB3:LB6, HearLBmix, HearSP1B:LB1 y HearSP1B:LB6, y de los genotipos individuales HearSP1A, HearSP1B, HearLB1, HearLB3 y HearLB6.

	Tratamiento	CL ₅₀ (cuerpos de oclusión/ml)	Potencia relativa	Límites fiduciales 95%		TMM (h)	Límites fiduciales 95%	
				Inferior	Superior		Inferior	Superior
Genotipos individuales	HearSP1A	1,6 x 10 ⁴	1	-	-	108,1 a*	105,7	110,4
	HearSP1B	1,1 x 10 ⁴	1,4	0,9	2,1	112,4 ab	109,9	114,9
	HearLB1	1,6 X 10 ⁴	1,0	0,7	1,5	112,3 b	110,8	113,8
	HearLB3	1,5 X 10 ⁴	1,1	0,8	1,8	113,5 b	112,0	115,0
	HearLB6	1,3 X 10 ⁴	1,2	0,9	1,9	109,5 ab	107,8	111,3
Mezclas co-ocuidas	HearSP1A:SP1B (1:1)	1,7 x 10 ⁴	0,9	0,6	1,4	108,2 a	106,0	110,5

HearSP1A:SP1B (1:2)	$1,2 \times 10^4$	1,3	0,8	2,0	110,9 ab	108,6	113,2
HearLB1:LB3	$1,6 \times 10^4$	1,0	0,7	1,5	115,8 b	114,3	117,3
HearLB3:LB6	$2,1 \times 10^4$	0,8	0,5	1,2	114,1 b	112,8	115,5
HearLB1:LB3:LB6	$1,1 \times 10^4$	1,5	0,9	2,3	108,7 ab	107,3	110,1
HearLBmix	$1,4 \times 10^4$	1,1	0,7	1,8	115,3 b	113,6	117,1
HearSP1B:LB1	$9,8 \times 10^3$	1,6	1,1	2,4	112,8 b	110,6	115,3
HearSP1B:LB6	$5,7 \times 10^3$	2,8	1,8	4,3	108,8 ab	106,5	111,1

*Las letras diferentes que acompañan a los valores indican que hay diferencias significativas entre los tratamientos (*t*-test, $P < 0,05$).

La Tabla 9 muestra los valores de la CL_{50} , la potencia relativa de las mezclas co-ocluidas y de los genotipos individuales (con referencia a la de HearSP1A), así como el tiempo medio de mortalidad. Sorprendentemente, la mezcla de genotipos HearSP1B:HearLB6 ($5,7 \times 10^3$ cuerpos de oclusión /ml) resulta ser la más patogénica, entre 1,7 y 3,7 veces más patogénica que los genotipos individuales y el resto de mezclas. Además, esta mezcla, con un TMM de 108,8 horas, es igual de virulenta que los genotipos más rápidos matando a las larvas, como puede ser HearSP1A, HearSP1B y HearLB6. Analizando los datos aportados en la Tabla 9 se concluye que no es esperable que una u otra mezcla resulte más o menos patogénica, al no haber un patrón o norma que prediga *a priori* cuál de todas las mezclas es la más potente.

Los bioensayos de productividad mostraron que los genotipos HearLB1 y HearLB3 y las mezclas co-ocluidas HearLB1:LB3 y HearLB1:LB3:LB6 eran las más productivas ($4,9 \times 10^8$, $5,7 \times 10^8$, $5,7 \times 10^8$ y $4,0 \times 10^8$ cuerpos de oclusión/larva, respectivamente) (Tukey, $P < 0,05$), seguidos por el genotipo HearLB6 y las mezclas co-ocluidas HearSP1A:SP1B (1:2), HearLB3:LB6, HearLBmix, HearSP1B:LB1 y HearSP1B:LB6 ($3,4 \times 10^8$, $2,5 \times 10^8$, $3,7 \times 10^8$, $2,2 \times 10^8$, $2,5 \times 10^8$ y $1,6 \times 10^8$ cuerpos de oclusión/larva, respectivamente). Por último, los genotipos HearSP1A y HearSP1B y la mezcla HearSP1A:SP1B (1:1) fueron los menos productivos, con una productividad viral de $6,3 \times 10^7$, $1,4 \times 10^8$ y $9,3 \times 10^7$ cuerpos de oclusión/larva, respectivamente (Tukey, $P < 0,05$) (Fig. 12).

La mezcla de genotipos co-ocluidos HearSP1B:LB6 es más patogénica que el resto de genotipos puros y mezclas y, además, es igual de virulenta que los genotipos más rápidos. Se preveé que estas características permitirían la rápida supresión de las poblaciones de la plaga en campo empleando la mínima cantidad de producto, abaratando los costes de producción de los cultivos. Por estas razones, seleccionamos la mezcla HearSP1B:LB6 como materia activa de un nuevo bioinseticida para el control de *H. armigera*. Por ello, los

ensayos de producción masiva y eficacia que se describen a continuación se han llevado a cabo con dicha mezcla.

Ejemplo 4: Producción masiva de HearSNPV

4.1. Estudio del canibalismo de *H. armigera*

Para determinar las condiciones óptimas para la producción masiva de HearSNPV se utilizó como criterio el número de cuerpos de oclusión que producen las larvas letalmente infectadas. La producción masiva de la mezcla co-ocluida HearSP1B:LB6 en larvas de *H. armigera* puede hacerse con larvas individualizadas en placas de 12 pocillos o en recipientes de mayor volumen con un mayor número de larvas. Sin embargo, este último método puede tener problemas dependiendo del grado de canibalismo que presente la especie. El canibalismo depende normalmente entre otras cosas de la densidad larvaria, aun cuando no hay limitación de la comida (Polis, 1981). Normalmente, el canibalismo también aumenta con la edad larvaria (Chapman et al., 1999).

En este caso se estudió el canibalismo de tres estadios larvarios de *H. armigera*, L₃, L₄ y L₅, tanto en larvas sanas como infectadas con la CL₉₀, la cual fue de $6,1 \times 10^5$, $2,4 \times 10^6$ y $2,5 \times 10^7$ cuerpos de oclusión/ml para los estadios L₃, L₄ y L₅, respectivamente. Estas concentraciones fueron estimadas en bioensayos preliminares, a tres densidades diferentes: 5, 10 y 20 larvas por caja de plástico de capacidad 0,5 litros. Como control se incluyeron cinco larvas individualizadas de cada estadio, tanto sanas como infectadas. El ensayo se repitió tres veces.

Los porcentajes de canibalismo, de mortalidad por nucleopoliedrovirus y de larvas que alcanzaron el estado de pupa fueron analizados mediante análisis ANOVA y Test de Tukey con el programa estadístico SPSS 15.0. El canibalismo observado en *H. armigera* fue similar entre los estadios L₃ y L₄, y entre larvas sanas e infectadas (observándose alrededor de un 30% de canibalismo) (Tukey, $P > 0,05$). Sin embargo, en el estadio L₅ se observó un significativamente mayor porcentaje de canibalismo en las larvas infectadas (entre el 77 y 87%) que en las sanas (20-55%) (Tukey, $P < 0,05$) (Fig. 12). Por otro lado, el canibalismo aumentó significativamente con la densidad larvaria (Tukey, $P < 0,05$), siendo aproximadamente del 40% en la densidad de 5 larvas por caja, aumentando hasta el 50-60% en la densidad de 10 larvas por caja y alcanzando finalmente un 80% en las cajas con 20 larvas. No obstante, en las larvas L₅ infectadas el porcentaje de canibalismo fue similar para todas las densidades, siendo entre el 77 y el 87% (Tukey, $P > 0,05$) (Fig. 13).

El porcentaje de mortalidad por nucleopoliedrovirus obtenido en las larvas individualizadas fue superior al 90%; sin embargo en recipientes de mayores densidades no se alcanzó el

50% de mortalidad, debido a que las larvas enfermas fueron canibalizadas antes de su muerte (Fig. 13).

Debido al alto porcentaje de canibalismo observado en las larvas de *H. armigera*, que da lugar a una reducción de la mortalidad y por lo tanto de la producción de cuerpos de oclusión, la producción masiva de HearSNPV es mucho más eficiente si se hace con larvas individualizadas.

4.2. Efecto del estadio larvario, momento de inoculación y concentración viral en la producción de HearSNPV

Para conseguir una mayor producción de cuerpos de oclusión por larva es necesario seleccionar la edad larvaria, el momento de inoculación y la concentración viral que permitan un mayor crecimiento de la larva, y por lo tanto una mayor producción viral (Shieh, 1989; Gupta et al., 2007).

Para seleccionar el estadio y el momento de inoculación se realizó el estudio con los tres últimos estadios larvarios, L₃, L₄ y L₅, infectados en dos momentos diferentes; tras la muda (recién mudadas) y un día después de haber mudado (1 día tras la muda). Por otro lado, se sabe que cuando se aplican concentraciones que producen elevados porcentajes de mortalidad la larva se desarrolla más lentamente por lo que llega a producir menos cuerpos de oclusión. Por lo tanto, conviene optimizar la concentración viral que produzca un alto porcentaje de mortalidad y con la mayor producción de cuerpos de oclusión/larva posible. Para ello, cada estadio se infectó con tres concentraciones diferentes del virus, correspondientes a las CL₈₀ ($1,5 \times 10^5$, $4,8 \times 10^5$ y $5,5 \times 10^6$ cuerpos de oclusión/ml, para los estadios L₃, L₄ y L₅, respectivamente), CL₉₀ ($6,1 \times 10^5$, $2,4 \times 10^6$ y $2,5 \times 10^7$ cuerpos de oclusión/ml, para los estadios L₃, L₄ y L₅, respectivamente) y CL₉₅ ($1,9 \times 10^6$, $9,1 \times 10^6$ y $1,5 \times 10^8$ cuerpos de oclusión/ml, para los estadios L₃, L₄ y L₅, respectivamente); dichas concentraciones fueron determinados previamente en bioensayos preliminares. Las larvas se inocularon de forma individual según el método de la gota descrito por Hughes y Wood (1981) y se depositaron en vasitos individuales para evitar el canibalismo con dieta artificial hasta su muerte por virus o alcanzar el estado de pupa. Los cuerpos de oclusión producidos por cada larva muerta se extrajeron, se purificaron y se titularon según se ha indicado anteriormente. Se inocularon 24 larvas por tratamiento y se realizaron tres repeticiones. Los datos obtenidos se analizaron mediante análisis ANOVA y Test de Tukey con el programa estadístico SPSS 15.0.

Los porcentajes de mortalidad obtenidos en las larvas infectadas tras la muda fueron los esperados (entre el 80 y el 100%), sin embargo las larvas inoculadas un día después de la

muda presentaron un porcentaje de mortalidad significativamente menor ($F_{17,36}=16,30$, $P<0,05$), alcanzando entre el 31 y el 47% de mortalidad en el caso de las larvas de cuarto y quinto estadio (Fig. 14). Esto puede ser debido a que estas larvas son más resistentes a la infección ya que su tamaño es mayor un día después de haber mudado y las características del intestino medio cambian de acuerdo al estado de desarrollo intraestadial (Washburn et al., 1998). Dentro de cada edad larvaria, las tres dosis utilizadas produjeron estadísticamente similares porcentajes de mortalidad, aunque se observa un ligero aumento de la mortalidad conforme se aumenta la dosis viral (Tukey, $P>0,05$) (Fig. 14).

Las larvas produjeron significativamente mayores cantidades de cuerpos de oclusión conforme aumentó la edad de éstas al ser inoculadas ($F_{17,36}=14,25$; $P<0,05$) (Fig. 15A). Así, las larvas inoculadas un día después de mudar a L_4 y a L_5 y las L_5 recién mudadas produjeron significativamente más cantidad de cuerpos de oclusión que el resto de las larvas (entre $5,6$ y $9,1 \times 10^9$ cuerpos de oclusión/larva) (Tukey, $P<0,05$). Sin embargo, como se ha mencionado anteriormente, las larvas inoculadas al día siguiente de mudar a L_4 y a L_5 presentaron un porcentaje de mortalidad mucho menor que las inoculadas recién mudadas a L_5 , por lo que la producción final de cuerpos de oclusión fue menor (Fig. 15B). Las larvas L_5 inoculadas recién mudadas con la CL_{95} produjeron $6,9 \times 10^{11}$ cuerpos de oclusión/100 larvas inoculadas, frente a $1,6 \times 10^{11}$ - $4,2 \times 10^{11}$ cuerpos de oclusión/100 larvas inoculadas un día después de mudar a L_5 .

Por tanto, el estadio óptimo para la producción de la mezcla de genotipos HearSP1B:LB6 en larvas de *H. armigera* es L_5 inoculándolas recién mudadas con la CL_{95} ($1,5 \times 10^8$ cuerpos de oclusión/ml). Este tratamiento produce una mortalidad cercana al 100% y es el tratamiento que alcanza una productividad ($6,9 \times 10^{11}$ cuerpos de oclusión/100 larvas inoculadas) mayor.

4.3. Efecto de la temperatura de incubación en la producción de HearSNPV

La temperatura de incubación puede influir en el desarrollo larvario y por tanto, en la productividad viral (Subramanian et al., 2006). Por ello, se realizó un estudio para determinar la temperatura óptima para la producción de HearSNPV.

Se inocularon larvas L_5 recién mudadas con la CL_{95} (condiciones seleccionadas en el apartado 4.2.) y se incubaron a 23, 26 y 30°C. Cada 8 horas se registró la mortalidad para determinar el tiempo de mortalidad de las larvas en función de la temperatura y se recogieron los cadáveres individualmente para determinar la producción de cuerpos de oclusión. Se infectaron 24 larvas por tratamiento y se realizaron cinco repeticiones.

La producción de cuerpos de oclusión/larva y el TMM se calcularon como se ha descrito anteriormente. No hubo diferencias significativas de productividad entre las larvas incubadas a las diferentes temperaturas ($F_{2,12}=0,30$; $P>0,05$) (Fig. 16). Sin embargo, a 30°C las larvas mueren entre 13 y 34 horas más rápido que a 26°C y 23°C, respectivamente (Tabla 10). Por tanto, la temperatura óptima para la producción de HearSNPV es 30°C, ya que permite obtener la misma cantidad de cuerpos de oclusión de forma más rápida que las otras temperaturas de incubación.

Tabla 10: Tiempo medio de mortalidad (TMM), expresado en horas después de la infección, de larvas L₅ de *H. armigera* infectadas con la CL₉₅ e incubadas a 23, 26 y 30°C.

Temperatura	TMM (h)	Límites fiduciales 95%	
		Inferior	Superior
23°C	163,4 c*	167,0	159,8
26°C	142,2 b	145,2	139,3
30°C	129,6 a	132,4	126,1

*Las letras diferentes que acompañan a los valores indican que hay diferencias significativas entre los tratamientos (*t*-test, $P<0,05$).

Ejemplo 5: Ensayos de la efectividad de HearSNPV para el control de *H. armigera* en plantas de tomate

5.1. Ensayos en cultivo de tomate en condiciones de laboratorio

Inicialmente, para determinar la efectividad de la mezcla co-ocluida HearSP1B:LB6 para el control de *H. armigera* se realizó un ensayo en plantas de tomate tratadas y mantenidas en condiciones de laboratorio. Las plantas de tomate se trataron mediante pulverización con una suspensión acuosa que contenía la mezcla co-ocluida HearSP1B:LB6 a distintas concentraciones (10^9 , 10^{10} y 10^{11} cuerpos de oclusión/litro) junto con un mojante agrícola (Agral®, Syngenta) al 0,2% (vol./vol.). Como control se utilizaron plantas tratadas con una solución que contenía agua y Agral® (0,2%) pero sin cuerpos de oclusión. Una vez tratadas, las plantas se dejaron secar y se colocaron en vasos de 50 ml con solución nutritiva Hoagland dentro de recipientes de cristal de 10 litros de volumen y se infestaron con 150 larvas de *H. armigera* de segundo estadio (L₂). Las plantas se mantuvieron a $25\pm1^\circ\text{C}$, $70\pm5\%$ humedad relativa y fotoperiodo de 16:8 horas luz:oscuridad.

La evaluación de la efectividad del tratamiento se determinó mediante la cuantificación del porcentaje de mortalidad. Para ello se recogieron 15 larvas de cada uno de los tratamientos

a los días 1, 3 y 5 después del tratamiento. Estas larvas se depositaron individualmente en vasitos con dieta artificial y se anotó la mortalidad a los 7 días después de haber sido recogida de las plantas.

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 16. No se observó mortalidad en las larvas recogidas en el tratamiento control, lo que indica la ausencia de contaminación viral en las plantas utilizadas. En las plantas tratadas con 10^9 cuerpos de oclusión/litro se obtuvo un porcentaje de mortalidad de 88,9, 96,7 y 88% en larvas recogidas a los días 1, 3 y 5, respectivamente. Sin embargo, en las plantas tratadas con 10^{10} y 10^{11} cuerpos de oclusión/litro se obtuvo una mortalidad del 100% de todas las larvas de todos los días de recogida (Fig. 17).

La concentración de 1×10^{10} cuerpos de oclusión/litro es la concentración mínima que produce mortalidades del 100% todos los días de recogida. Por tanto, se selecciona dicha concentración como la óptima para el control de larvas de *H. armigera* en cultivos de tomate en condiciones de laboratorio.

5.2. Ensayos en cultivo de tomate en invernadero en Lisboa (Portugal)

Para determinar la efectividad de HearSP1B:LB6 para proteger el cultivo de tomate en condiciones de invernadero frente a *H. armigera* se realizaron ensayos en un invernadero experimental del Instituto Superior de Agronomía (Universidade Técnica de Lisboa). En base a los resultados obtenidos en los ensayos de laboratorio, la efectividad de la mezcla co-ocluida HearSP1B:LB6 fue evaluada a la concentración de 1×10^{13} cuerpos de oclusión/Ha (equivalente a 10^{10} cuerpos de oclusión/litro, al usarse unos 1.000 litros/Ha). En el presente estudio, la eficacia de HearSP1B:LB6 se comparó con la de:

- un insecticida biológico a base de la bacteria entomopatógena *Bacillus thuringiensis* aizawai (Turex®, de Certis, Elche, España, que contiene *B. thuringiensis* al 50% en forma de polvo mojable). Este bioinsecticida se utiliza habitualmente a una concentración de 1-2 kg/Ha, habiéndose utilizado en este caso 1,5 kg/Ha (usando 1.000 litros/Ha).
- un insecticida biológico a base de spinosad, un producto de dos toxinas spinosinas, que se obtienen de forma natural por fermentación de la bacteria *Saccharopolyspora spinosa* (Spintor 480SC®, Dow AgroSciences, Madrid, España, que contiene Spinosad al 48% peso/volumen). Dicho insecticida se usa habitualmente a una concentración de 250 ml/Ha (utilizando 1.000 litros/Ha).

Como control se hizo un tratamiento con agua. El método de aplicación fue mediante pulverización con una suspensión acuosa que contenía los distintos tratamientos.

El diseño experimental consistió en dos bloques con cuatro parcelas experimentales cada uno, lo que hizo un total de 8 repeticiones. En cada tratamiento se incluyeron un total de 28 plantas de tomate, de las cuales las 6 plantas centrales fueron observadas para determinar el porcentaje de mortalidad larvaria, el porcentaje de frutos dañados y la persistencia de los distintos tratamientos.

Para llevar a cabo los ensayos se realizó una suelta artificial de insectos, colocando 4 larvas de *H. armigera* en estadio L₂ en los frutos (seleccionados al azar) de cada una de las plantas de tomate. Al día siguiente se aplicaron los distintos tratamientos.

En primer lugar, se determinó el porcentaje de frutos dañados a los 10 días después de la aplicación del tratamiento. También se determinó el porcentaje de supervivencia larvaria debido al tratamiento. Para ello se contaron el número de larvas que quedaban vivas en cada planta 10 días después de la aplicación del tratamiento. Los datos obtenidos fueron analizados mediante análisis ANOVA y Test de Tukey con el programa estadístico SPSS 15.0.

Los tres insecticidas redujeron significativamente el porcentaje de frutos dañados respecto al control ($F_{3,20}=9,79$; $P<0,05$). Sin embargo, no hubo diferencias significativas entre los distintos insecticidas (Tukey, $P>0,05$) (Fig. 18). Los tratamientos con HearSP1B:LB6, Turex y Spintor aumentaron significativamente la mortalidad larvaria respecto al tratamiento control ($F_{3,20}=37,70$; $P<0,05$). Además, HearSP1B:LB6 y Spintor produjeron significativamente mayores mortalidades larvarias que Turex (Tukey, $P<0,05$) (Fig. 19).

Por último, se determinó la persistencia de los distintos tratamientos en las hojas de tomate. Para ello, se recogieron 15 hojas individualmente por tratamiento y repetición de la parte media-alta de las plantas 1 hora después del tratamiento y a los 3, 6 y 9 días, y se congelaron inmediatamente. Estas hojas se trituraron de forma individual y se mezclaron con dieta artificial (en proporción 1:4 peso:peso). La mezcla se repartió en cinco vasitos de plástico, colocando una larva L₂ en cada uno de los cinco vasitos para evitar el canibalismo. A los 7 días se determinó el porcentaje de mortalidad. La relación entre la mortalidad y la cantidad de insecticida viable se obtuvo por calibración del bioensayo. Las curvas de calibración de los tres insecticidas se obtuvieron mezclando hojas recogidas antes del tratamiento y por tanto no infectadas con dieta artificial, y con cinco concentraciones conocidas y diferentes de los insecticidas. Se utilizaron 50 larvas por concentración. La cantidad de insecticida persistente en las hojas se estimó comparando el porcentaje de mortalidad obtenido en los distintos tratamientos con las curvas de calibración. Los datos de cantidad de insecticida obtenidos fueron analizados mediante ANOVA y Test de Tukey con el programa estadístico SPSS 15.0. Para poder comparar la persistencia de los distintos

tratamientos en las hojas de tomate en invernadero se calculó el porcentaje de actividad insecticida residual de cada uno de los tratamientos respecto al obtenido a una hora después de la aplicación, momento en el que se consideró que se encuentra en la planta el 100% de la actividad insecticida aplicada.

Al comparar la actividad insecticida residual de los distintos tratamientos en los distintos tiempos de recogida de las hojas, se encontró diferencias significativas entre la persistencia de HearSNPV y Turex a los 6 y 9 días tras la aplicación, siendo menor la persistencia de Turex (Tukey, $P < 0,05$) (Fig. 20). El resto de los días se observó un grado similar de actividad insecticida residual en todos los tratamientos.

La actividad insecticida residual disminuyó significativamente con el paso del tiempo ($F_{15,48}=88,25$; $P < 0,05$) en todos los casos (Fig. 20 y 21). La persistencia de HearSNPV y Spintor se mantuvo hasta 6 días después de la aplicación de los tratamientos, disminuyendo significativamente el día 9 (Tukey, $P < 0,05$), aunque todavía persistía el 59% y 49% de actividad insecticida, respectivamente (Fig. 21B y 21C). En el caso de Turex, la actividad insecticida residual tras los 6 días de la aplicación de los tratamientos fue significativamente menor que la actividad insecticida que había en las hojas una hora después del tratamiento (Tukey, $P < 0,05$), y a los 9 días sólo se mantuvo el 32% de insecticida (Tukey, $P < 0,05$) (Fig. 21A).

5.3. Ensayos en cultivo de tomate al aire libre en Badajoz (España)

Para determinar la efectividad de la mezcla co-ocluida HearSP1B:LB6 en cultivo de tomate al aire libre, se realizaron ensayos en una parcela de la finca experimental La Orden (Guadajira, Badajoz). En estos ensayos se utilizó la misma dosis de HearSP1B:LB6 que en los ensayos realizados en invernadero, 10^{13} cuerpos de oclusión/Ha (habiéndose utilizado un volumen de aplicación de 1.000 litros/Ha) y su eficacia se comparó con la de:

- el aislado silvestre HearSP1 procedente de Badajoz (Figueiredo et al., 1999), lugar donde se realizaron los ensayos, utilizando la misma dosis que para HearSP1B:LB6, 10^{10} cuerpos de oclusión/litro (equivalente a 10^{13} cuerpos de oclusión/Ha, al aplicar un tratamiento en un volumen de 1.000 litros/Ha).
- un insecticida biológico a base de la bacteria entomopatógena *Bacillus thuringiensis aizawai* (Turex®, de Certis, Elche, España, que contiene *B. thuringiensis* al 50% en forma de polvo mojable). Se utiliza habitualmente a una concentración de 1-2 kg/Ha,habiéndose utilizado en este caso 1,5 kg/Ha (aplicado en un volumen de 1000 litros/ha).

- un insecticida biológico a base de dos toxinas spinosinas, que se obtienen de forma natural por fermentación de un organismo de suelo, la bacteria *Saccharopolyspora spinosa* (Spintor 480SC®, Dow AgroSciences, Madrid, España, que contiene Spinosad al 48% peso/volumen). Se utiliza habitualmente a una concentración de 250 ml/Ha (diluyendo 250 ml en 1.000 litros, al usarse 1.000 litros/Ha).

- un insecticida químico a base de clorpirifos (Dursban 75WG®, Dow AgroSciences, Madrid, España, que contiene clorpirifos al 75% peso/peso). Se utiliza habitualmente a una concentración de 1-1,25 kg/Ha, habiéndose utilizado en este caso 1,25 kg/Ha (el cuál se diluyó de nuevo en 1.000 litros para usarse el mismo volumen en una Ha).

Como control se hizo un tratamiento con agua y agridulce al 0,2%. El método de aplicación fue mediante pulverización con una suspensión acuosa que contenía los distintos tratamientos.

El ensayo constó de 48 parcelas (1,5 m x 4 m), cada una de las cuales estuvo compuesta por aproximadamente 30 plantas. El diseño fue de bloques al azar. Cada uno de los bloques constaba de dos filas con 6 parcelas elementales y a la mitad de las parcelas de cada bloque se aplicaron los distintos tratamientos tres veces mientras que a la otra mitad cinco veces, realizando un total de 4 repeticiones para 3 y 5 aplicaciones. Todas las aplicaciones se realizaron con 15 días de diferencia. Las plantas centrales fueron observadas para determinar el porcentaje de frutos dañados, la persistencia de los distintos tratamientos, y el rendimiento de cada parcela.

En primer lugar, se determinó el porcentaje de frutos dañados, tanto con daño fresco como cicatrizado, cada 3 o 4 días, durante todo el periodo del ensayo. Los datos obtenidos se agruparon por medias quincenales y fueron analizados mediante análisis ANOVA y Test de Tukey con el programa estadístico SYSTAT (1990).

No se observaron diferencias significativas en el porcentaje de frutos dañados entre las parcelas tratadas 3 y 5 veces para los distintos tratamientos ($F_{1,174} = 0,22$; $P > 0,05$), por lo que se agruparon los datos de todas las parcelas tratadas con cada insecticida teniendo un total de 8 repeticiones.

En la figura 22 se muestra el porcentaje de frutos dañados frescos y cicatrizados en cada una de las quincenas para cada tratamiento. En la primera quincena no hubo diferencias en el porcentaje de frutos dañados obtenidos en las parcelas tratadas con los diferentes insecticidas, siendo similar al obtenido con el tratamiento control ($F_{5,15} = 0,55$; $P > 0,05$) (Fig. 22A). Sin embargo, en la segunda y tercera quincena en las parcelas control hubo un porcentaje de frutos dañados tanto frescos como cicatrizados mayor que en las parcelas tratadas con los distintos insecticidas (Tukey, $P < 0,05$) (Fig. 22B y 22C). En la cuarta

quincena, periodo del cultivo que no suele ser muy atacado por las larvas de *H. armígera*, el porcentaje de frutos dañados cicatrizados también fue mayor en las parcelas control (Tukey, $P<0,05$) pero no hubo diferencias en el porcentaje de frutos con daño fresco ($P>0,05$) (Fig. 22D).

Estos resultados demuestran que HearSNPV reduce de forma significativa el número de frutos dañados, tanto con daño fresco como cicatrizado, respecto al tratamiento control y, además, lo hace de manera igual de efectiva que el resto de insecticidas que se utilizan habitualmente para controlar las plagas ocasionadas por *H. armígera*.

Posteriormente, se determinó el rendimiento de cada parcela. Para ello se cosecharon los frutos del metro central de cada parcela y se separaron en verdes y rojos. Los frutos verdes se separaron en sanos y picados, y los rojos en sanos, picados cicatrizados y picados podridos. Posteriormente se llevó a cabo el pesado de cada uno de los grupos. Los datos obtenidos fueron analizados mediante ANOVA y Test de Tukey con el programa estadístico SYSTAT. Los controles de calidad de las empresas conserveras rechazan partidas de tomates en las que menos del 80% de los frutos están maduros, y en las que más del 5% de los tomates maduros están dañados. Los frutos verdes se desechan antes de llegar a la conservera.

En este caso tampoco hubo diferencias entre las parcelas tratadas 3 o 5 veces, es decir, en el número de aplicaciones, por lo que se agruparon los datos de todas las parcelas tratadas con cada insecticida. El porcentaje de frutos dañados cosechados en cada uno de los tratamientos se muestra en la figura 23. El porcentaje de frutos dañados, ya sean verdes picados, rojos cicatrizados o rojos podridos, fue mayor en las parcelas control que en las tratadas con los distintos insecticidas (Tukey, $P<0,05$). Además, en las parcelas tratadas con Dursban y Spintor se obtuvo un porcentaje significativamente menor de frutos rojos cicatrizados que en las tratadas con Turex y HearSP1B:LB6 (Tukey, $P<0,05$), en las parcelas tratadas con HearSP1 y Turex se cosecharon un porcentaje mayor de frutos podridos que en las tratadas con Dursban (Tukey, $P<0,05$) (Fig. 23).

Las toneladas de frutos verdes sanos por hectárea (T/Ha) fue similar en todos los tratamientos ($F_{5,39}=0,68$; $P>0,05$) (Fig. 24A). Sin embargo, las toneladas de frutos verdes picados por hectárea fue significativamente mayor en las parcelas control que en las tratadas con los distintos insecticidas ($F_{5,39}=4,95$; $P<0,05$) (Fig. 24A). Las toneladas de frutos rojos sanos por hectárea fue significativamente inferior en las parcelas control que en las parcelas tratadas con los insecticidas, excepto con Turex ($F_{5,39}=2,78$; $P<0,05$), aunque no mostró diferencias significativas con el resto de insecticidas (Tukey, $P>0,05$) (Fig. 24B). En cuanto a los frutos rojos dañados, tanto cicatrizados como podridos, se obtuvieron mayor

número de toneladas por hectárea en las parcelas control que en las tratadas con los insecticidas (Tukey, $P < 0,05$). Además, no hubo diferencias significativas entre las toneladas de frutos rojos cicatrizados obtenidos en las parcelas tratadas con HearSP1B:LB6 y HearSP1 respecto de las parcelas tratadas con el resto de insecticidas (Tukey, $P > 0,05$), aunque en las parcelas tratadas con Dursban y Spintor se obtuvieron menos toneladas de frutos rojos cicatrizados que en las tratadas con Turex (Tukey, $P < 0,05$) (Fig. 24B). Además, en las parcelas tratadas con Dursban se obtuvieron menos toneladas por hectárea de frutos rojos podridos que en las tratadas con HearSP1 y Turex (Tukey, $P < 0,05$) (Fig. 24B), pero no presentó diferencias significativas con HearSP1B:LB6 (Tukey, $P > 0,05$).

En las parcelas tratadas con HearSP1B:LB6 o HearSP1 se consigue una cosecha similar a la de las parcelas tratadas con otros insecticidas, ya que las toneladas de frutos rojos sanos, es decir, los comercializables, es similar en todos los tratamientos, excepto en el tratamiento control. Además, el porcentaje de frutos dañados es muy bajo, al igual que en el resto de parcelas tratadas con insecticidas. Este dato es muy importante a la hora de comercializar los tomates, ya que las empresas conserveras españolas no aceptan lotes con más del 5% de los frutos dañados.

Por último, se determinó la persistencia de los distintos tratamientos en las hojas de tomate. Para ello, se recogieron hojas próximas al fruto a una hora después del primer tratamiento y a los 3, 7 y 10 días. Se recogieron 25 hojas de cada parcela y se congelaron inmediatamente. Estas hojas se trituraron en grupos de cinco, se mezclaron con dieta artificial (en proporción 1:4, peso:peso) y se repartieron en 10 vasitos individuales con una larva L_2 en cada uno para evitar el canibalismo. A los 7 días se determinó el porcentaje de mortalidad. La relación entre la mortalidad y la cantidad de insecticida viable se obtuvo por calibración del bioensayo. Las curvas de calibración de los cinco insecticidas se obtuvieron mezclando hojas recogidas antes del tratamiento con dieta artificial y con cinco concentraciones conocidas y diferentes de los insecticidas. Se utilizaron 50 larvas/concentración. La cantidad de insecticida persistente en las hojas se estimó comparando el porcentaje de mortalidad obtenido en los distintos tratamientos con las curvas de calibración. Los datos de cantidad de insecticida obtenidos fueron analizados mediante ANOVA y Test de Tukey con el programa estadístico SPSS 15.0. Para poder comparar la persistencia de los distintos tratamientos en las hojas de tomate al aire libre se calculó el porcentaje de actividad insecticida residual de cada uno de los tratamientos respecto a una hora después de la aplicación.

Si comparamos el porcentaje de actividad insecticida residual de los distintos tratamientos en los distintos tiempos de recogida de las hojas, sólo encontramos diferencias significativas

entre la cantidad de HearSP1 y Spintor a los 7 días de la aplicación, siendo menor la persistencia de HearSP1 (Tukey, $P < 0,05$) (Fig. 25), y a los 10 días entre cantidad de HearSP1B:LB6 y HearSP1 con Spintor y Dursban, siendo menor la persistencia de los baculovirus (Tukey, $P < 0,05$) (Fig. 25).

La actividad insecticida residual en las plantas de tomate al aire libre disminuye significativamente con el paso del tiempo ($F_{19,140}=34,24$; $P < 0,05$) en todos los casos (Fig. 25 y 26). La cantidad de HearSNPV (tanto HearSP1B:LB6 como HearSP1) se mantiene igual desde el primer día hasta 3 días después de la aplicación del tratamiento, y a partir de este momento disminuye significativamente (Tukey, $P < 0,05$). A los 7 días después de la aplicación todavía persiste en la planta el 66% y el 52% de la actividad insecticida de los cuerpos de oclusión de HearSP1B:LB6 y HearSP1 respectivamente, mientras que a los 10 días sólo persisten el 9 y el 2% de la actividad de los cuerpos de oclusión, aunque no se observan diferencias significativas entre ambos parece que pueda persistir más la mezcla seleccionada (Fig. 26A y 26B). La actividad de Dursban y Spintor se mantiene en la planta hasta 3 días después de la aplicación (Tukey, $P > 0,05$), disminuyendo significativamente a los 7 días (Tukey, $P < 0,05$), presentando la misma actividad insecticida que a los 10 días (Tukey, $P > 0,05$), momento en el que todavía persiste en la planta el 59% de Spintor y el 46% de la actividad de Dursban (Fig. 26C y 26E). En el caso de Turex, la actividad insecticida desciende significativamente a los 3 días (Tukey, $P < 0,05$) pero se mantiene hasta los 7 días (Tukey, $P > 0,05$), volviendo a disminuir significativamente a los 10 días (Tukey, $P < 0,05$) persistiendo el 27% (Fig. 26D).

En el caso de los aislados de HearSNPV, inocuos para el ser humano y otros vertebrados, el hecho de que 7 días después de la aplicación del tratamiento persista más del 50% de la actividad insecticida es positivo, ya que las larvas que ingieran las hojas contaminadas podrán adquirir la enfermedad. En el caso de Dursban, tóxico para humanos, es un punto negativo el hecho de que a los 10 días persista todavía aproximadamente el 50%, ya que aumenta el plazo de seguridad para poder cosechar los frutos del tomate, además de la contaminación medioambiental que conlleva.

A la vista de estos resultados, se concluye que la aplicación de tratamientos con HearSNPV a la dosis de 10^{13} cuerpos de oclusión/Ha permite proteger los cultivos de tomate, tanto en invernadero como al aire libre, de forma satisfactoria siendo igual de eficaz que los tratamientos químicos y biológicos que se utilizan actualmente en este cultivo y evitando los inconvenientes que presentan estos.

Depósito de materia biológica

Los nuevos genotipos HearSP1B y HearLB6 han sido depositados en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), Institut Pasteur, Francia, de acuerdo con las normas del Tratado de Budapest. Los números de depósito y fechas de los mismos fueron las siguientes:

Genotipo	Abreviatura	Número de depósito	Fecha de depósito
HearSNPV-SP1B	HearSP1B	CNCM I-4806	15 de octubre de 2013
HearSNPV-LB6	HearLB6	CNCM I-4807	15 de octubre de 2013

Los dos genotipos fueron depositados por uno de los inventores, Prof. Dr. Primitivo Caballero (Instituto de Agrobiotecnología y Recursos Naturales, Universidad Pública de Navarra, Campus de Arrosadía, Mutilva Baja, E-31006, Pamplona, Navarra, España), como empleado del primer solicitante, en nombre y representación de los tres solicitantes (Universidad Pública de Navarra, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Instituto de Ecología A.C.).

Referencias bibliográficas

- Arrizubieta, M., Williams, T., Caballero, P., Simón, O., 2014. Selection of a nucleopolyhedrovirus isolate from *Helicoverpa armigera* as the basis for a biological insecticide. *Pest Management Science* 70, 967-976.
- Barrera, G., Simón, O., Villamizar, L., Williams, T., Caballero, P., 2011. *Spodoptera frugiperda* multiple nucleopolyhedrovirus as a potential biological insecticide: genetic and phenotypic comparison of field isolates from Colombia. *Biological Control* 58, 113-120.
- Bernal, A., Williams, T., Hernández-Suárez, E., Carnero, A., Caballero, P., Simón, O., 2013a. A native variant of *Chrysodeixis chalcites* nucleopolyhedrovirus: The basis for a promising bioinsecticide for control of *C. chalcites* on Canary Islands' banana crops. *Biological Control* 67, 101-110.
- Bernal, A., Simón, O., Williams, T., Muñoz, D., Caballero, P., 2013b. A *Chrysodeixis chalcites* single nucleopolyhedrovirus population from the Canary Islands is genotypically structured to maximize survival. *Applied and Environmental Microbiology* 79, 7709-7718.
- Caballero, P., Zuidema, D., Santiago-Alvarez, C., Vlak, J.M., 1992. Biochemical and biological characterization of four isolates of *Spodoptera exigua* nuclear polyhedrosis virus. *Biocontrol Science and Technology* 2, 145-157.
- Caballero, P., Williams, T., López-Ferber, M., 2001. Estructura y clasificación de los baculovirus, pp. 15-46. En: Caballero, P., Williams, T., López-Ferber, M. (Eds.). *Los baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas*. Phytoma-España, Valencia, España.
- Chapman, J.W., Williams, T., Escribano, A., Caballero, P., Cave, R.D., Goulson, D., 1999. Age-related cannibalism and horizontal transmission of a nuclear polyhedrosis virus in larval *Spodoptera frugiperda*. *Ecological Entomology* 24, 268-275.
- Chen, X., Li, M., Sun, X., Arif, B.M., Hu, Z., Vlak, J.M., 2000. Genomic organization of *Helicoverpa armigera* single-nucleocapsid nucleopolyhedrovirus. *Archives of Virology* 145, 2539-2555.
- Chen, X., IJkel, W.F.J., Tarchini, R., Sun, X., Sandbrink, H., Wang, H., Peters, S., Zuidema, D., Lankhorst, R.K., Vlak, J., Hu, Z., 2001. The sequence of the *Helicoverpa armigera* single nucleocapsid nucleopolyhedrovirus genome. *Journal of General Virology* 82, 241-257.

- Cherry, A., Williams, T., 2001. Control de insectos plaga mediante baculovirus, pp. 389-450. En: Caballero, P., Williams, T., López-Ferber, M. (Eds.). Los baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas. Phytoma-España, Valencia, España.
- Clavijo, G., Williams, T., Muñoz, D., Caballero, P., López-Ferber, M., 2010. Mixed genotype transmission bodies and virions contribute to the maintenance of diversity in an insect virus. *Proceedings of the Royal Society B* 277, 943-951.
- Cory, J.S., Green, B.M., Paul, R.K., Hunter-Fujita, F., 2005. Genotypic and phenotypic diversity of a baculovirus population within an individual insect host. *Journal of Invertebrate Pathology* 89, 101-111.
- Crawley, 1993. GLIM for ecologists. Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK.
- Cunningham, J.P., Zalucki, M.P., West, S.A., 1999. Learning in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae): a new look at the behaviour and control of a polyphagous pest. *Bulletin of Entomological Research* 89, 201-207.
- Erlandson, M., Newhouse, S., Moore, K., Janmaat, A., Myers, J., Theilmann, D., 2007. Characterization of baculovirus isolates from *Trichoplusia ni* in populations from vegetable greenhouses. *Biological Control* 41, 256-263.
- Figueiredo, E., Muñoz, D., Escribano, A., Mexia, A., Vlak, J.M., Caballero, P., 1999. Biochemical identification and comparative insecticidal activity of nucleopolyhedrovirus isolates pathogenic for *Heliothis armigera* (Lep. Noctuidae) larvae. *Journal of Applied Entomology* 123, 165-169.
- Figueiredo, E., Muñoz, D., Murillo, R., Mexia, A., Caballero, P., 2009. Diversity of Iberian nucleopolyhedrovirus wild-type isolates infecting *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Biological Control* 50, 43-49.
- Gelernter, W.D., Federici, B.A., 1986. Isolation, identification and determination of virulence of a nuclear polyhedrosis virus from the beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). *Environmental Entomology* 15, 240-245.
- Granados, R., Fu, Y., Corsaro, B., Hughes, P., 2001. Enhancement of *Bacillus thuringiensis* toxicity to lepidopterous species with the enhancin from *Trichoplusia ni* granulovirus. *Biological Control* 20, 153-159.
- Greene, G.L., Leppla, N.C., Dickerson, W.A., 1976. Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. *Journal of Economic Entomology* 69, 487-488.

- Gröner, A., 1986. Specificity and safety of baculoviruses, pp. 177-202. En: Granados, R.R., Federici, B.A. (Eds.). The biology of baculoviruses: biological properties and molecular biology. CRC Press, Boca Ratón, Florida.
- Guo, Z., Ge, J., Wang, D., Shao, Q., Zhang, C., 2006. Biological comparison of two genotypes of *Helicoverpa armigera* single-nucleocapsid nucleopolyhedrovirus. Biological Control 51, 809-820.
- Gupta, R.K., Raina, J.C., Monobrullah, M.D., 2007. Optimization of *in vivo* production of nucleopolyhedrovirus in homologous host larvae of *Helicoverpa armigera*. Journal of Entomology 4, 279-288.
- Hara, K., Funakoshi, M., Kawarabata, T., 1995. *In vivo* and *in vitro* characterization of several isolates of *Spodoptera exigua* nuclear polyhedrosis virus. Acta Virologica 39, 215-222.
- Harrison, R.L., Bonning, B.C., 1999. The nucleopolyhedrovirus of *Rachoplusia ou* and *Anagrapha falcifera* are isolates of the same virus. Journal of General Virology 80, 2793-2798.
- Harrison, R.L., Popham, H.J.R., Breitenbach, J.E., Rowley, D.L., 2012. Genetic variation and virulence of *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus and *Trichoplusia ni* single nucleopolyhedrovirus isolates. Journal of Invertebrate Pathology 110, 33-47.
- Hughes, P.R., Wood, H.A., 1981. A synchronous peroral technique for the bioassay of insect viruses. Journal of Invertebrate Pathology 37, 154-159.
- Jehle, J.A., Blissard, G.W., Bonning, B.C., Cory, J.S., Herniou, E.A., Rohrmann, G.F., Theilmann, D.A., Thiem, S.M., Vlak, J.M., 2006. On the classification and nomenclature of baculoviruses: a proposal for revision. Archives of Virology 151:1, 257-266.
- Kalia, V., Chaudhari, S., Gujar, G., 2001. Optimization of production of nucleopolyhedrovirus of *Helicoverpa armigera* throughout larval stages. Phytoparasitica 29, 23-28.
- King, L.A., Possee, R.D., 1992. The baculovirus expression system. A laboratory guide. Chapman & Hall, London, UK.
- Lasa, R., Ruiz-Portero, C., Alcazar, M.D., Belda, J.E., Caballero, P., Williams, T., 2007. Efficacy of optical brightener formulations of *Spodoptera exigua* multiple nucleopolyhedrovirus (SeMNPV) as a biological insecticide in greenhouses in southern Spain. Biological Control 40, 89-96.
- Le Ora Software, 1987. POLO-PC a user's guide to do probit or logit analysis. Berkeley, California, USA.

- López-Ferber, M., Simón, O., Williams, T., Caballero, P., 2003. Defective or effective? Mutualistic interactions between virus genotypes. *Proceedings of the Royal Society B* 270, 2249-2255.
- Moscardi, F., 1999. Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera. *Annual Review of Entomology* 44, 257-289.
- Muñoz, D., Castillejo, J.I., Caballero, P., 1998. Naturally occurring deletion mutants are parasitic genotypes in a wild-type nucleopolyhedrovirus population of *Spodoptera exigua*. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 4372-4377.
- Muñoz D., Martínez, A.M., Murillo, R., Ruiz de Escudero, I., Vilaplana, L. 2001. Técnicas básicas para la caracterización de baculovirus, pp. 479-518. En: Caballero, P., Williams, T., López-Ferber, M. (eds.) *Los Baculovirus y sus Aplicaciones como Bioinsecticidas en el Control Biológico de Plagas*. Phytoma-España, Valencia, España.
- Ogembo, J.G., Kunjeku, E.C., Sithanantham, S., 2005. A preliminary study on the pathogenicity of two isolates of nucleopolyhedroviruses infecting the African bollworm, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *International Journal of Tropical Insect Science* 25, 218-222.
- Ogembo, J.G., Chaeychomsri, S., Kamiya, K., Ishikawa, H., Katou, Y., Ikeda, M., Kobayashi, M., 2007. Cloning and comparative characterization of nucleopolyhedroviruses isolated from African Bollworm, *Helicoverpa armigera*, (Lepidoptera: Noctuidae) in different geographic regions. *Journal of Insect Biotechnology and Sericology* 76, 39-49.
- Ogembo, J.G., Caoili, B.L., Shikata, M., Chaeychomsri, S., Kobayashi, M., Ikeda, M., 2009. Comparative genomic sequence analysis of novel *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus (NPV) isolated from Kenya and three other previously sequenced *Helicoverpa* spp. NPVs. *Virus Genes* 39, 261-272.
- Polis, G.A., 1981. The evolution and dynamics of intraespecific predation. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 12, 225-251.
- Reed, W., Pawar, C.S., 1982. *Heliothis*: a global problem, pp. 9-14. En: Reed, W., Kumble, V. (Eds.). *Proceedings of the International Workshop on Heliothis Management*. ICRISAT, Patancheru, India.
- Shieh, T.R., 1989. Industrial production of viral pesticides. *Advances in Virus Research* 36, 315-343.

- Simón, O., Williams, T., López-Ferber, M., Caballero, P., 2005. Functional importance of deletion mutant genotypes in an insect nucleopolyhedrovirus population. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 4254-4262.
- Subramanian, S., Santharam, G., Sathiah, N., Kennedy, J.S., Rabindra, R.J., 2006. Influence of incubation temperature on productivity and quality of *Spodoptera litura* nucleopolyhedrovirus. *Biological Control* 37, 367-374.
- Systat, 1990. Systat: the system for statistics. Systat Incorporation, Evaston, Illinois.
- Theilmann, D.A., Blissard, G.W., Bonning, B., Jehle, J.A., O'Reilly, D.R., Rohrmann, G.F., Thiem, S., Vlak, J.M., 2005. Baculoviridae, pp. 177-185. En: Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U., Ball, L.A. (Eds.). *Eight Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Academic Press, San Diego, California.
- Torres-Vila, L.M., Rodríguez-Molina, M.C., Palo, E., Bielza, P., Lacasa, A., 2000. La resistencia a insecticidas de *Helicoverpa armigera* Hübner en España: datos disponibles. *Boletín de Sanidad Vegetal Plagas* 26, 493-501.
- Torres-Vila, L.M., Rodríguez-Molina, M.C., Lacasa-Plasencia, A., 2003. Impact of *Helicoverpa armigera* larval density and crop phenology on yield and quality losses in processing tomato: developing fruit count-based damage thresholds for IPM decision-making. *Crop Protection* 22, 521-532.
- Washburn, J.O., Kirkpatrick, B.A., Haas-Stapleton, E., Volkman, L.E., 1998. Evidence that the stilbene-derived optical brightener M2R enhances *Autographa californica* M nucleopolyhedrovirus infection of *Trichoplusia ni* and *Heliothis virescens* by preventing sloughing of infected midgut epithelial cells. *Biological Control* 11, 58-69.
- Zhang G., 1994. Research, development and application of *Heliothis* viral pesticide in China. *Resource and Environment in the Yangtze Valley* 3, 1-6.
- Zhang, C.X., Ma, X.C., Guo, Z.J., 2005. Comparison of complete genome sequence between C1 and G4 isolates of the *Helicoverpa armigera* single nucleocapsid nucleopolyhedrovirus. *Virology* 333, 190-199.

REIVINDICACIONES

1. Un nucleopoliedrovirus simple de *Helicoverpa armigera* (HearSNPV) caracterizado por pertenecer a un genotipo seleccionado del grupo de:
 - i) los HearSNPV depositados en la Colection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM) con los números de depósito CNCM I-4806 (HearSNPV-SP1B) o CNCM I-4807 (HearSNPV-LB6), o
 - ii) los genotipos cuyo genoma está representado por SEQ ID NO:13 (HearSNPV-SP1B) o SEQ ID NO:14 (HearSNPV-LB6).
2. Un nucleopoliedrovirus simple aislado según la reivindicación 1, que está en forma de:
 - i) partícula vírica completa (virión),
 - ii) cuerpo de oclusión (OB).
3. Un cuerpo de oclusión que contiene varios viriones, en el que al menos uno de los viriones pertenece a un genotipo del nucleopoliedrovirus simple de *Helicoverpa armigera* seleccionado del grupo de HearSNPV-SP1B (CNCM I-4806) y HearSNPV-LB6 (CNCM I-4807).
4. Cuerpo de oclusión según la reivindicación 3, que contiene viriones de genotipos diferentes.
5. Cuerpo de oclusión según la reivindicación 4, que contiene viriones de un solo genotipo seleccionado del grupo de HearSNPV-SP1B (CNCM I-4806) y HearSNPV-LB6 (CNCM I-4807).
6. Cuerpo de oclusión según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, que contiene viriones en los que el genoma de al menos uno de dichos viriones comprende un fragmento de ADN cuya secuencia está representada por SEQ ID NO:5 ó SEQ ID NO:6.
7. Cuerpo de oclusión según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, que contiene viriones en los que el genoma de al menos uno de dichos viriones comprende un fragmento de ADN cuya secuencia está representada por SEQ ID NO:7 ó SEQ ID NO:8.
8. Cuerpo de oclusión según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, que contiene viriones en los que el genoma de al menos uno de dichos viriones comprende un

fragmento de ADN cuya secuencia está representada por SEQ ID NO:9 ó SEQ ID NO:10.

9. Cuerpo de oclusión según las reivindicaciones 3 a 5, que contiene viriones en los que el genoma de al menos uno de dichos viriones comprende un fragmento de ADN cuya secuencia está representada por SEQ ID NO:11 ó SEQ ID NO:12.
10. Una composición que comprende al menos un nucleopoliedrovirus de una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 o al menos un cuerpo de oclusión de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 8.
11. Composición según la reivindicación 10, en la que los nucleopoliedrovirus están en forma de cuerpo de oclusión.
12. Composición según la reivindicación 10 u 11, que comprende cuerpos de oclusión que contienen viriones co-ocluidos, y en la que los viriones co-ocluidos en un mismo cuerpo de oclusión pertenecen al mismo genotipo o a genotipos diferentes.
13. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, que comprende una mezcla de viriones de los genotipos HearSNPV-SP1B (CNCM I-4806) y HearSNPV-LB6 (CNCM I-4807).
14. Composición según la reivindicación 13, en la que los genotipos HearSNPV-SP1B (CNCM I-4806) y HearSNPV-LB6 (CNCM I-4807) están en la proporción HearSNPV-SP1B:HearSNPV-LB6 1:1.
15. Composición según la reivindicación 14, en la que los viriones están en forma de cuerpos de oclusión que contienen viriones co-ocluidos, y en la que los viriones co-ocluidos en un mismo nucleopoliedrovirus pertenecen al mismo genotipo o a genotipos diferentes.
16. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 15, que adicionalmente contiene un excipiente o vehículo apropiado en el sector agrícola.
17. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 16, que está en forma acuosa.
18. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 16, que está en forma sólida.

19. Composición según la reivindicación 16, para ser aplicada por un método seleccionado entre pulverización a nivel de tierra, pulverización aérea, aplicación en disolución, aplicación en forma de polvo, riego o irrigación.
20. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 19, en la que los nucleopoliedrovirus simples de *Helicoverpa armigera* están mezclados con un abono, un fertilizante o un plaguicida.
21. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 20, que adicionalmente comprende un agente potenciador del efecto del nucleopoliedrovirus sobre *Helicoverpa armigera*.
22. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 21, que adicionalmente comprende un insecticida basado en la bacteria *Bacillus thuringiensis* seleccionado entre endosporas de dicha bacteria, cristales de proteínas Cry o mezclas de los mismos.
23. Un procedimiento para la producción de cuerpos de oclusión de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 10, que comprende una etapa en la que se alimentan larvas de *Helicoverpa armigera* mediante una dieta artificial que comprende cuerpos de oclusión del nucleopoliedrovirus de *H. armigera* que contienen viriones de uno cualquiera de los genotipos HearSNPV-SP1B (CNCM I-4806) y HearSNPV-LB6 (CNCM I-4807) o mezclas de los mismos.
24. Procedimiento según la reivindicación 23, que comprende las etapas de:
 - i) alimentar larvas de *Helicoverpa armigera* con una dieta artificial que comprende cuerpos de oclusión del nucleopoliedrovirus de *H. armigera* que contienen viriones de uno cualquiera de los genotipos HearSNPV-SP1B (CNCM I-4806) y HearSNPV-LB6 (CNCM I-4807) o mezclas de los mismos;
 - ii) mantener las larvas a 23-30°C hasta que se produce su muerte;
 - iii) purificar los cuerpos de oclusión generados en las larvas triturando los cadáveres de las larvas en agua, filtrando la suspensión resultante, sedimentando los cuerpos de oclusión, lavando el sedimento y volviendo a sedimentarlos;
 - iv) resuspender el sedimento final en agua a pH neutro;
 - v) opcionalmente, almacenar la suspensión obtenida en una de las siguientes condiciones:
 - a) a temperatura ambiente,

- b) en refrigeración, o congelación,
 - c) liofilizar la suspensión y conservarla a temperatura ambiente.
25. Procedimiento según la reivindicación 23 ó 24, en el que la dieta artificial que recibe cada larva se suministra:
- i) como suspensión acuosa en forma de gotas, opcionalmente con sacarosa al 10%, en la que se encuentran suspendidos los cuerpos de oclusión y que, preferiblemente, contiene también un colorante;
 - ii) en forma sólida, mediante pastillas que contienen, adicionalmente a los cuerpos de oclusión del nucleopoliedrovirus de *Helicoverpa armigera*: 7,2% germen de trigo, 2,5% proteína de soja, 1,4% levadura de cerveza, 1,9% agar, 2,9% azúcar, 1% sales mixtas, 0,1% colesterol, 0,4% ácido ascórbico, 0,2% ácido sórbico, 0,02% streptomina, 0,04% clortetraciclina hidróclorido, 0,1% nipagina, 0,1% nipasol, 0,2% ácido benzoico, 0,1% cloruro de colina, 0,01% vitaminas y 80% agua destilada;
 - iii) inicialmente como suspensión acuosa en forma de gotas como en el apartado i) y posteriormente en forma sólida como en el apartado ii).
26. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 23 a 25, en el que las larvas de *H. armigera* son larvas del quinto estadio.
27. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 23 a 26, en el que los cuerpos de oclusión con los que se alimentan las larvas están a una concentración del rango de $2,00 \times 10^7$ a $1,00 \times 10^9$ cuerpos de oclusión/ml.
28. Procedimiento según la reivindicación 27, en el que la concentración es de $1,8 \times 10^8$ cuerpos de oclusión/ml.
29. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 23 a 28, en el que se utilizan cajas de 12 pocillos con una larva por pocillo.
30. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 23 a 29, en el que se utilizan cajas de 12 pocillos con una larva de *H. armigera* recién mudadas al quinto estadio y en el que las larvas se infectan con cuerpos de oclusión a una concentración de $1,8 \times 10^8$ cuerpos de oclusión/ml.

31. Un método para identificar en una muestra la presencia de un nucleopoliedrovirus simple de *H. armigera* de un genotipo seleccionado entre HearSNPV-SP1B (CNCM I-4806) y HearSNPV-LB6 (CNCM I-4807), comprende las etapas de:

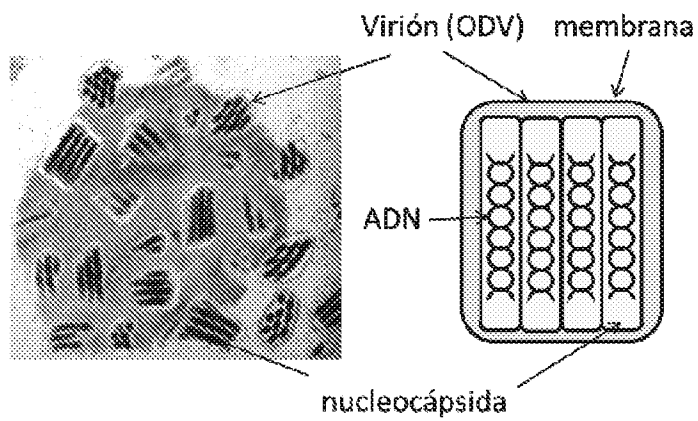
- i) amplificar mediante PCR el ADN extraído de dicha muestra utilizando una pareja de cebadores que se selecciona entre las formadas por:
 - a) SEQ ID NO:1 (F-hr1) y SEQ ID NO:2 (R-hr1), o
 - b) SEQ ID NO:3 (F-hr5) y SEQ ID NO:4 (R-hr5);
- ii) analizar el fragmento amplificado para determinar su tamaño o su secuencia;
- iii) digerir el fragmento amplificado con la endonucleasa *Ndel*;
- iv) analizar los fragmentos generados tras la digestión con *Ndel* para determinar el número de fragmentos y el tamaño de cada uno de ellos;
- v) concluir que está presente uno de los genotipos HearSNPV-SP1B (CNCM I-4806) o HearSNPV-LB6 (CNCM I-4807) si:
 - a) el fragmento amplificado por la pareja de SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:2 tiene:
 - i) un tamaño de 2.177 (HearSNPV-SP1B) ó 2.117 (HearSNPV-LB6) nucleótidos;
 - ii) la digestión de dicho fragmento con la endonucleasa *Ndel* genera 6 fragmentos de 857, 508, 381, 306, 78 y 47 nucleótidos (HearSNPV-SP1B) ó 5 fragmentos de 1.210, 475, 307, 78 y 47 nucleótidos (HearSNPV-LB6);
 - iii) la secuencia representada por SEQ ID NO:5 (HearSNPV-SP1B) o SEQ ID NO:6 (HearSNPV-LB6);
 - o, alternativamente,
 - b) el fragmento amplificado por la pareja de SEQ ID NO:3 y SEQ ID NO:4 tiene:
 - i) un tamaño de 2.326 (HearSNPV-SP1B) ó 2.330 (HearSNPV-LB6) nucleótidos;
 - ii) la digestión de dicho fragmento con la endonucleasa *Ndel* genera 4 fragmentos de 1.120, 917, 211 y 78 nucleótidos (HearSNPV-SP1B) ó 3 fragmentos de 1.120, 998 y 212 nucleótidos (HearSNPV-LB6);
 - iii) la secuencia representada por SEQ ID NO:7 (HearSNPV-SP1B) SEQ ID NO:8 (HearSNPV-LB6);

32. Uso de una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 22 como insecticida.
33. Uso según la reivindicación 32, para controlar plagas de los géneros *Helicoverpa* o *Heliothis*.
34. Uso según la reivindicación 33, para controlar plagas del género *Helicoverpa*.
35. Uso según la reivindicación 34, para controlar plagas de *Helicoverpa armigera*.
36. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 32 a 35 como insecticida para plantas.
37. Uso según la reivindicación 36, en el que la planta se selecciona entre tomate, pimiento, algodón o maíz.
38. Uso según la reivindicación 37, en invernaderos o en cultivos al aire libre.
39. Uso según la reivindicación 38, para cultivos de tomate y en el que la dosis es de entre 10^6 y 10^{10} cuerpos de oclusión/ml.

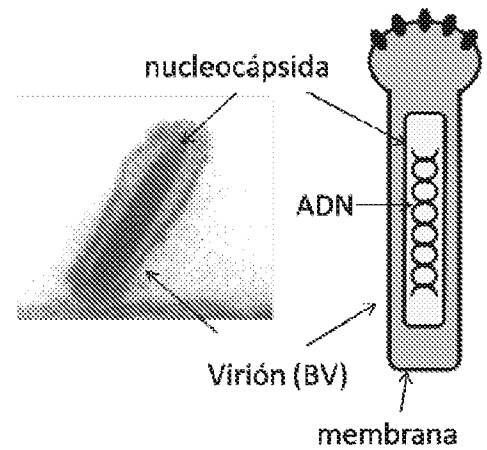
Fig. 1

A)

Virión derivado del cuerpo de oclusión (ODV)

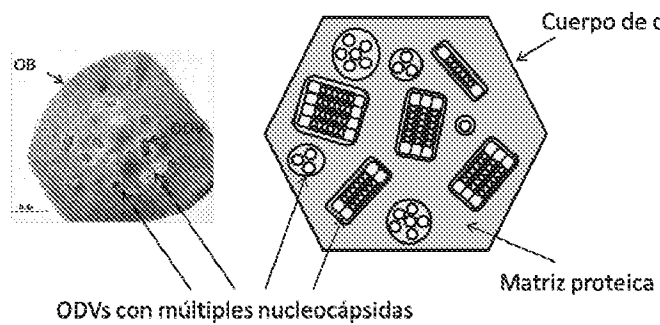


Virión brotado (BV)



B)

Múltiple (MNPV)



Simple (SNPV)

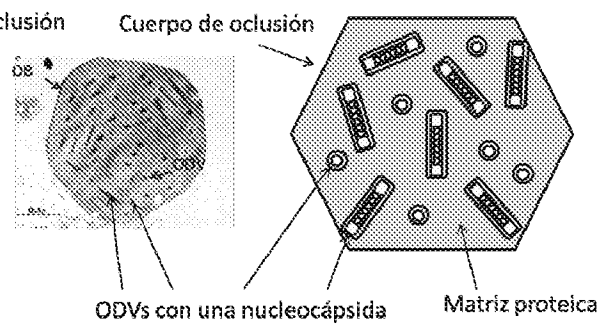


Fig. 2

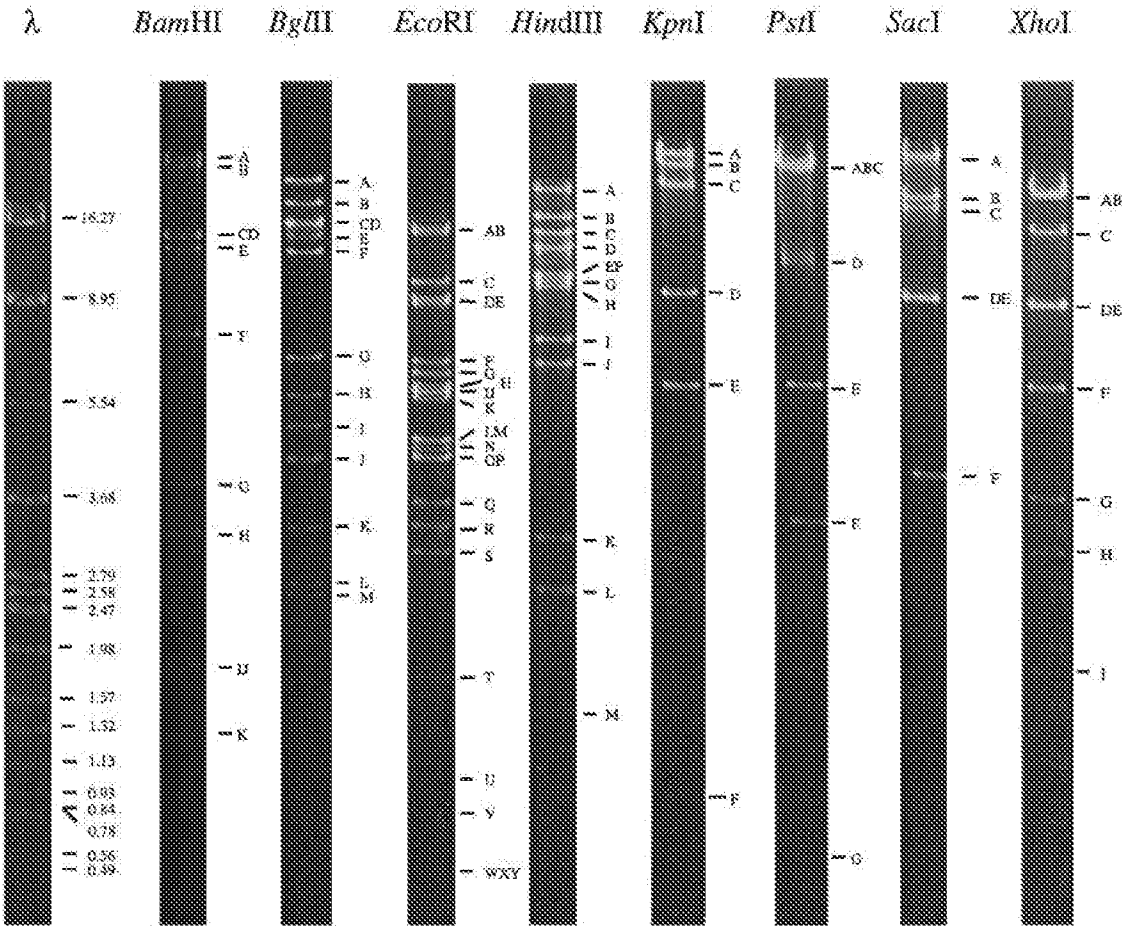
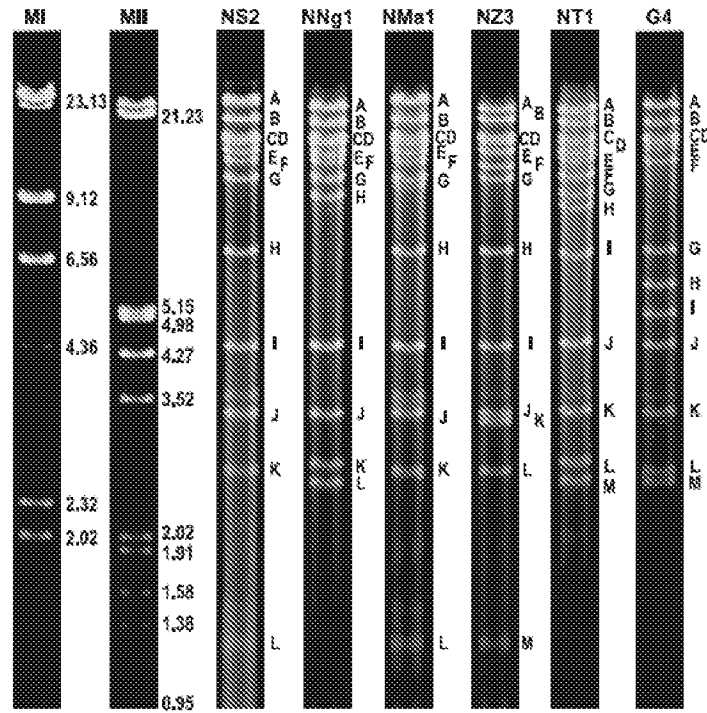


Fig.3

A. *Bgl*III



B. *Xba*I

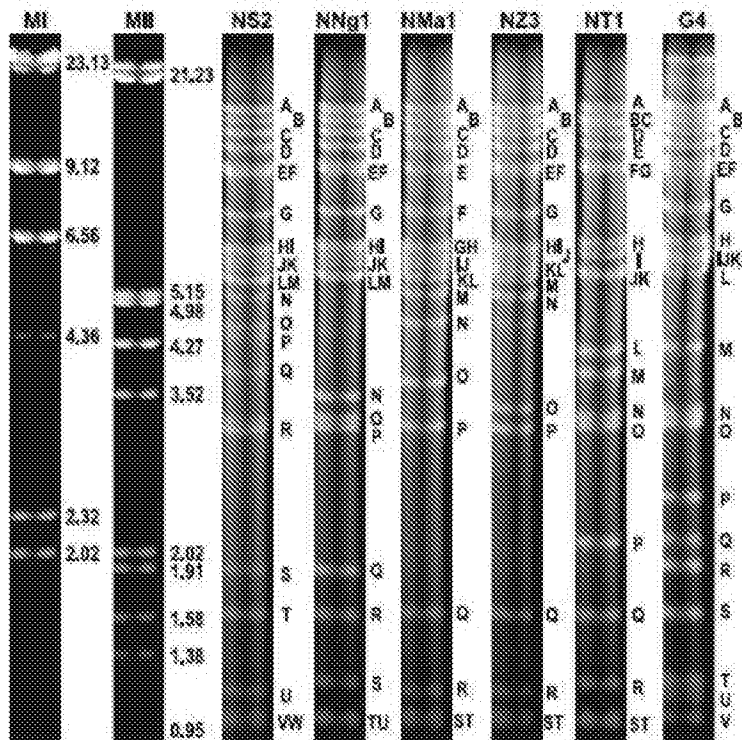
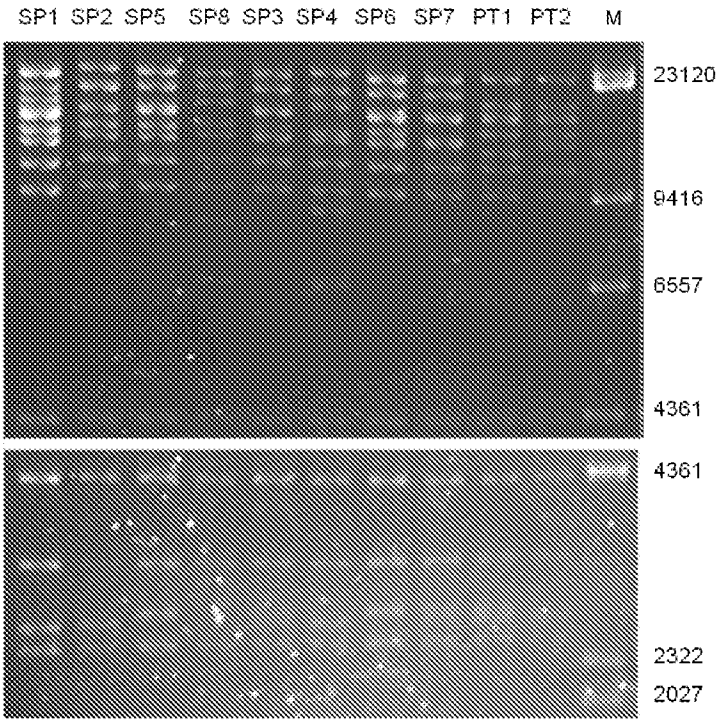


Fig. 4

A)



B)

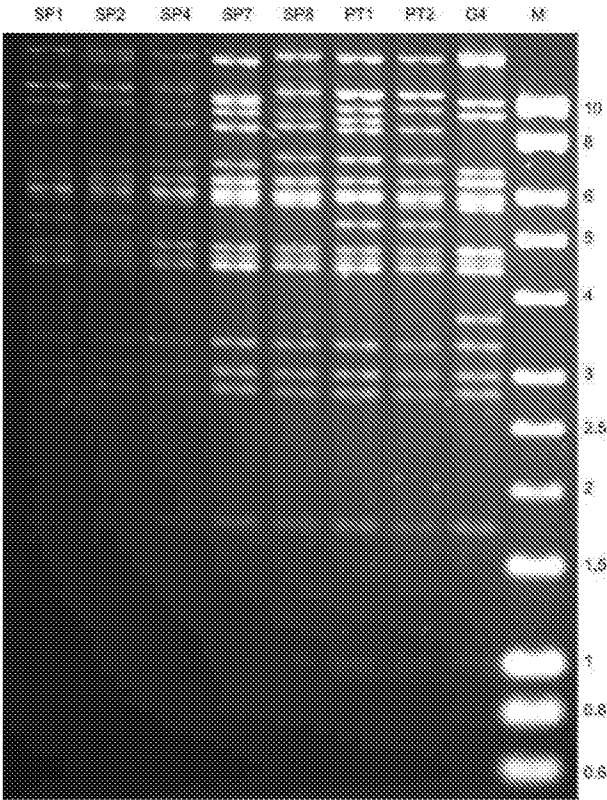
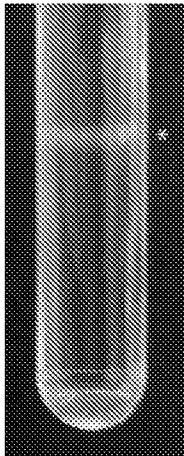


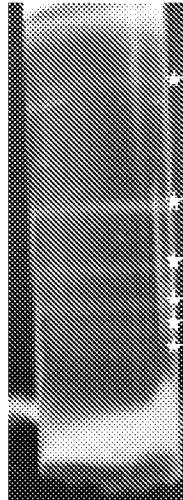
Fig. 5

A)



HearSNPV

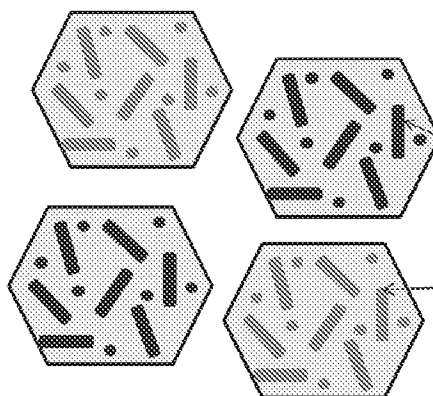
B)



AcMNPV

Fig. 6

Mezcla de cuerpos de oclusión de distintos genotipos



Mezcla co-ocluida de distintos genotipos

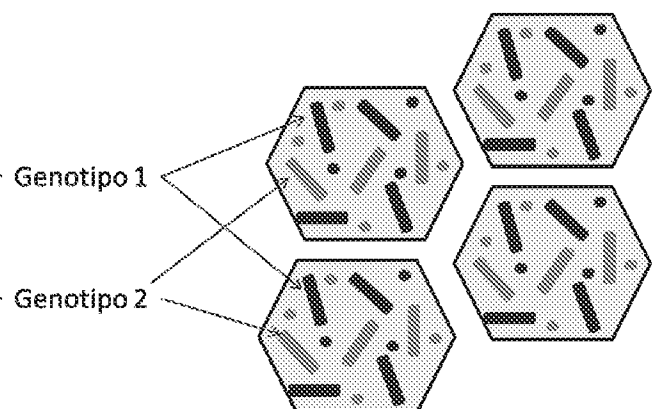
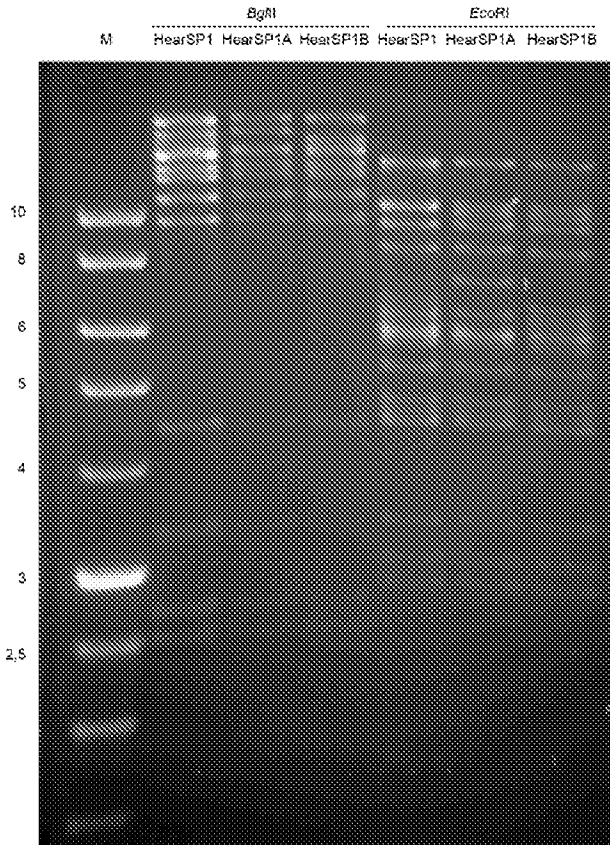
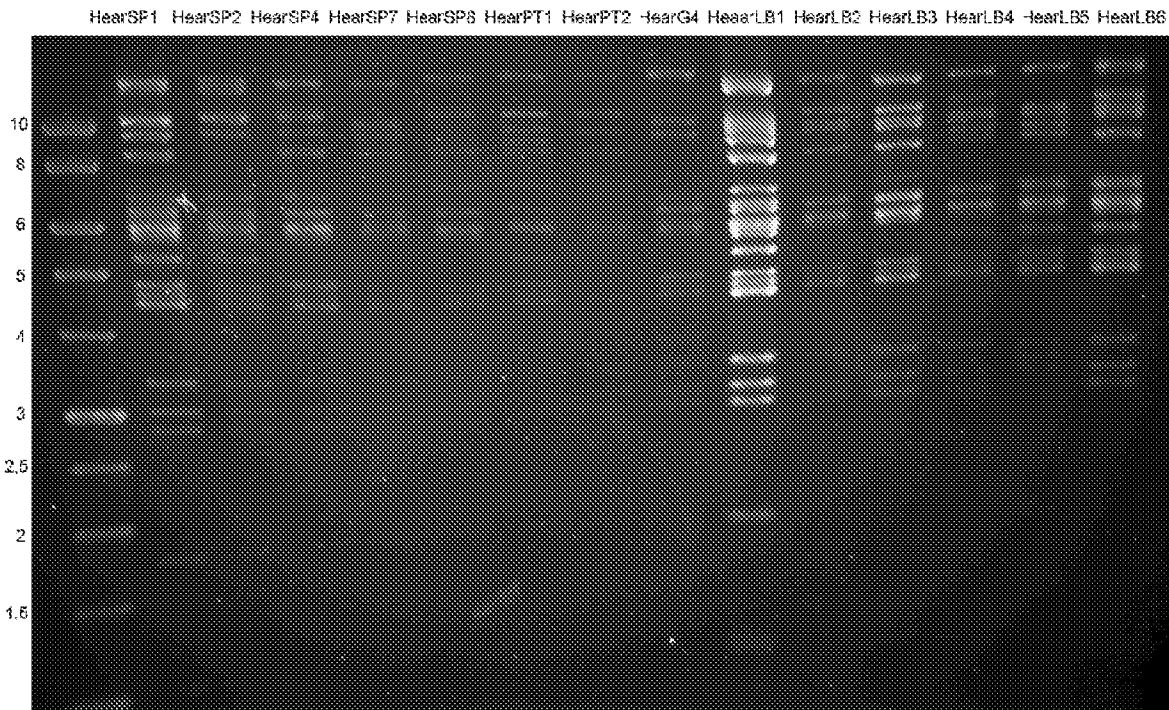


Fig. 7

A)



B)



C)

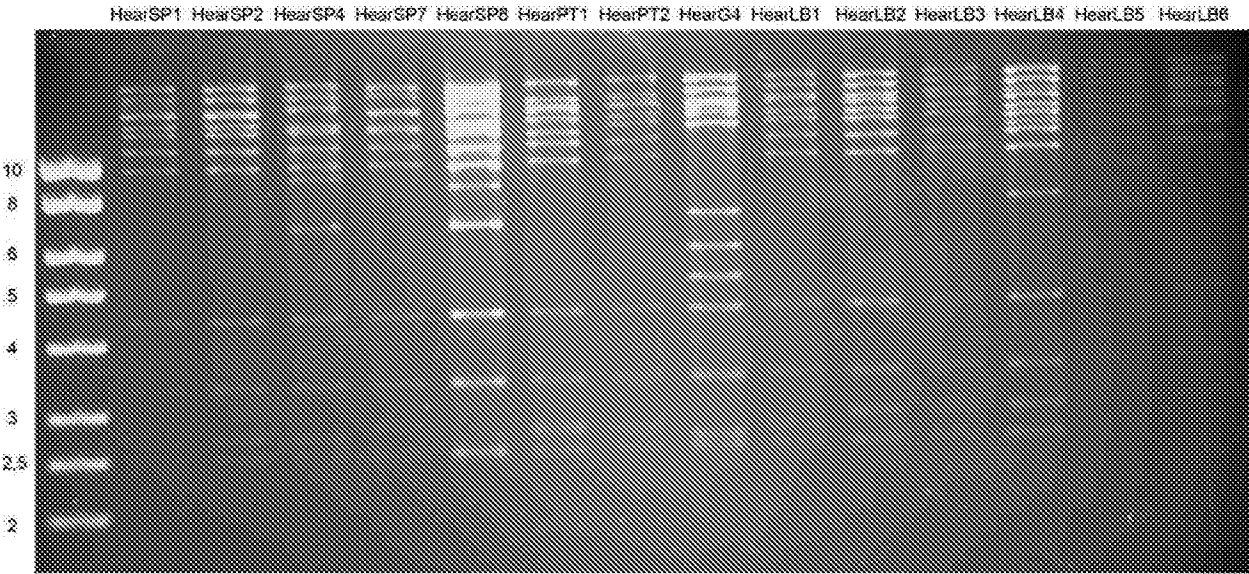


Fig. 8

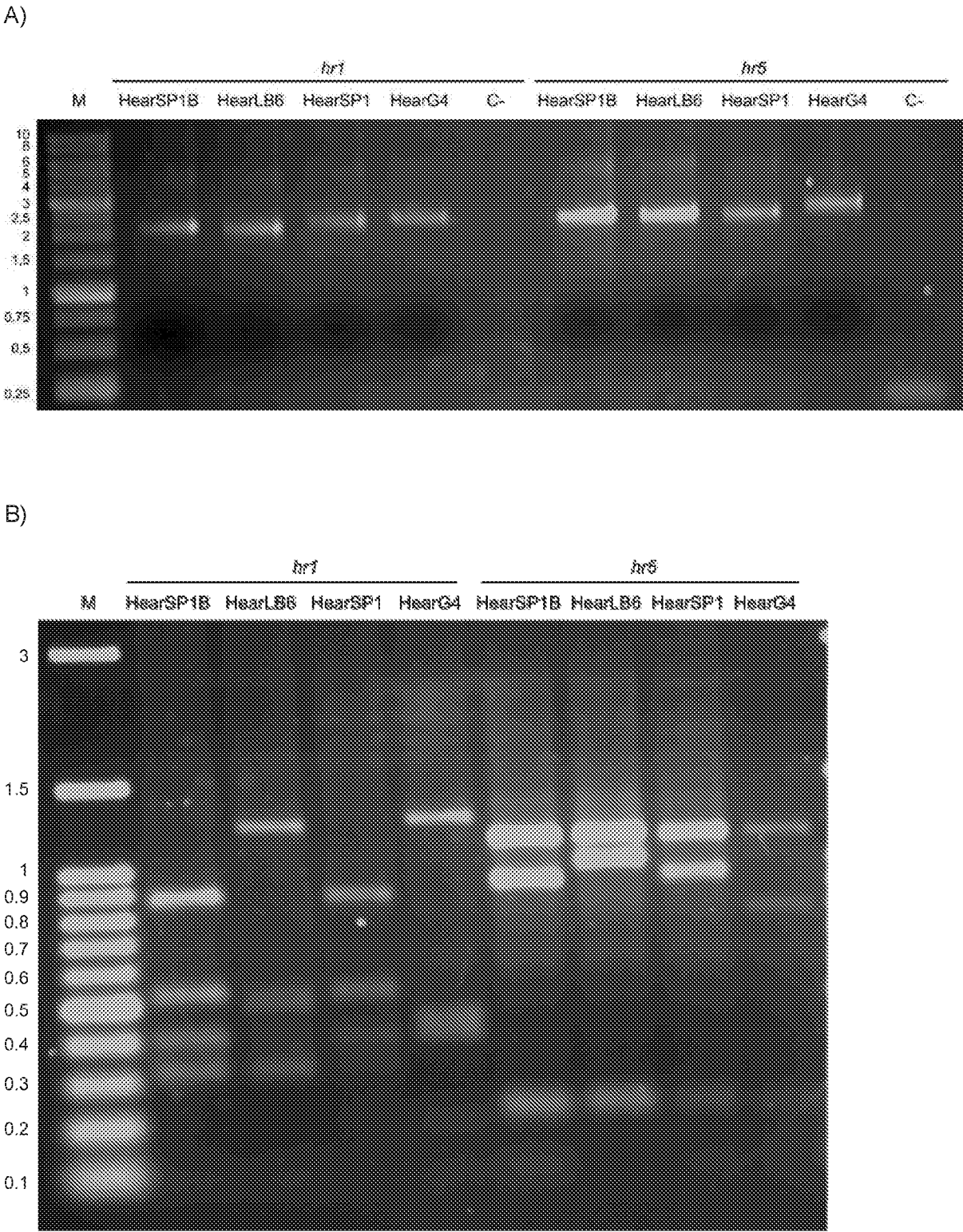


Fig. 9A

```

HearSP1B      1  CGAAATCGACAACACCATGCACATTACTACTTTACCCGTAGCCACTGATTACTCAGAACA
HearLB6       1  CGAAATCGACAACACCATGCACATTACTACTTTACCCGTAGCCACGGATTACTCAGAACA
HearG4        1  CGAAATCGACAACACCATGCACATTACTACTTTACCCGTAGCGACTGATTACGCAGAACA
HearC1        1  CGAAATCGACAACACCATGCACATTACTACTTTACCCGTAGCGACTGATTACGCAGAACA
HearNNG1      1  CGAAATCGACAACACCATGCACATTACTACTTTACCCGTAGCCACGGATTACTCAGAACA
HearAus       1  CGAAATCGACAACACCATGCACATTACTACTTTACCCGTAGCGACTGATTACGCAGAACA
                ***** ** *****

HearSP1B      61  AAACAAACTTGATCAGGCCGCCGTCGTTGTAGACGACCAATACAATTGCGCCATTAGTGTT
HearLB6       61  AAACAAACTTGATCAGGCCGCCGTCGTTGTAGACGACCAATACAATTGCGCCATTAGTGTT
HearG4        61  AAACAAACTTGATCAGGCCGCCGTCGTTGTAGACGACCAAGTACAATTGCGCCATTAGTGTT
HearC1        61  AAACAAACTTGATCAGGCCGCCGTCGTTGTAGACGACCAAGTACAATTGCGCCATTAGTGTT
HearNNG1      61  AAACAAACTTGATCAGGCCGCCGTCGTTGTAGACGATCAATACAATTGCGCCATTAGTGTT
HearAus       61  AAACAAACTTGATCAGGCCGCCGTCGTTGTAGACGACCAAGTACAATTGCGCCATTAGTGTT
                ***** ** *****

HearSP1B      121 TCATGACAATTCCACACTCAACAACCTCTTCCGAACTATGGAATATTCCATCAACAAACAA
HearLB6       121 TCATGACAATTCCACACTCAACAACCTCTTCTGAACATATGGAATATTCCATCAACAAACAA
HearG4        121 TCATGACAATTCCACACTCAATAAATCTTCTGAATTATGGAATATTCCAACAACAAACAA
HearC1        121 TCATGACAATTCCACACTCAATAAATCTTCTGAATTATGGAATATTCCAACAACAAACAA
HearNNG1      121 TCATGACAATTCCACACTCAACAACCTCTTCTGAACATATGGAATATTCCATCAACAAACAA
HearAus       121 TCATGACAATTCCACACTCAATAAATCTTCTGAATTATGGAATATTCCAACAACAAACAA
                ***** ***** *** *****

HearSP1B      181  ATGACATCATCGTTGCGAAATCTGCTGTAGGCAACGAATTATCACACACGAGATTATATTG
HearLB6       181  ATGACATCATCGTTGCGAAATCTGCTGTAGGCAACGAATTATCACACACGAGATTATATTG
HearG4        181  ATGACATCATCGTTGCGAAATCTGCTGTAGGCAACGAATTATCACACACGAGATTATATTG
HearC1        181  ATGACATCATCGTTGCGAAATCTGCTGTAGGCAACGAATTATCACACACGAGATTATATTG
HearNNG1      181  ATGACATCATCGTTGCGAAATCTGCTGTAGGCAACGAATTATCACACACGAGATTATATTG
HearAus       181  ATGACATCATCGTTGCGAAATCTGCTGTAGGCAACGAATTATCACACACGAGATTATATTG
                ***** *****

HearSP1B      241  AAAAAATTA - CGTCATCCGTTTAAATATTGCATCATCTTTAAATTGCGAAACCCGCCCGC
HearLB6       241  AAAAAATGTGCATCATCGTTTAAATATTGCATCATCTTTAGATTGCGAAACTAGCCCGC
HearG4        241  AAAAAATAA - CATCATC - GTTTTAAATTTGCATCATCTTTAAATTGCGAAACTAGCCCGC
HearC1        241  AAAAAATAA - CATCATC - GTTTTAAATTTGCATCATCTTTAAATTGCGAAACTAGCCCGC
HearNNG1      241  AAAAAATGTGCATCATCGTTTAAATATTGCATCATCTTTAAATTGCGAAACTTGCCCGC
HearAus       241  AAAAAATAA - CATCATC - GTTTTAAATTTGCATCATCTTTAAATTGCGAAACTAGCCCGC
                ***** * ***** *** ** ***** *****

HearSP1B      300  GCTTTCATATGAAACCGTCGGCAAAGATCGATAAAATTTATTCTAGAACATTCCACGGCT
HearLB6       301  GCTTTCATATGAAACCGTCGGCAAAGATCGATAAAATTTATTCTAGAACATTCCACGGTT
HearG4        299  GCTTTCATACGAAACTGTGCGCAAAAATCGATAAAATTTGTTCTAGAACGTTCCACGGCT
HearC1        299  GCTTTCATACGAAACTGTGCGCAAAAATCGATAAAATTTGTTCTAGAACGTTCCACGGCT
HearNNG1      301  GCTTTCATATAAAACCGCCGGCAAAAATCGATAAAATTTGTTCTAGAACGTTCCACGACT
HearAus       299  GCTTTCATACGAAACTGTGCGCAAAAATCGATAAAATTTGTTCTAGAACGTTCCACGGCT
                ***** ***** * ***** *****

HearSP1B      360  TGACCCAAAAAAACAAATGACGTCATATGGCGTGATCTAGAAATGGTCCAATCACAAACG
HearLB6       361  TGACCCAAAAAAACAAATGACGTCATATGGCGTGATCTAGAAATGGTCCAATCACAAACG
HearG4        359  TGTCCCAAAAAACAAATGACGTCATATGGCGGATA-----TCCAATCACAAACA
HearC1        359  TGTCCCAAAAAACAAATGACGTCATATGGCGGATA-----TCCAATCACAAACA
HearNNG1      361  TGACCCAAAAAAACAAATGACGTCATATGGCGTGATCTAGAAATGGTCCAATCACAAACG
HearAus       359  TGTCCCAAAAAACAAATGACGTCATATGGCGGATA-----TCCAATCACAAACA
                ** ***** * *****

```

Fig 9A Continuación

```

HearSP1B 420 TATTCCACGAATCACGCCACGCCCAAAGAT--AACGTACTTTT-----G-----
HearLB6 421 TATTCCACGAATCACGCCACGCCCAAAGAT--AACGTATTTTAAACTGGCCTTG-----
HearG4 408 AATTCCACGAATCACGCCACGCCCAAACATTTAAACCGGTCTT-----G-----
HearC1 408 AATTCCACGAATCACGCCACGCCCAAACATTTAAACCGGTCTT-----G-----
HearNNG1 421 TATTCCACGAATCACGCCACGCCCAAAGAT--AACGTATTTT-----AAACTG
HearAus 408 AATTCCACGAATCACGCCACGCCCAAACATTTAAACCGGTCTT-----G-----
          ***** ** ** * **

HearSP1B 462 -----GTTATTTTCGTTTCGAAACGGGCCGTGATCTTTTGCTTCGA-----
HearLB6 474 -----GATCATTACGTTTCGAAACGGGCCGTGATCTTTTGTTTGA-----
HearG4 452 -----GATCTTTTCGTTTGAACGGGCCGTGATCTTTTGTTTCGACTCATGACCCAAAA
HearC1 452 -----GATCTTTTCGTTTGAACGGGCCGTGATCTTTTGTTTCGACTCATGACCCAAAA
HearNNG1 468 GCCTTAGATCATTACGTTTCGAAACGGGCCGTGATCTTTTGTTTGA-----
HearAus 452 -----GATCTTTTCGTTTGAACGGGCCGTGATCTTTTGTTTCGACTCATGACCCAAAA
          * * ** ***** ** **

HearSP1B -----
HearLB6 -----
HearG4 506 AAACAAATTACGTCATTAGTTTAAATATTGCATCATCTTTAAATTCGAAACTAGCCCGC
HearC1 506 AAACAAATTACGTCATTAGTTTAAATATTGCATCATCTTTAAATTCGAAACTAGCCCGC
HearNNG1 -----
HearAus 506 AAACAAATTACGTCATTAGTTTAAATATTGCATCATCTTTAAATTCGAAACTAGCCCGC

HearSP1B 502 -----AACCGACGGCAAAGATTGATAAAATTTGTTCTAGAACGTTCCACGGCT
HearLB6 514 -----CTCGTGATATTTTG-----CACACGGCA
HearG4 566 GCTTTCATATGAAACCGTCGGCGAAGATCGATTATAAATGTTCTAGAACATTCGATGGTT
HearC1 566 GCTTTCATATGAAACCGTCGGCGAAGATCGATTATAAATGTTCTAGAACATTCGATGGTT
HearNNG1 514 -----CTCGTGATATTTTG-----CACACGGC-
HearAus 566 GCTTTCATATGAAACCGTCGGCGAAGATCGATTATAAATGTTCTAGAACATTCGATGGTT
          * * ** * **

HearSP1B 550 TGACCCAAAAAAACAAATGACGTCATATAGCGTGATCTAGAAAAAGT--C-----
HearLB6 537 CTATTCCAACAA--ATTTCCGCGCATGTTAAATCAATTTAA--C-----
HearG4 626 TGACCCAAAAAAACAAATGACGTCATATAGCGTGATCTAGAAATCGT--CCAATCACAAA
HearC1 626 TGACCCAAAAAAACAAATGACGTCATATAGCGTGATCTAGAAATCGT--CCAATCACAAA
HearNNG1 536 ---ACTATTCCAACAAATTTCCGC----GCATGTTCAAATCAATTTAAC-----
HearAus 626 TGACCCAAAAAAACAAATGACGTCATATAGCGTGATCTAGAAATCGT--CCAATCACAAA
          * * * * ** * *

HearSP1B 598 -----GAATCACGAGACGCCCAAAAATAACGTACTTTTAAACTGGTCTTGATCA
HearLB6 579 -----AAATCACGCCACGCCCAAAGATAACGTATTTTAAACTGGTCTTGATGT
HearG4 684 CGTATTCCACGAATCACGCCACGCCCAAACATAACGTACTTTTGAACCGGTCTTGATCA
HearC1 684 CGTATTCCACGAATCACGCCACGCCCAAACATAACGTACTTTTGAACCGGTCTTGATCA
HearNNG1 578 -----AAATCACGCCACGCCCAAAGATAACGTATTTTAAACTGGTCTTGATGT
HearAus 684 CGTATTCCACGAATCACGCCACGCCCAAACATAACGTACTTTTGAACCGGTCTTGATCA
          ***** ***** ***** *****

HearSP1B 648 TTTCGTTTCGAAACGGGCCGTGATCTTTTGCTTCTATTCATGA-----
HearLB6 629 GTTCGTTTCGAAACGGGCCGTGATCTT-----TTCATGA-----
HearG4 744 TTTCGTTTCGAAACGGACCGGTGATTTTGTGTTTGGACTCGTGACCCCCAAAATTAAACAT
HearC1 744 TTTCGTTTCGAAACGGACCGGTGATTTTGTGTTTGGACTCGTGACCCCCAAAATTAAACAT
HearNNG1 628 GTTCGTTTCGAAACGGGCCGTGATCTTTTGCTTCTATTCATGA-----
HearAus 744 TTTCGTTTCGAAACGGACCGGTGATTTTGTGTTTGGACTCGTGACCCCCAAAATTAAACAT
          ***** ***** ** ** ***

```

Fig 9A Continuación

```

HearSP1B -----
HearLB6 -----
HearG4      804 TATTTTGCACACGGCACTATTCCAACAAATTTCCGCGCATGTTAAAAATCAGTCGCCACG
HearC1      804 TATTTTGCACACGGCACTATTCCAACAAATTTCCGCGCATGTTAAAAATCAGTCGCCACG
HearNNg1    -----
HearAus     804 TATTTTGCACACGGCACTATTCCAACAAATTTCCGCGCATGTTAAAAATCAGTCGCCACG

HearSP1B    690 -----TT-AAGGA-----
HearLB6     662 -----CCCAAAAA-----
HearG4      864 CCCAAAGATAACGTATTTTT-ATGGATGTGTTTCGTTTCGAAACGGGCCGTGATATTTTCAT
HearC1      864 CCCAAAGATAACGTATTTTT-ATGGATGTGTTTCGTTTCGAAACGGGCCGTGATATTTTCAT
HearNNg1    670 -----TT-GAGGA-----
HearAus     864 CCCAAAGATAACGTATTTTT-ATGGATGTGTTTCGTTTCGAAACGGGCCGTGATATTTTCAT
                *

HearSP1B    697 -----AAAAACAAATTACGTCATCCGTTTAGGATATTGCATCATCTTTAAATTCAAAAC
HearLB6     670 -----AAAAACAAATTACGTCATCCGTTTAGGATATTGCATCATCTTTAAATTCGAAAC
HearG4      923 GACCCAAAAAACAAATTACGTCATCCGTTTAGGATATTGCATCATCTTTAAATTCAAAAC
HearC1      923 GACCCAAAAAACAAATTACGTCATCCGTTTAGGATATTGCATCATCTTTAAATTCGAAAC
HearNNg1    677 -----AAAAACAAATTACGTCATCCGTTTAGGATATTGCATCATCTTTAAATTCGAAAC
HearAus     923 GACCCAAAAAACAAATTACGTCATCCGTTTAGGATATTGCATCATCTTTAAATTCAAAAC
                *****

HearSP1B    751 TAGCCCGCGCTTTCATATGAAACCGTCGGCAAAGATTGATAAAATTTGTTCTAGAACGTT
HearLB6     724 TAGCCCGCGCTTTCATATGAAACCGTCGGCAAAGATTGATAAAATTTGTTCTAGAACGTT
HearG4      983 TAGCCCGCGCTTTCATATGAAACCGTCGGCAAAGATTGATAAAATTTGTTCTAGAACGTT
HearC1      983 TAGCCCGCGCTTTCATATGAAACCGTCGGCAAAGATTGATAAAATTTGTTCTAGAACGTT
HearNNg1    731 TAGCCCGCGCTTTCATATGAAACCGTCGGCAAAGATTGATAAAATTTGTTCTAGAACGTT
HearAus     983 TAGCCCGCGCTTTCATATGAAACCGTCGGCAAAGATTGATAAAATTTGTTCTAGAACGTT
                *****

HearSP1B    811 CCACGGCTTGACCCAAAAAA-CAAATGACGTCATATAACGTGATCTAGAAAAAGTCGAAT
HearLB6     784 CCACGGTTTGACCCAAAAAAACAAATGACGTCATATAGCGTGATCTAGAAAAAGTCGAAT
HearG4     1043 CCACGGCT-----
HearC1     1043 CCACGGCT-----
HearNNg1    791 CCACGGCTTGAACCAAAAAAAACAAATGACGTCATATAGCGTGATCTAGAAAAAGTCGAAT
HearAus     1043 CCACGGCT-----
                *****

HearSP1B    870 CACGAGACGCCCAAAAGATAACGTACTTTTAAACTGGTCTTGTTATTTTCGTTTCGAAACG
HearLB6     844 CACGAGACGCCCAAAATAACGTACTTTTAAACCGGTCTTATATCTTTTCGTTTCGAAACG
HearG4      -----
HearC1      -----
HearNNg1    851 CACGAGCCGCCCAAAATAACGTACTTTTAAACTGGTCTTGATCTGTTTCGTTTCGAAACG
HearAus     -----

HearSP1B    930 GGCCGTGATCTTTTGCTTCGATTTCATGACCCAAAAAAACAAATGACATCATTTACCAAAG
HearLB6     904 GGCCGTGATTTTTTGCTTCGATTTCATGACCCAAAAAAACAAATGACATCATCTACCAAAG
HearG4     1051 -----TGACCCAAAAAAACAAATGACATCATCTACCAAAG
HearC1     1051 -----TGACCCAAAAAAACAAATGACATCATCTACCAAAG
HearNNg1    911 GGCCGTGATCTTTTGTTTCGACTCGTGACCCAAAAAAACAAATGATATCATCTACCAAAG
HearAus     1051 -----TGACCCAAAAAAACAAATGACATCATCTACCAAAG
                *****

```

Fig 9A Continuación

```

HearSP1B   990  ATAATGTTTCCCGCGCACGTTTAAACTAGTCTTAGATCTTTTCGTTTCGAAACGGGGCTGTG
HearLB6    964  ATAATGTTTCCCGCGCACGTTTAAACTAGTCTTGGATCTTTTCGTTTCGAAACGGGGCTGTG
HearG4     1086 ATAATGTTTCCCGCGCACGTTTAAACTAGTCTTGGATCTTTTCGTTTCGAAACGGGGCCGTG
HearC1     1086 ATAATGTTTCCCGCGCACGTTTAAACTAGTCTTGGATCTTTTCGTTTCGAAACGGGGCCGTG
HearNNG1   971  ATAATGTTTCCCGCGCACGTTTAAACTAGTCTTGGATCTTTTCGTTTCGAAACGGGGCTGTG
HearAus    1086 ATAATGTTTCCCGCGCACGTTTAAACTAGTCTTGGATCTTTTCGTTTCGAAACGGGGCCGTG
          *****

HearSP1B   1050 ATCTTTTTGCTTCGAGTCATGACCAGAAAAAAACCGATTAAAGTCATTTTGCACACGGCT
HearLB6    1024 ATCTTTTTGCTTCGAGTCATGACCAGAAAAAAACCGATTAAAGTCATTTTGCACACGGCT
HearG4     1146 ATCT-TTTGCTTCGATTCATGACCAG--AAAAAACCGATTAAAGTCATTTTGCACACGGCT
HearC1     1146 ATCT-TTTGCTTCGATTCATGACCAG--AAAAAACCGATTAAAGTCATTTTGCACACGGCT
HearNNG1   1031 ATCTTTTTGCTTCGAGTCATGACCAGAAAAAAACCGATTAAAGTCATTTTGCACACGGCT
HearAus    1146 ATCT-TTTGCTTCGATTCATGACCAG--AAAAAACCGATTAAAGTCATTTTGCACACGGCT
          *****

HearSP1B   1110 CTCTTTGAAAAACAAATTACGTCATAAAACGTGATTATAGAATCGTCCAATCAAAAACGA
HearLB6    1084 CTCTTTGAAAAACAAATTACGTCATAAAACGTGATTATAGAATCGTCCAATCAAAAACGA
HearG4     1203 CTCTTTGAAAAACAAATTACGTCATAAAACGTGATTATAGAATCGTCCAATCAAAAACGA
HearC1     1203 CTCTTTGAAAAACAAATTACGTCATAAAACGTGATTATAGAATCGTCCAATCAAAAACGA
HearNNG1   1091 CTCTTTGAAAAACAAATTACGTCATAAAACGTGATTATAGAATCGTCCAATCAAAAACGA
HearAus    1203 CTCTTTGAAAAACAAATTACGTCATAAAACGTGATTATAGAATCGTCCAATCAAAAACGA
          *****

HearSP1B   1170 ACACGAATCGCGTCACGCGCACGAAATTTACTATTTCGACTTGACCTAAAA-----
HearLB6    1144 ACACGAATCGCGTCACGCGCACGAAATTTACTATTTCGACTTGACCTAAAA-----
HearG4     1263 ACACGAATTGCGTCACGCACACGAAATTTACTATTTCGACTTGACCTATACGTTACGCCAC
HearC1     1263 ACACGAATTGCGTCACGCACACGAAATTTACTATTTCGACTTGACCT-----
HearNNG1   1151 ACACGAATCGCGTCACGCGCACGAAATTTACTATTTCGACTTGACCTAAAA-----
HearAus    1263 ACACGAATTGCGTCACGCACACGAAATTTACTATTTCGACTTGACCT-----
          *****

HearSP1B   1220 ----AAACAAAGAACGTA----TTCC-----
HearLB6    1194 ----AAACAAAGAACGTA----TTCC-----
HearG4     1323 ATTTAAAAAATTGAACATAAAAAATTTACCGCGCTTTTTTTAAACTGGTCTTGGATCTTATCG
HearC1     1309 -----ATACGTTA-----CGCC-----
HearNNG1   1201 ----AAACAAAGAACGTA----TTCC-----
HearAus    1309 -----ATACGTTA-----CGCC-----
          *   **   *

HearSP1B   1238 -----ACG---AATCAC
HearLB6    1212 -----ACG---AATCAC
HearG4     1383 TTCGAAACGAGCCGTGATCTTTTGCTTCTATTTCATGATTGAGGAAAAAACA---AATGAC
HearC1     1321 -----ACATTTAAAAAT
HearNNG1   1219 -----ACG---AATCAC
HearAus    1321 -----ACATTTAAAAAT
          **   **   *

HearSP1B   1247 GCCA-CGCCCCAACATAAC--GTACTTTT--AAACTGGTCTTGGATCATTTTCGTTTCGAA
HearLB6    1221 GCCA-CGCCCCAACATAAC--GTACTTTT--AAACTGGTCTTGGATCATTTTCGTTTCGAA
HearG4     1440 ATCATCGACCAAAAAATTCCCGCGCATATTT--AAACTG-TCTTGGATCTTTTGTTTGAA
HearC1     1333 TGAA-CATAAAAAATTTACC--GCGCTTTTTTAAACTGGTCTTGGATCTTATCGTTTCGAA
HearNNG1   1228 GCCA-CGCCCCAACATAAC--GTACTTTT--AAACTGGTCTTGGATCATTTTCGTTTCGAA
HearAus    1333 TGAA-CATAAAAAATTTACC--GCGCTTTTTTAAACTGGTCTTGGATCTTATCGTTTCGAA
          * *   *** * *   *   ***   *****   * *   ***   ***

```

Fig 9A Continuación

HearSP1B	1301	ACGGGCCGTGATCTTTTGTTCGCTTCGTGACCCAA-AAAAAACAAATGACATCATCGCC
HearLB6	1275	ACGGGCCGTGATCTTTTGTTCGCTTCGTGA-CTTA-AAAAAACAAATGACATCATCGCC
HearG4	1497	ACGGGCCGTGATCTTTTGTTCGACTCGTGACCCA--AAAAAACAAATGACATCATCGAC
HearC1	1389	ACGAGCCGTGATCTTTTGTCTCTATTCATGATTGAGGAAAAAACAAATGACATCATCGAC
HearNNG1	1282	ACGGGCCGTGATCTTTTGTTCGCTTTGTGACCCA--AAAAAACAAATGACATCATCGCC
HearAus	1389	ACGAGCCGTGATCTTTTGTCTCTATTCATGATTGAGGAAAAAACAAATGACATCATCGAC *** ***** * * * ***** *
HearSP1B	1360	CAACATAAC--GTACTTTTAAACTAGTCTTGGATATTTTCGTTTCGAAACGGGCCGTGA
HearLB6	1333	CAAAAATAAC--GTACTTTTAAACTGGTCTTGGATCATTTTCGTTTCGAAACGGGCCGTGA
HearG4	1555	CAAAAATTTCCCGCGCATGTTTAAACTAGTCTTGGATCTTTTGTTCGAAACGGGCCGTAA
HearC1	1449	CAAAAATTTCCCGCGCATATTTAAACT-GTCTTGGATCTTTTGTTCGAAACGGGCCGTGA
HearNNG1	1340	CAACATAAC--GTACTTTTAAACTGGTCTTGGATCTTTTCGTTTCGAAACGGGCCGTGA
HearAus	1449	CAAAAATTTCCCGCGCATATTTAAACT-GTCTTGGATCTTTTGTTCGAAACGGGCCGTGA ***** * * * ***** ***** * * * ***** *
HearSP1B	1417	TCTTTTGTTCGCTTCGTGACCCAAAAAACAAATTACGTCATCGACCAAAG-TA-----
HearLB6	1390	TCTTTTGTTCGCTTCGTGACCCAAAAAACAAATTACGTCATCGACCAAAG-CA-----
HearG4	1615	TCTTTTGT-TCGACTCGTGACCCAAAAAACAAATGACATCATCGACC-----A-----
HearC1	1508	TCTTTTGTTCGACTCGTGACCCAAAAAACAAATGACATCATCGACC-----A-----
HearNNG1	1397	TCTTTTGTTCGATTTCATGACCCAAAAAACAAATGACATCATCTACCAAAGATA-----
HearAus	1508	TCTTTTGTTCGACTCGTGACCCAAAAAACAAATGACATCATCGACAAAAT-CCGCGCA ***** * * * ***** * * * ***** *
HearSP1B		-----
HearLB6		-----
HearG4		-----
HearC1		-----
HearNNG1		-----
HearAus	1567	TATTAAGTGTCTGATCTTTGTTGAAACGGGCCGTGATCTTGTTCGACTCGTGACCAAAAA
HearSP1B	1471	-----AAAATTCTTGCGCATGTTTAAACTAGTCTTGGATATTTTCG
HearLB6	1444	-----AAAATTCTTGCGCATGTTTAAACTAGTCTTGGATATTTTCG
HearG4	1663	-----AAAATTTCCCGCGCATGTTTAAACTAGTCTTGGATCTTTTTCG
HearC1	1557	-----AAAATTTCCCGCGCATGTTTAAACTAGTCTTGGATCTTTTTCG
HearNNG1	1452	-----ATGTTTCCCGCGCATGTTTAAACTGGTCTTGGATCATTTTCG
HearAus	1627	ACAAATGACATCATCGACCAAAAATCCCGCGCATGTTTAAACTAGTCTTGGATC-TTTCG * * * ***** ***** * * *
HearSP1B	1512	TTCGAAACGGGCCGTGATCTTTTGTTCGCTTCGTGACCCAAAAAACAAAT-----
HearLB6	1485	TTCGAAACGGGCCGTGATCTTTTGTTCGCTTCGTGACCCAAAAAACAAAT-----
HearG4	1704	TTCAAAACATGACGTAATCTTTTCG-TTCTACTCGTGACCCAAAAAACAAAT-----
HearC1	1598	TTCAAAACATGACGTAATCTTTTCG-TTCTACTCGTGACCCAAAAAACAAAT-----
HearNNG1	1493	TTCGAAACGGGCCGTGATCTTTTGTTCGCTTTGTGACCCAAAAAACAAATGACATCAT
HearAus	1686	TTCAAAACATGACGTAATCTTTTCG-TTCTACTCGTGACCCAAAAAACAAAT----- *** *
HearSP1B		-----
HearLB6		-----
HearG4		-----
HearC1		-----
HearNNG1	1553	CGACCAAAGATAATGTTTCCCGCGCATGTTTAAACTAGTCTTGGATCTTTTCGTTTCGAAA
HearAus		-----

Fig 9A Continuación

```

HearSP1B 1564 -----TACGTCATTTCGTTTAAAAATATTG
HearLB6 1537 -----TACGTCATTTCGTTTAAAAATATTG
HearG4 1755 -----TACGTCATTTCGTTTAAAAATATTG
HearC1 1649 -----TACGTCATTTCGTTTAAAAATATTG
HearNNG1 1613 CGGGCCGTGATCTTTTCATGACCCAAAAAAACAAATTACGTCATCCGTTTAGGATATTG
HearAus 1737 -----TACGTCATTTCGTTTAAAAATATTG
                      *****
HearSP1B 1587 CATCATCTTTAAATTTCGAAACCCGCCCGCGCTTTCATATGAAACCGTCGGCGAAGATCGA
HearLB6 1560 CATCATCTTTAAATTTCGAAACCCGCCCGCGCTTTCATATGAAACCGTCGGCGAAGATCGA
HearG4 1778 CATCATCTTTAAATTTCGAAACCCGCCCGCGCTTTCATATGAAACCGTCGGCGAAGATCGA
HearC1 1672 CATCATCTTTAAATTTCGAAACCCGCCCGCGCTTTCATATGAAACCGTCGGCGAAGATCGA
HearNNG1 1673 CATCATCTTTAAATTTGAAACTAGCCCGCGCTTTCATATGAAACCGTCGGCGAAGATTGA
HearAus 1760 CATCATCTTTAAATTTCGAAACCCGCCCGCGCTTTCATATGAAACCGTCGGCGAAGATCGA
                      *****
HearSP1B 1647 TAAAATTTGTTCTAGAACATTTCGATGGTTTGACCCAAAAAAACAAATGACGTCATATAGC
HearLB6 1620 TAAAATTTGTTCTAGAACATTTCGATGGTTTGACCCAAAAAAACAAATGACGTCATATAGC
HearG4 1838 TAAAATTTGTTCTAGAACATTTCACGGCTTGACCCAAAAAAACAAATGACGTCATATAGC
HearC1 1732 TAAAATTTGTTCTAGAACATTTCACGGCTTGACCCAAAAAAACAAATGACGTCATATAGC
HearNNG1 1733 TAAAATTTGTTCTAGAACATTTCGATGGCCCCGACCT--AAAAACAAATTACGTCATATAGC
HearAus 1820 TAAAATTTGTTCTAGAACATTTCACGGCTTGACCCAAAAAAACAAATGACGTCATATAGC
                      *****
HearSP1B 1707 GTG-----CGTCCAATCACAACACGAATCACGCCTTGTCTAAAGATAACATTTCC
HearLB6 1680 GTG-----CGTCCAATCACAACACGAATCACGCCTTGTCTAAAGATAACATTTCC
HearG4 1898 GTGATTTGGAAATCGTCCAATCACAACACGAATCACGCCTTGTCTAAAGATAACATTTCC
HearC1 1792 GTGATTTGGAAATCGTCCAATCACAACACGAATCACGCCTTGTCTAAAGATAACATTTCC
HearNNG1 1791 GTG-----CGTCCAATCACAACACGAATCACGCCTTGTCTAAAGATAACATTTCC
HearAus 1880 GTGATTTGAAATCGTCCAATCACAACACGAATCACGCCTTGTCTAAAGATAACATTTCC
                      ***
HearSP1B 1757 CGCGCATGTTTAAACTAATCTTGGATCTTTTCGTTTCGAAACGGGCCGTGGTCTTTTGTTT
HearLB6 1730 CGCGC-----CGGGCCGTGATCTTTTGTTT
HearG4 1958 CGCGCATGTTTAAATAGTCTTGGATCTTTTCGTTTCGAAACGGGCCGTGATCTTTTGTTT
HearC1 1852 CGCGCATGTTTAAATAGTCTTGGATCTTTTCGTTTCGAAACGGGCCGTGATCTTTTGTTT
HearNNG1 1841 CGCGCATGTTTAAACTAATCTTGGATCTTTTCGTTTCGAAACGGGCCGTGATCTTTTGTTT
HearAus 1940 CGCGCATGTTTAAATAGTCTTGGATCTTTTCGTTTCGAAACGGGCCGTGATCTTTTGTTT
                      *****
HearSP1B 1817 CAATTCATGATTTAGAAAAAAA--CGAACATAAAATTTTACCGCGCATTTTAAACTAGT
HearLB6 1755 CAGTTCATGATTTAGAAAAAAAACGAACATAAAATTTTACCGCGCATTTTAAACTAGT
HearG4 2018 CGACTTATGATTTAGAAAAAAA--CGAACATAAAATTTTACCGCGCATTTTAAACTAGT
HearC1 1912 CGACTTATGATTTAGAAAAAAA--CGAACATAAAATTTTACCGCGCATTTTAAACTAGT
HearNNG1 1901 CAATTCATGATTTAGAAAAAAA--CGAACATAAAATTTTACCGCGCATTTTAAACTAGT
HearAus 2000 CGACTTATGATTTAGAAAAAAA--CGAACATAAAATTTTACCGCGCATTTTAAACTAGT
                      *
HearSP1B 1875 CTAGGATCTTTTGTTCAAAACGTGCCGTGATCTTTTCGTTTCGAAACGGGCCGTGATCTT
HearLB6 1815 GTTGGATTTTTTGTTCGTTGAAACGAGCCGTGATCTTTTCGTTTCGAAACGGGCCGTGATCTT
HearG4 2076 CTAGGATCTTTTCGTTCAAACGGGCCGTGATCTTTTCGTTTCGAAACGGGCCGTGATCTT
HearC1 1970 CTAGGATCTTTTCGTTCAAACGGGCCGTGATCTTTTCGTTTCGAAACGGGCCGTGATCTT
HearNNG1 1959 GTTGGATTTTTTGTTCGTTGAAACGAGCCGTGATCTTTTCGTTTCGAAACGGGCCGTGATCTT
HearAus 2058 CTAGGATCTTTTCGTTCAAACGGGCCGTGATCTTTTCGTTTCGAAACGGGCCGTGATCTT
                      *
HearSP1B 1935 TTCGTTTCGAAACGGGCCGTGATCTTTTGTTTCGCTGACTCGTGACCCAAAAAAACAAATT
HearLB6 1875 TTCGTTTCGAAACGGGCCGTGATCTTTTGTTTCGCTGACTCGTGACCCAAAAAAACAAATC
HearG4 2135 TTCGTTTCGAAACGGGCCGTGATCTTTTGTT--CT-CTCATGACCCAAAAAAACAAATT

```

```

HearC1      2029  TTCGTTTCGAAACGGGCCGTGATCTTTTGTT---CT-CTCATGACCCAAAAAAACAAATT
HearNNG1    2019  TTCGTTTCGAAACGGGCCGTGATTTTTTTGTTTCGCTGACTCGTGACCCAAAAAAACAAATT
HearAus      2117  TTCGTTTCGAAACGGGCCGTGATCTTTTGTTTCGCTGACTCGTGACCCAAAAAAACAAATC
                ***** **

HearSP1B    1995  ACGTCATTTCGTTTAAATATTGCATCATCTTTAAATTTCGAAACTCGCCCGCGCTTTCATA
HearLB6     1935  ACGTCATTTCGTTTAGAATATTGCATCATCTTTAAATTTCGAAACTCGCCCGCGCTTTCATA
HearG4      2191  ACGTCATCCGTTTAGGATATTGCATCATCTTTAAATTCAAACTAGCCCGCGCTTTCATA
HearC1      2085  ACGTCATCCGTTTAGGATATTGCATCATCTTTAAATTCAAACTAGCCCGCGCTTTCATA
HearNNG1    2079  ACGTCATTTCGTTTAAATATTGCATCAT-TTTTAAATTTCGAAACTCGCCCGCGCTTTCATA
HearAus      2177  ACGTCATCCGTTTAGGATATTGCATCATCTTTAAATTCAAAACCCGCCCGCGCTTTCATA
                *****

HearSP1B    2055  CGAAACCGCCGGCAAAGATCGGTAAAATTTGTTCTAGAACGTTCCACGGCTTGACCCAAA
HearLB6     1995  CGAAACCGTCGGCAAAGATCGATAAAAATTTGTTCTAGAACGTTCCACGGCTTGACCCAAA
HearG4      2251  TGAAACCGTCGGCAAAGATCGGTAAAATTTGTTCTAGAACGTTCCACGGCTTGACCC-AA
HearC1      2145  TGAAACCGTCGGCAAAGATCGGTAAAATTTGTTCTAGAACGTTCCACGGCTTGACCC-AA
HearNNG1    2138  CAAAACCGTCGGCGAAGATCGGTAAAATTTGTTCTAGAACGTTCCACGGCTTGACCCAAA
HearAus      2237  TGAAACCGTCGGCAAAGATCGGTAAAATTTGTTCTAGAACGTTCCACGGCTTGACCC-AA
                *****

HearSP1B    2115  AAAACAAATGACGTCATATGGCGTGATTTTAAATCTATTTAATCGTCTCTGGCGTACAAA
HearLB6     2055  AAAACAAATGACGTCATATGGCGTGATTTTAAATCTATTTAATCGTCTCTGGCGTACAAA
HearG4      2310  AAAACAAATGACGTCATATGGCG-----TTTAATCGTCTCTGGCGTACAAA
HearC1      2204  AAAACAAATGACGTCATATGGCG-----TTTAATCGTCTCTGGCGTACAAA
HearNNG1    2198  AAAACAAATGACGTCATATGGCGTGATTTTAAATCTATTTAATCGTCTCTGGCGTACAAA
HearAus      2296  AAAACAAATGACGTCATATGGCG-----TTTAATCAA-----TCTTTGGCGTACAAA
                *****

HearSP1B    2175  AGT
HearLB6     2115  AGT
HearG4      2356  AGT
HearC1      2250  AGT
HearNNG1    2258  AGT
HearAus      2343  AGT
                ***

```

Fig 9B

```

HearSP1B      1 CTAGCCGGTCCGTTTCTGTTGACGCTGAACGCTGTATGTTTGATGCGGTACCGTTCCTTTG
HearLB6       1 CTAGCCGGTCCGTTTCTGTTGACGCTGAACGCTGTATGTTTGATGCGGTACCGTTCCTTTG
HearG4        1 CTAGCCGGTCCGTTTCTGTTGACGCTGAACGCTGTATGTTTGATGCGGTACCGTTCCTTTG
HearC1        1 CTAGCCGGTCCGTTTCTGTTGACGCTGAACGCTGTATGTTTGATGCGGTACCGTTCCTTTG
HearNNG1      1 CTAGCCGGTCCGTTTCTGTTGACGCTGAACGCTGTATGTTTGATGCGGTACCGTTCCTTTG
HearAus       1 CTAGCCGGTCCGTTTCTGTTGACGCTGAACGCTGTATGTTTGATGCGGTACCGTTCCTTTG
                *****

HearSP1B      61 CGAGCGTTCATTGCACGTCGGACTTCGTCTACAGTCGTGTCGCGATATGTATGCGGGCAT
HearLB6       61 CGAGCGTTCATTGCACGTCGGACTTCGTCTACAGTCGTGTCGCGATATGTATGCGGGCAT
HearG4        61 CGAGCGTTCATTGCACGTCGGACTTCGTGTCGACAGTCGTGTCGCGATATGTATGCGGACAT
HearC1        61 CGAGCGTTCATTGCACGTCGGACTTCGTCTACAGTCGTGTCGCGATATGTATGCGGACAT
HearNNG1      61 CGAGCGTTCATTGCACGTCGGACTTCGTCTACAGTCGTGTCGCGATATGTATGCGGGCAT
HearAus       61 CGAGCGTTCATTGCACGTCGGACTTCGTCTACAGTCGTGTCGCGATATGTATGCGGACAT
                *****

HearSP1B      121 TTTATTTCCATAGGCACAATCGTGTGTCGTGTCGTCTAGAATAAAGTAGGCGTCCGGCGATGCG
HearLB6       121 TTTATTTCCATAGGCACAATCGTGTGTCGTGTCGTCTAGAATAAAGTAGGCGTCCGGCGATGCG
HearG4        121 TTTATTTCCATAGGCACAATCGTGTGTCGTGTCGTCTAGAATAAAGTAGGCGTCCGGCGATGCG
HearC1        121 TTTATTTCCATAGGCACAATCGTGTGTCGTGTCGTCTAGAATAAAGTAGGCGTCCGGCGATGCG
HearNNG1      121 TTTATTTCCATAGGCACAATCGTGTGTCGTGTCGTCTAGAATAAAGTAGGCGTCCGGCGATGCG
HearAus       121 TTTATTTCCATAGGCACAATCGTGTGTCGTGTCGTCTAGAATAAAGTAGGCGTCTGGCGATGCG
                *****

HearSP1B      181 GAATGTAATCCGTATTTGCTAAAGAACATACCGCAATCGAGAACAGTCTCTGTAATTTTTT
HearLB6       181 GAATGTAATCCGTATTTGCTAAAGAACATACCGCAATCGAGAACAGTCTCTGTAATTTTTT
HearG4        181 GAATGTAATCCGTATTTGCTAAAGAACATACCGCAATCGAGAACAGTCTCTGTAATTTTTT
HearC1        181 GAATGTAATCCGTATTTGCTAAAGAACATACCGCAATCGAGAACAGTCTCTGTAATTTTTT
HearNNG1      181 GAATGTAATCCGTATTTGCTAAAGAACATACCGCAATCGAGAACAGTCTCTGTAATTTGTT
HearAus       181 GAATGTAATCCGTATTTGCTAAAGAACATACCGCAATCGAGAACAGTCTCTGTAATTTTTT
                *****

HearSP1B      241 TTATTAGTTTCGCGTTCGACACATTACGGAACCAGATTCAAAAGCGATTCAATTGTTTTTC
HearLB6       241 TTATTAGTTTCGCGTTCGACACATTACGGAACCAGATTCAAAAGCGATTCAATTGTTTTTC
HearG4        241 TTATTAGTTTCGCGTTCGACACATTACGGAACCAGATTCAAAAGCGATTCAATTGTTTTTC
HearC1        241 TTATTAGTTTCGCGTTCGACACATTACGGAACCAGATTCAAAAGCGATTCAATTGTTTTTC
HearNNG1      241 TTATTAGTTTCGCGTTCGACACATTACGGAACCAGATTCAAAAGCGATTCAATTGTTTTTC
HearAus       241 TTATTAGTTTCGCGTTCGACACATTACGGAACCAGATTCAAAAGCGATTCAATTGTTTTTC
                *****

HearSP1B      301 ACGCAAGTTTCCTGTTCCAATCCGTAGGTGAGCGCCGGAATCGGTGCGCAGACCAATGCCG
HearLB6       301 ACGCAAGTTTCCTGTTCCAATCCGTAGGTGAGCGCCGGAATCGGTGCGCAGACCAATGCCG
HearG4        301 ACGCAAGTTTCCTGTTCCAATCCGTAGGTGAGCGCCGGAATCGGTGCGCAGACCAATGCCG
HearC1        301 ACGCAAGTTTCCTGTTCCAATCCGTAGGTGAGCGCCGGAATCGGTGCGCAGACCAATGCCG
HearNNG1      301 ACGCAAGTTTCCTGTTCCAATCCGTAGGTGAGCGCCGGAATCGGTGCGCAGACCAATGCCG
HearAus       301 ACGCAAGTTTCCTGTTCCAATCCGTAGGTGAGCGCCGGAATCGGTGCGCAGACCAATGCCG
                *****

HearSP1B      361 CTGCTGCTGTTTCGTATTAGATCCCGAAGCAGTTTGTGTCGATCGAGCCGCAACAAAAACCAT
HearLB6       361 CTACTGCTGTTTCGTATTAGATCCCGAAGCAGTTTGTGTCGATCGAGCCGCAACAAAAACCAT
HearG4        361 CTGCTGCTGTTTCGTATTAGATCCCGAAGCAGTTTGTGTCGATCGAGCCGCAACAAAAACCAT
HearC1        361 CTGCTGCTGTTTCGTATTAGATCCCGAAGCAGTTTGTGTCGATCGAGCCGCAACAAAAACCAT
HearNNG1      361 CTGCTGCTGTTTCGTATTAGATCCCGAAGCAGTTTGTGTCGATCGAGCCGCAACAAAAACCAT
HearAus       361 CTGCTGCTGTTTCGTATTAGATCCCGAAGCAGTTTGTGTCGATCGAGCCGCAACAAAAACCAT
                **

```

Fig 9B Continuación

HearSP1B	421	AGCGGGTTCGTCGATTGTCCACGTGTTGCTTTTTTCGATTTCCATGATTTTCATGCCGTGAC
HearLB6	421	AGCGGGTTCGTCGATTGTCCACGTGTTGCTTTTTTCGATTTTCATGATTTTCATGCCGTGAC
HearG4	421	AGCGGGTTCGTCGATTGTCCACGTGTTGCTTTTTTCGATTTTCATGATTTTCATGCCGTGAC
HearC1	421	AGCGGGTTCGTCGATTGTCCACGTGTTGCTTTTTTCGATTTTCATGATTTTCATGCCGTGAC
HearNNG1	421	AGCGGGTTCGTCGATTGTCCACGTGTTGCTTTTTTCGATTTTCATGATTTTCATGCCGTGAC
HearAus	421	AGCGGGTTCGTCGATTGTCCACGTGTTGCTTTTTTCGATTTTCATGATTTTCATGCCGTGAC

HearSP1B	481	AATAATTGTGTTATGCTTTTCAGTTGACTCACATAATTGGTAAAAACAGTATTTGTCAAAT
HearLB6	481	AATAATTGTGTTATGCTTTTCAGTTGACTCACATAATTGGTAAAAACAGTATTTGTCAAAT
HearG4	481	AATAATTGTGTTATGCTTTTCAGTTGACTCACATAATTGGTAAAAACAGTATTTGTCAAAT
HearC1	481	AATAATTGTGTTATGCTTTTCAGTTGACTCACATAATTGGTAAAAACAGTATTTGTCAAAT
HearNNG1	481	AATAATTGTGTTATGCTTTTCAGTTGACTCACATAATTGGTAAAAACAGTATTTGTCAAAT
HearAus	481	AATAATTGTGTTATGCTTTTCAGTTGACTCACATAATTGGTAAAAACAGTATTTGTCAAAT

HearSP1B	541	ATGTTCTGCTGTTTCGGCGGTGAGCAAATCGCACGGGACACTAATGATTTGGTCATTTTTT
HearLB6	541	ATGTTCTGCTGTTTCGGCGGTGAGCAAATCGCACGGGACACTAATGATTTGGTCATTTTTT
HearG4	541	ATGTTCTGCTGTTTCGGCGGTGAGCAAATCGCACGGGACACTAATGATTTGGTCATTTTTT
HearC1	541	ATGTTCTGCTGTTTCGGCGGTGAGCAAATCGCACGGGACACTAATGATTTGGTCATTTTTT
HearNNG1	541	ATGTTCTGCTGTTTCGGCGGTGAGCAAATCGCACGGGACACTAATGATTTGGTCATTTTTT
HearAus	541	ATGTTCTGCTGTTTCGGCGGTGAGCAAATCGCACGGGACACTAATGATTTGGTCATTTTTT

HearSP1B	601	GTGGTCGACATGGTCACGCGCAATAATATATTATAAAATTATATTTTCGTGAGAAGCCAATC
HearLB6	601	GTGGTCGACATGGTCACGCGCAATAATATATTATAAAATTATATTTTCGTGAGAAGCCAATC
HearG4	601	GTGGTCGACATGGTCACGCGCAATAATATATTATAAAATTATATTTTCGTGAGAAGCCAATC
HearC1	601	GTGGTCGACATGGTCACGCGCAATAATATATTATAAAATTATATTTTCGTGAGAAGCCAATC
HearNNG1	601	GTGGTCGACATGGTCACGCGCAATAATATATTATAAAATTATATTTTCGTGAGAAGCCAATC
HearAus	601	GTGGTCGACATGGTCACGCGCAATAATATATTATAAAATTATATTTTCGTGAGAAGCCAATC

HearSP1B	661	GAGAAGTTTTACGTACACGGCCGACTGTAGCGTGTTATCGGATTCAGTGTATTTAACTAG
HearLB6	661	GAGAAGTTTTACGTACACGGCCGACTGTAGCGTGTTATCGGATTCAGTGTATTTAACTAG
HearG4	661	GAGAAGTTTTACGTACACGGCCGACTGTAGCGTGTTATCGGATTCAGTGTATTTAACTAG
HearC1	661	GAGAAGTTTTACGTACACGGCCGACTGTAGCGTGTTATCGGATTCAGTGTATTTAACTAG
HearNNG1	661	GAGAAGTTTTACGTACACGGCCGACTGTAGCGTGTTATCGGATTCAGTGTATTTAACTAG
HearAus	661	GAGAAGTTTTACGTACACGGCCGACTGTAGCGTGTTATCGGATTCAGTGTATTTAACTAG

HearSP1B	721	AAATTGCACTAAAATATTTAAAATTCTGCTCTGATTGAACATCAATCGTTCCGTTTCAAT
HearLB6	721	AAATTGCACTAAAATATTTAAAATTCTGCTCTGATTGAACATCAATCGTTCCGTTTCAAT
HearG4	721	AAATTGCACTAAAATATTTAAAATTCTGCTCTGATTGAACATCAATCGTTCCGTTTCAAT
HearC1	721	AAATTGCACTAAAATATTTAAAATTCTGCTCTGATTGAACATCAATCGTTCCGTTTCAAT
HearNNG1	721	AAATTGCACTAAAATATTTAAAATTCTGCTCTGATTGAACATCAATCGTTCCGTTTCAAT
HearAus	721	AAATTGCACTAAAATATTTAAAATTCTGCTCTGATTGAACATCAATCGTTCCGTTTCAAT

HearSP1B	781	AGCCATGTCCATGAACGATTGAACGGTGATCATCATACCATGTTGTTGAAAAATTAATTTT
HearLB6	781	AGCCATGTCCATGAACGATTGAACGGTGATCATCATACCATGTTGTTGAAAAATTAATTTT
HearG4	781	AGCCATGTCCATGAACGATTGAACGGTGATCATCATACCATGTTGTTGAAAAATTAATTTT
HearC1	781	AGCCATGTCCATGAACGATTGAACGGTGATCATCATACCATGTTGTTGAAAAATTAATTTT
HearNNG1	781	AGCCATGTCCATGAACGATTGAACGGTGATCATCATACCATGTTGTTGAAAAATTAATTTT
HearAus	781	AGCCATGTCCATGAACGATTGAACGGTGATCATCATACCATGTTGTTGAAAAATTAATTTT

HearSP1B	841	GCCCAATACGTTTTCAACTATACTGATGAATACCGTGTAATAATGTTTTTCGAGCAATATT
HearLB6	841	GCCCAATACGTTTTCAACTATACTGATGAATACCGTGTAATAATGTTTTTCGAGCAATATT

```

HearG4      841  GCCCAATACGTTTTCAACTATACTGATGAATACCGTGTA AAAATGTTTTTCGAGCAATATT
HearC1      841  GCCCAATACGTTTTCAACTATACTGATAAATACCGTGTA AAAATGTTTTTCGAGCAATATT
HearNNG1    841  GCCCAATACGTTTTCAACTATACTGATGAATACCGTGTA AAAATGTTTTTCGAGCAATATT
HearAus      841  GCCCAATACGTTTTCAACTATACTGATGAATACCGTGTA AAAATGTTTTTCGAGCAATATT
          *****

HearSP1B    901  CTGATTACAATTGAACGGATCGACGACCGGTGTCGCGTAGAAAAGTCTATGACAGATCTAAG
HearLB6     901  CTGATTACAATTGAACGGATCGACGACCGGTGTCGCGTAGAAAAGTCTATGACAGATCTAAG
HearG4      901  CTGATTACAATTGAACGGATCGACGACCGGTGTCGCGTAGAAAAGTCTATGACAGATCTAAG
HearC1      901  CTGATTACAATTGAACGGATCGACGACCGGTGTCGCGTAGAAAAGTCTATGACAGATCTAAG
HearNNG1    901  CTGATTACAATTGAACGGATCGACGACCGGTGTCGCGTAGAAAAGTCTATGACAGATCTAAG
HearAus      901  CTGATTACAATTGAACGGATCGACGACCGGTGTCGCGTAGAAAAGTCTATGACAGATCTAAG
          *****

HearSP1B    961  TTTAATCGATTTGTACGTATTCGATCGTTGCGTTGCAATCTTTTCACGTAAGGTTTCAT
HearLB6     961  TTTAATCGATTTGTACGTATTCGATCGTTGCGTTGCAATCTTTTCACGTAAGGTTTCAT
HearG4      961  TTTAATCGATTTGTACGTATTCGATCGTTGCGTTGCAATCTTTTCACGTAAGGTTTCAT
HearC1      961  TTTAATCGATTTGTACGTATTCGATCGTTGCGTTGCAATCTTTTCACGTAAGGTTTCAT
HearNNG1    961  TTTAATCGATTTGTACGTATTCGATCGTTGCGTTGCAATCTTTTCACGTAAGGTTTCAT
HearAus      961  TTTAATCGATTTGTACGTATTCGATCGTTGCGTTGCAATCTTTTCACGTAAGGTTTCAT
          *****

HearSP1B    1021 CGCAAAATTACAATCGTGTTGGAAAAGTTATTCCGTCACAAAAAAGTCCCTTAAATTAA
HearLB6     1021 CGCAAAATTACAATCGTGTTGGAAAAGTTATTCCGTCACAAAAAAGTCCCTTAAATTAA
HearG4      1021 CGCAAAATTACAATCGTGTTGGAAAAGTTATTCCGTCACAAAAAAGTCCCTTAAATTAA
HearC1      1021 CGCAAAATTACAATCGTGTTGGAAAAGTTATTCCGTCAC-AAAAAAGTCCCTTAAATTAA
HearNNG1    1021 CGCAAAATTACAATCGTGTTGGAAAAGTTATTCCGTCAC-AAAAAAGTCCCTTAAATTAA
HearAus      1021 CGCAAAATTACAATCGTGTTGGAAAAGTTATTCCGTCACAAAAAAGTCCCTTAAATTAA
          *****

HearSP1B    1081 AAAATTTCTACCGTGTAATCGATCTTCGCCGACGGTTTCATATGAAAGCGCGGGCGGGTT
HearLB6     1081 AAAATTTCTACCGTGTAATCGATCTTCGCCGACGGTTTCATATGAAAGCGCGGGCGGGTT
HearG4      1081 AAAATTTCTACCGTGTAATCGATCTTTGCCAACGGTTTCATATGAAAGCGCGGGCGAGTT
HearC1      1080 AAAAATTCGACCGTGTAATCGATCTTTGCCGACGGTTTCATATGAAAGCGCGGGCGGGTT
HearNNG1    1080 AAAATTTCTACCGTGTAATCGATCTTCGCCGACGGTTTCATATGAAAGCGCGGGCTAGTT
HearAus      1081 AAAATTTCTACCGTGTAATCGATCTTTGCCAACGGTTTCATATGAAAGCGCGGGCGAGTT
          ****  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

HearSP1B    1141 TTGAATTTAAAGATGATGCAATATCTTAAATGGATGACGTAATTTGTTTTTTT--CCTCAA
HearLB6     1141 TCGAATTTAAAAATGATGCAATATCTTAAACGGATGACGTAATTTGTTTTTTT--CCTCAA
HearG4      1141 TCGAA-TTAAAAATGATGCAATATCTTAAACGGATGACGTAATTTGTTTTTTT--CCTCAA
HearC1      1140 TCGAATTTAAAGATGATGCAATATCTTAAACGGATGACGTAATTTGTTTTTTT--CCTCAA
HearNNG1    1140 TCGAATTTAAAGATGATGCAATATCTTAAACGGATGATGTAATTTGTTTTTTTTCCTCAA
HearAus      1141 TCGAA-TTAAAAATGATGCAATATCTTAAACGGATGACGTAATTTGTTTTTTT--CCTCAA
          *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

HearSP1B    1199 TCATGAATAGAAGCAAAAGATCACGGCCCGTTTCGAACGAAAAGATCCAAGACCGGTTTA
HearLB6     1199 TCATGAATAGAAGCAAAAGATCACGGCCCGTTTCGAACGAAAAGATCCAAGACCGGTTTA
HearG4      1198 TCATGAATAAAAGCAAAAGATCACGGCCCGTTTCGAACGAAAAGATCCAAGACCGGTTTA
HearC1      1198 TCATGAATAAAAGCAAAAGATCACGGCCCGTTTCGAACGAAAAGATCCAAGACCGGTTTA
HearNNG1    1200 TCATGAATAGAAGCAAAAGATCACGGCCCGTTTCGAACGAAAAGATCCAAGACCGGTTTA
HearAus      1198 TCATGAATAGAAGCAAAAGATCACGACCCGTTTCGAACGAAAAGATCCAAGACCGGTTTA
          *****

HearSP1B    1259 AAAGTACGTTATCTTTGGGAGTGGCGTGATTCTGTTGAATACGTTTATGATTGGACAACCTT
HearLB6     1259 AAAGTACGTTATCTTTGGGCGTGGCGTGATTCTGTAGAATACGTTTGTGATTGGACAACCTT
HearG4      1258 AAAGTACGTTATCTTTGGGCGTGGCGTGATTCTGTTGAATACGTTTATGATTGGACAATTTT
HearC1      1258 AAAGTACGTTATCTTTGGGCGTGGCGTGATTCTGTTGAATACGTTTATGATTGGACAATTTT
HearNNG1    1260 AAAGTACGTTATCTTTGGGCGTGGCGTGATTCTGTTGAATACGTTTATGATTGGACAACCTT
HearAus      1258 AAAGTACGTTATCTTTGGGCGTGGCGTGATTCTGTTGAATACGTTTATGATTGGACAATTTT
          *****

```

Fig 9B Continuación

```

HearSP1B 1319 TTAAA-TCACGCCATATGACGTCATTTGTTTTTTT-AGGTCGAGCCATCGAACGTTCTAG
HearLB6 1319 TAAAAATCACGCCATATGATGTCATTTGTTTTTTTTTAAATCGAGCCATCGAACGTTCTAG
HearG4 1318 CTAGA-TCACGCCATATGACGTCATTTGTTTTTTT-AGGTCGAGCCATCGAATGTTCTAG
HearC1 1318 CTAGA-TCACGCCATATGACGTCATTTGTTTTTTT-GGGTCAAGCCGTGGAATGTTCTAG
HearNNG1 1320 TTAAA-TCACGCCATATGACGTCATTTGTTTTTTT-GGGTCAAGCCGTGGAATGTTCTAG
HearAus 1318 CTAGA-TCACGCCATATGACGTCATTTGTTTTTTT-AGGTCGAGCCATCGAATGTTCTAG
          * * ***** ** *****

HearSP1B 1377 AACAAATTTTATCGATCTTTGCCGACGGTTTCATATGAAAAGCGCGGGCGAGTTTCGAATT
HearLB6 1379 AACAAATTTTATCAATCTTTGCCGACGGTTTCGTATGAAAAGCGCGGGCGAGTTTCGAATT
HearG4 1376 AACAAATTTTATCGATCTTTGCCAACGGTTTCATATGAAAAGCGCGGGCGGGTTTCGAATT
HearC1 1376 AACAAATTTTATCGATCTTTGCCAACGGTTTCATATGAAAAGCGCGGGCGGGTTTCGAATT
HearNNG1 1378 AACAAATTTTATCGATCTTCGCCGACGGTTTCATATGAAAAGCGCGGGCGAGTTTCGAATT
HearAus 1376 AACAAATTTTATCGATCTTTGCCAACGGTTTCATATGAAAAGCGCGGGCGGGTTTCGAATT
          ***** ** *****

HearSP1B 1437 TAAAGATGATGCAATAATTTAAACGAATGACGTAATTTGTTTTTTT-----
HearLB6 1439 TAAAGATGATGCAATATTTTAAACGAATGACGTAATTTGTTTTTTT-----
HearG4 1436 TAAAGATGATGCAATATCCTAAACGGATGACGTAATTTGTTTTTTTCTCAATCATGAATA
HearC1 1436 TAAAGATGATGCAATAATTTAAACGAATGACGTAATTTGTTTTTTT-----
HearNNG1 1438 TAAAAATGATGCAATAATTTAAACGAATGACGTAATTTGTTTTTTT-----
HearAus 1436 TAAAGATGATGCAATATCCTAAACGGATGACGTAATTTGTTTTTTTCTCAATCATGAATA
          **** ***** *****

HearSP1B -----
HearLB6 -----
HearG4 1496 AAAGCAAAAGATCACGGCCCCGTTTCGAACGAAAAGATCCAAGACCGGTTTAAAAGTACGT
HearC1 -----
HearNNG1 -----
HearAus 1496 AAAGCAAAAGATCACGGCCCCGTTTCGAACGAAAAGATCCAAGACCGGTTTAAAAGTACGT

HearSP1B -----
HearLB6 -----
HearG4 1556 TATCTTTGGGCGTGCGTGATTGCGTGAATACGTTTATGATTGGACAATTTCTAGATCAC
HearC1 -----
HearNNG1 -----
HearAus 1556 TATCTTTGGGCGTGCGTGATTGCGTGAATACGTTTATGATTGGACAATTTCTAGATCAC

HearSP1B 1482 -----TGGGTCACG-----
HearLB6 1484 -----TGGGTCACG-----
HearG4 1616 GCCATATGACGTCATTTGTTTTTTTGGGTCAAGCCGTGGAATGTTCTAGAACAAATTTTA
HearC1 1481 -----TGGGTCATG-----
HearNNG1 1483 -----TGGGTCATG-----
HearAus 1616 GCCATATGACGTCATTTGTTTTTTTGGGTCAAGCCGTGGAATGTTCTAGAACAAATTTTA
          ***** *

HearSP1B 1491 -----AAGCG-----
HearLB6 1493 -----AAGCG-----
HearG4 1676 TCGATCTTTGCCAACGGTTTCATATGAAAAGCGCGGGCGGGTTTCGAATTTAAAGATGATG
HearC1 1490 -----AATAA-----
HearNNG1 1492 -----AGTGT-----
HearAus 1676 TCGATCTTTGCCAACGGTTTCATATGAAAAGCGCGGGCGGGTTTCGAATTTAAAGATGATG
          *

```

Fig 9B Continuación

```

HearSP1B 1496 -----AAACAAAAGA
HearLB6 1498 -----AAACAAAAGA
HearG4 1736 CAATATCCTAAACGGATGACGTAATTTGTTTTTCTCAATCATGAATAAAAAGCAAAAAGA
HearC1 1495 -----AAGCAAAATA
HearNNG1 1497 -----AAGCAAAAAGA
HearAus 1736 CAATATCCTAAACGGATGACGTAATTTGTTTTTCTCAATCATGAATAAAAAGCAAAAAGA
                                     ** ***** *

HearSP1B 1506 TCACGGCCCGTTTCGAACA---AAAAAATCCAAGACTAGTTTGAACATGCGCGAAAATT
HearLB6 1508 TCACGGCCCGTTTCGAACATAAAAAAAAAAATCCAAGACTAGTTTGAACATGCGCGAGAATT
HearG4 1796 TCACGGCCCGTTTCGAACA---AAAAAATCCAAGACTAGTTTGAACATGCGCGAGAATT
HearC1 1505 TCACGGCCCGTTTCGAACA---AAAAAATCCAAGACTAGTTTGAACATGCGCGAGAATT
HearNNG1 1507 TCACGGCCCGTTTCGAACA---AAAAAATCCAAGACTAGTTTGAACATGCGCGAGAATT
HearAus 1796 TCACGGCCCGTTTCGAACA---AAAAAATCCAAGACTAGTTTGAACATGCGCGAGAATT
          *****
          *****

HearSP1B 1562 TTTATTTTGGTAGATGATGTCATTTGTTTTTTTT--GGGTCACGACAAAAAATCACGGCC
HearLB6 1568 TTTATTTTGTATAGATGATGTCATTTGTTTTTTTTTTGGGTCACGACAAAAAATCACGGCC
HearG4 1852 TTTACTTTGGTAGATGATGTCATTTG--TTTTTT--GGGTCACGACAAAAAATCACGGCC
HearC1 1561 TTTACTTTGGTAGATGATGTCATTTG--TTTTTT--GGGTCACGACAAAAAATCACGGCC
HearNNG1 1563 TTTATTTTGGTAGATGATGTCATTTGTTTTTTTTTTGGGTCACGACAAAAAATCACGGCC
HearAus 1852 TTTACTTTGGTAGATGATGTCATTTG--TTTTTT--GGGTCACGACAAAAAATCACGGCC
          **** *****
          *****

HearSP1B 1620 CGTTTCAAACGAAAAGATCCGAGATCAGTTTAAACATTTCGCGGGAATTTTACTTTGGGC
HearLB6 1628 CGTTTCAAACGAAAAGATCCGAGATCAGTTTAAACATTTCGCGGGAATTTTACTTTGGTC
HearG4 1908 CGTTTCAAACGAAAAGATCCGAGATCAGTTTAAACATTTCGCGGGAATTTTACTTTGGTC
HearC1 1617 CGTTTCAAACGAAAAGATCCGAGATCAGTTTAAACATTTCGCGGGAATTTTACTTTGGTC
HearNNG1 1623 CGTTTCAAACGAAAAGATCCGAGATCAGTTTAAACATTTCGCGGGAATTTTACTTTGGTC
HearAus 1908 CGTTTCAAACGAAAAGATCCGAGATCAGTTTAAACATTTCGCGGGAATTTTACTTTGGTC
          *****
          *****

HearSP1B 1680 GATGATGTCATTTGTTTTTTTTGGGTCATAAATCGAAACAAAAGATCACGGTCCGTTTCGA
HearLB6 1688 GATGATATCATTGTTTTTTTTGGGTCACGAGTCGAAACAAAAAATCACGGCCCGTTTCGA
HearG4 1968 GATGATGTCATTTGTTTTTTTTGGGTCATAAATCGAAACAAAAGATCACGGCCCGTTTCGA
HearC1 1677 GATGATATCATTGTTTTTTTTGGGTCATAAATCGAAACAAAAGATCACGGCCCGTTTCGA
HearNNG1 1683 GATGATATCATTGTTTTTTTTGGGTCACGAGTCGAAACAAAAAATCACGGCCCGTTTCGA
HearAus 1968 GATGATGTCATTTGTTTTTTTTGGGTCATAAATCGAAACAAAAGATCACGGCCCGTTTCGA
          *****
          *****

HearSP1B 1740 ACGAAAAGATCCAAGACTAGTTTAAACGTGCGCGGGAAACATTATCTTTGGTAGATGATG
HearLB6 1748 ACGAAAAGATCCAAGACTAGTTTAAACGTGCGCGGGAAACATTATCTTTGGTAGATGATG
HearG4 2028 ACGAAAAAATCCAAGACTAGTTTAAACGTGCGCGGGA-ACATTATCTTTGGTAGATGATG
HearC1 1737 ACGAAAAAATCCAAGACTAGTTTAAACGTGCGCGGGATACATTATCTTTGGTAGATGATG
HearNNG1 1743 ACGAAAAGATCCAAGACTAGTTTAAACGTGCGCGGGAAACATTATCTTTGGTAGATGATG
HearAus 2028 ACGAAAAAATCCAAGACTAGTTTAAACGTGCGCGGGA-ACATTATCTTTGGTAGATGATG
          *****
          *****

HearSP1B 1800 TCATTTGTTTTTTTTGGGTCATGAATCGAAGCAAAAAGATCACGGCCCGTTTCGAACGAACA
HearLB6 1808 TCATTTGTTTTTTTTGGGTCATGAATCGAAGCAAAAAGATCACGGCCCGTTTCGAACGAACA
HearG4 2087 TCATTTGTTTTTTTTGGGTCATGAATCGAAGCAAAAAGATCACGGCCCGTTTCGAACGAACA
HearC1 1797 TCATTTGTTTTTTTTGGGTCATTAGTCGAAGTGAACGATCACGATCCGTTTC-----
HearNNG1 1803 TCATTTGTTTTTTTTGGGTCATGAATCGAAGCAAAAAGATTACGGCCCGTTTCGAACGAACA
HearAus 2087 TCATTTGTTTTTTTTGGGTCATGAATCGAAGCAAAAAGATCACGGCCCGTTTCGAACGAACA
          *****
          *****

```

Fig 9B Continuación

HearSP1B	1860	GATCCAAGACCAGTTTAAACTTGC	CGCGGGAAATGTTATCTGTTGTTGATGACGTAATTTG
HearLB6	1868	GATCCAAGACCAGTTTAAACTTGC	CGCGGGAAATGTTATCTGTTGTTGATGACGTAAATTTG
HearG4	2147	GATCCAAGACCAGTTTAAACTTGC	CGCGGGAAATGTTATCTGTTGTTAATGACGTAAATTTG
HearC1		-----	
HearNNG1	1863	GATCCAAGACCAGTTTAAACTTGC	CGCGGGAAATGTTATCTGTTGTTGATGACGTAAATTTG
HearAus	2147	GATCCAAGACCAGTTTAAACTTGC	CGCGGGAAATGTTATCTGTTGTTAATGACGTAAATTTG
HearSP1B	1920	TTTTTCGAATAGTGTGTCGTGTGCAAATTTTGGGTCATGAAACAAAAGATCGCGGCCCGTTT	
HearLB6	1928	TTTTTCGAATAGTGTGTCGTGTGCAAATTTTGGGTCATGAAACAAAAGATCGCGGCCCGTTT	
HearG4	2207	TTTTTCGAATAGTGTGTCGTGTGCAAATTTTGGGTCATGAAACAAAAGATCGCGGCCCGTTT	
HearC1	1848	-----AAACAAAA-----	
HearNNG1	1923	TTTTTCGAATAGTGTGTCGTGTGCAAATTTTGGGTCATGAAACAAAAGATCGCGGCCCGTTT	
HearAus	2207	TTTTTCGAATAGTGTGTCGTGTGCAAATTTTGGGTCATGAAACAAAAGATCGCGGCCCGTTT	*****
HearSP1B	1980	CAAACGAAAAGATCCGAGATCAGTTTAAAAATGCGATGCGCGGGAATTTTTTTT - AATTTG	
HearLB6	1988	CAAACGAAAAGATCCGAGATCAGTTTAAAAATGCGATGCGCGGGAATTTTTTTTAAATTTG	
HearG4	2267	CAAACGAAAAGATCCGAGATCAGTTTAAAAATGCGA-----	
HearC1		-----	
HearNNG1	1983	CAAACGAAAAGATCCGAGATCAGTTTAAAAATGCGATGCGCGGGAATTTTTTTT - AATTTG	
HearAus	2267	CAAACGAAAAGATCCGAGATCAGTTTAAAAATGCGA-----	
HearSP1B	2039	GTCAATGACGTA - TTTGTTTTTCGAGTAGTGCCGTGTGCAAAATGCTTTGAGTCATAAAT	
HearLB6	2048	GTGATGACGTAATTTGTTTTTCGATTAGTGCCGTGTGCAAAATGCTTTGAGTCATGAAT	
HearG4		-----	
HearC1		-----	
HearNNG1	2042	GTCAATGACGTAATTTGTTTTTCGAGTAGTGCCGTGTGCAAAATGCTTTGAGTCATAAAT	
HearAus		-----	
HearSP1B	2098	CAAAGCAAAAGATCGCGGCCCGTTTCAAACGAAAAGGTTCAAGATCAGTTTAAACCTGCG	
HearLB6	2108	CAAAGCAAAAGATCGCGGCCCGTTTCAAACGAAAAGGTTCAAGATTAGTTTAAACATGCG	
HearG4	2303	-----TGCG	
HearC1		-----	
HearNNG1	2102	CAAAGCAAAAGATCGCGGCCCGTTTCAAACGAAAAGGTTCAAGATCAGTTTAAACCTGCG	
HearAus	2303	-----TGCG	
HearSP1B	2158	CGGGAAATGTTATCTGTTGTTGATGACGTAATTTGTTTTTCGAGTAGTGCCGAGTGCAAA	
HearLB6	2168	CGGGAAATGTTATCTGTTGTTGATGACATAATTTGTTTTTCGAGTAGTGCCGAGTGCAAA	
HearG4	2307	CGGGAAATGTTATCTGTTGTTGATGACGTAATTTGTTTTTCGAGTAGTGCCGAGTGCAAA	
HearC1	1856	-----TAATT-----	
HearNNG1	2162	CGGGAAATGTTATCTGTTGTTGATGACGTAATTTGTTTTTCGAGTAGTGCCGAGTGCAAA	
HearAus	2307	CGGGAAATGTTATCTGTTGTTGATGACGTAATTTGTTTTTCGAGTAGTGCCGAGTGCAAA	*****
HearSP1B	2218	ATGACTTAATCTGTTTTTCTAAATCACGAATCGAAGCAAGAGATCACGGTCCGTTTCGAA	
HearLB6	2228	ATGACTTAATCTGTTT-----ATCACGAATCGAAGCAAAAGATCACGGTCCGTTTCGAA	
HearG4	2367	ATGACGAAATCTGTTTTTCTAAATCACGAATCGAAGCAAGAGATCACGGTCCGTTTCGAA	
HearC1	1861	-----ATCGA-----	
HearNNG1	2222	ATGACTTAATCTGTTTTTCTAAATCACGAATCGAAGCAAGAGATCACGGTCCGTTTCGAA	
HearAus	2367	ATGACGAAATCTGTTTTTCTAAATCACGAATCGAAGCAAGAGATCACGGTCCGTTTCGAA	*****

Fig 9B Continuación

```
HearSP1B 2278 CGAAAAGATCCAAGACTAGTTTAAAAAATACGTTATGTTTTGGGTGGGGC
HearLB6 2282 CGAAAAGATCCAAGACTAGTTTAAAAAATACGTTATGTTTTGGGTGGGGC
HearG4 2427 CGAAAAGATCCAAGACTAGTTTAAAAAATACGTTATGTTTTGGGTGGGGC
HearC1 1866 -----GCGTGGC--
HearNNG1 2282 CGAAAAGATCCAAGACTAGTTTAAAAAATACGTTATGTTTTGGGTGGGGC
HearAus 2427 CGAAAAGATCCAAGACTAGTTTAAAAAATACGTTATGTTTTGGGTGGGGC
* ****
```

Fig. 10

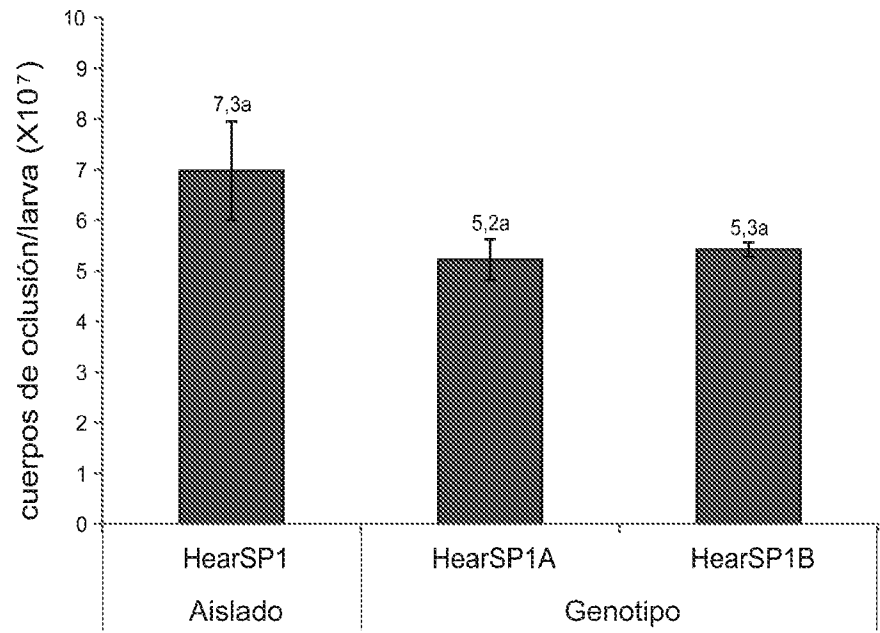


Fig 11

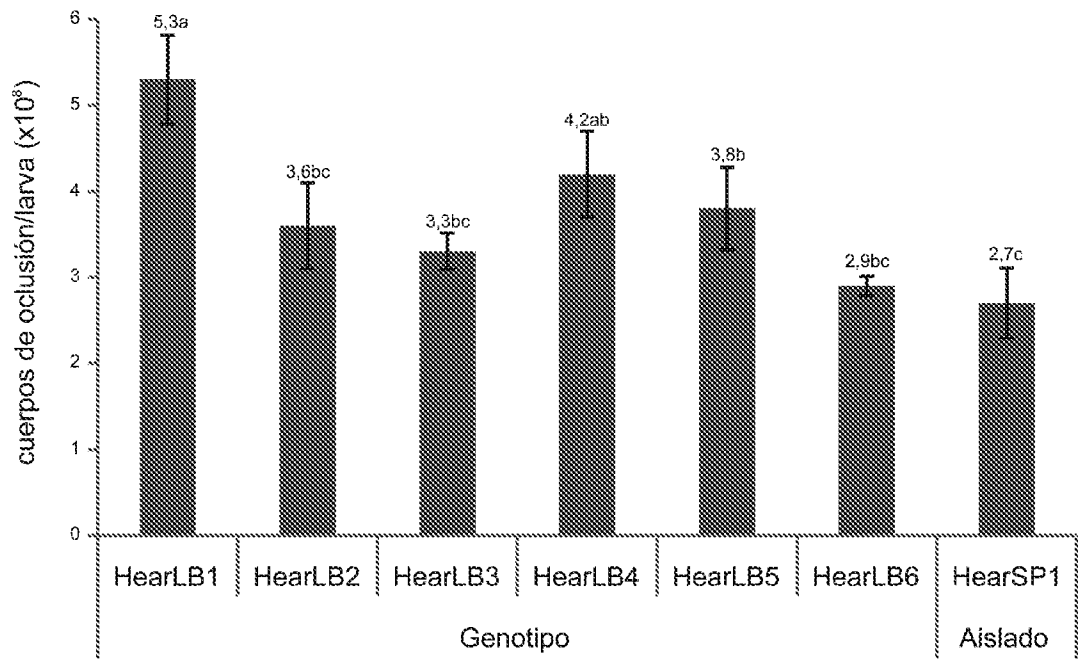


Fig. 12

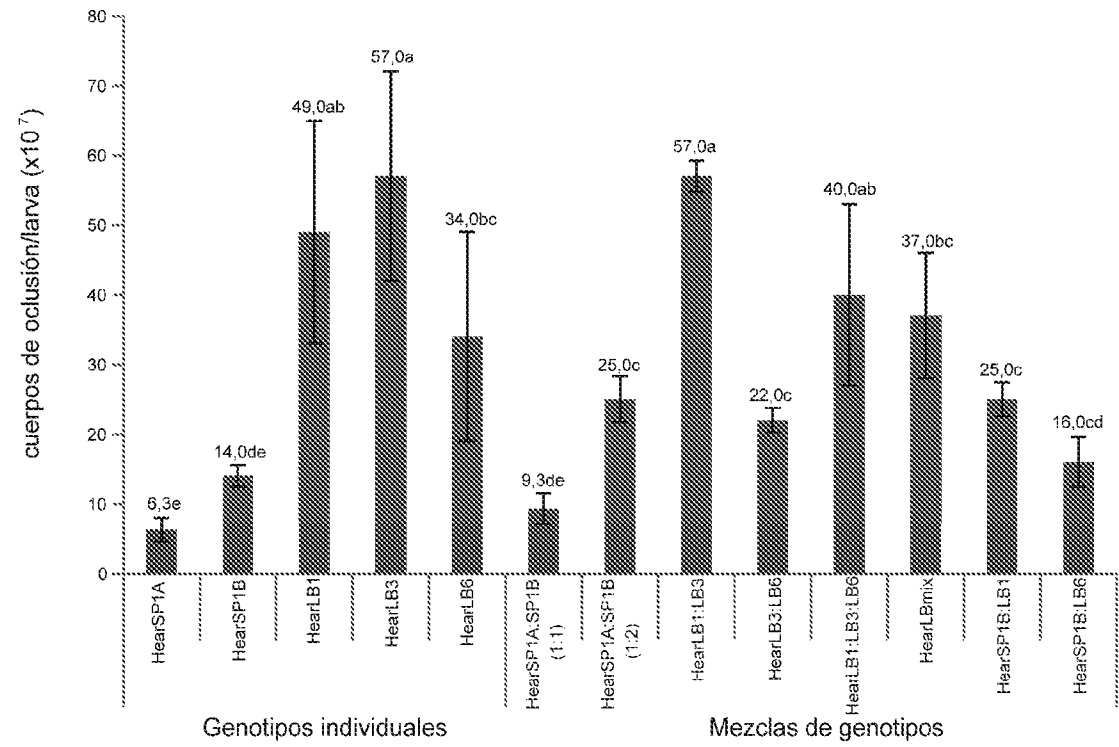


Fig. 13

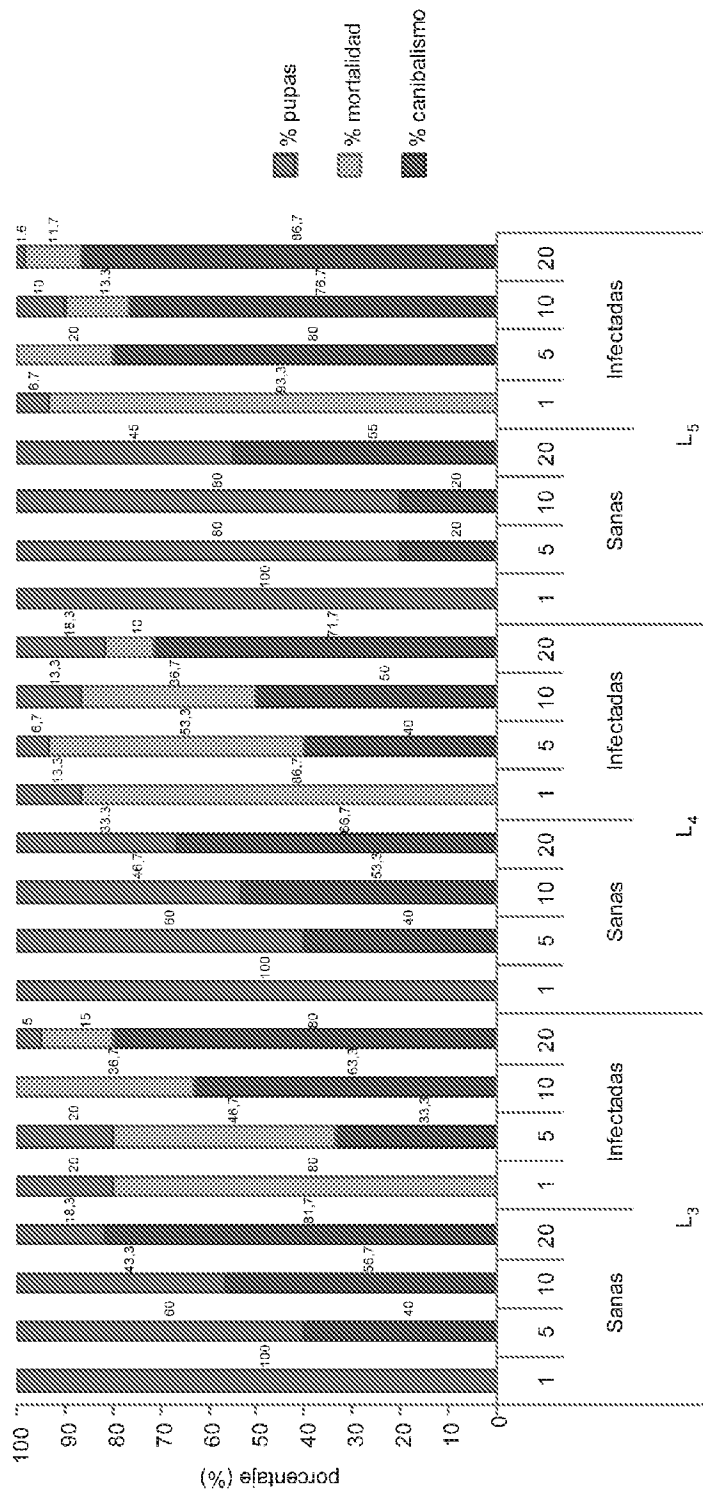


Fig. 14

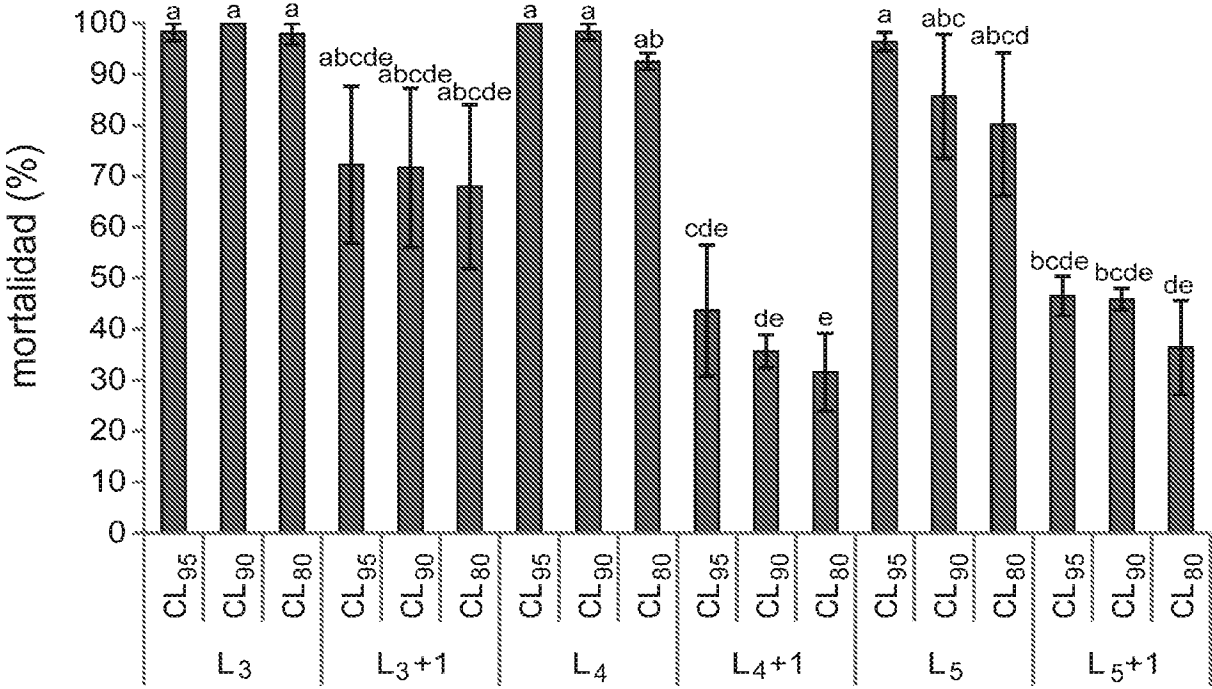
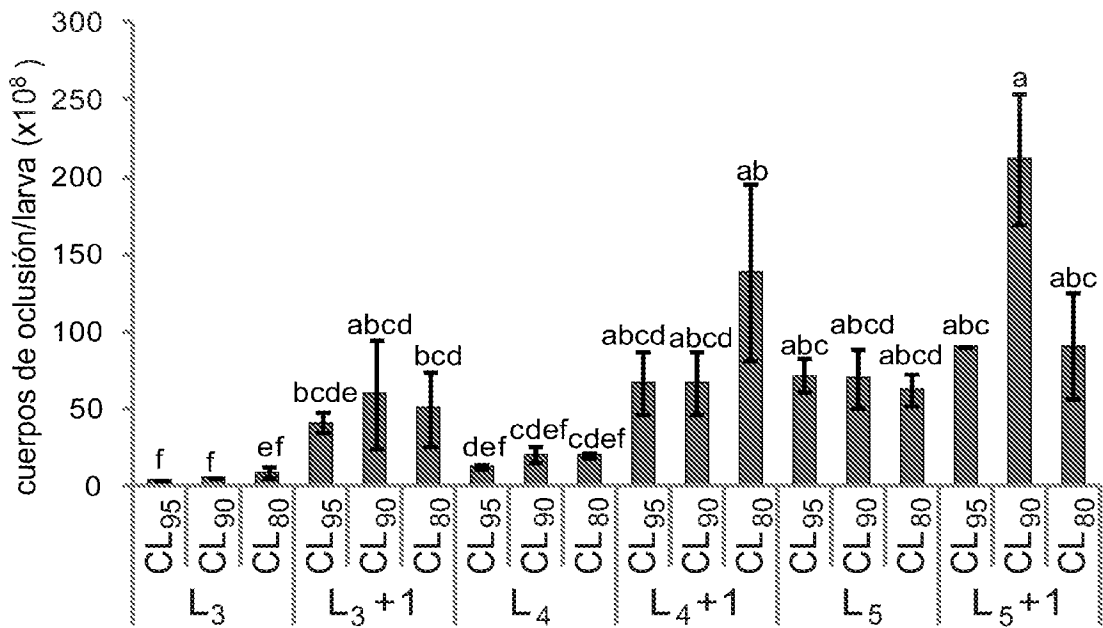


Fig. 15

A)



B)

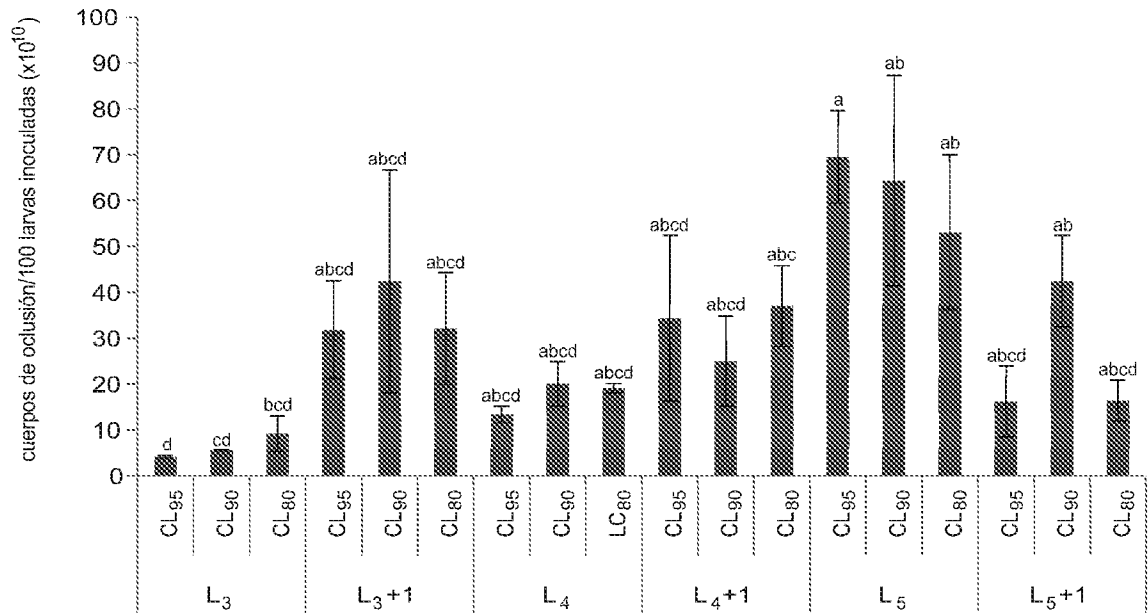


Fig. 16

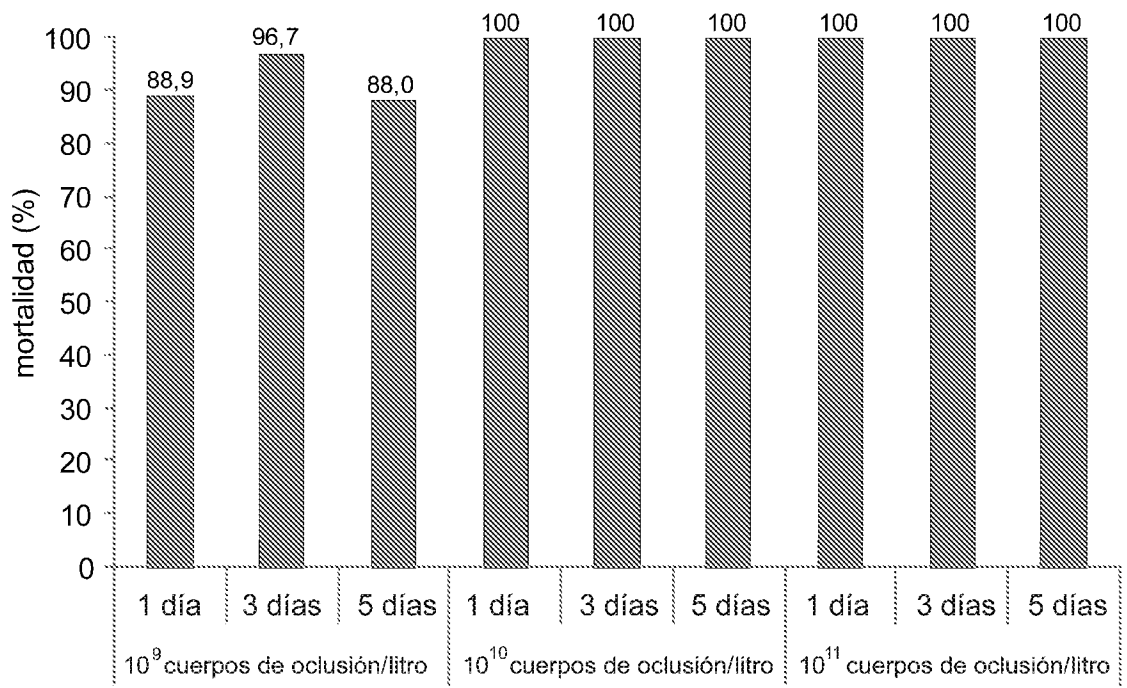
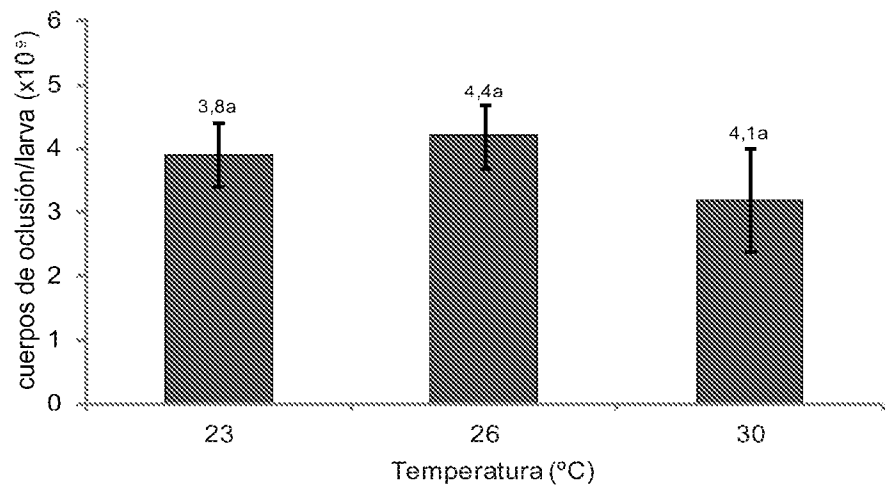


Fig. 17

Fig. 18

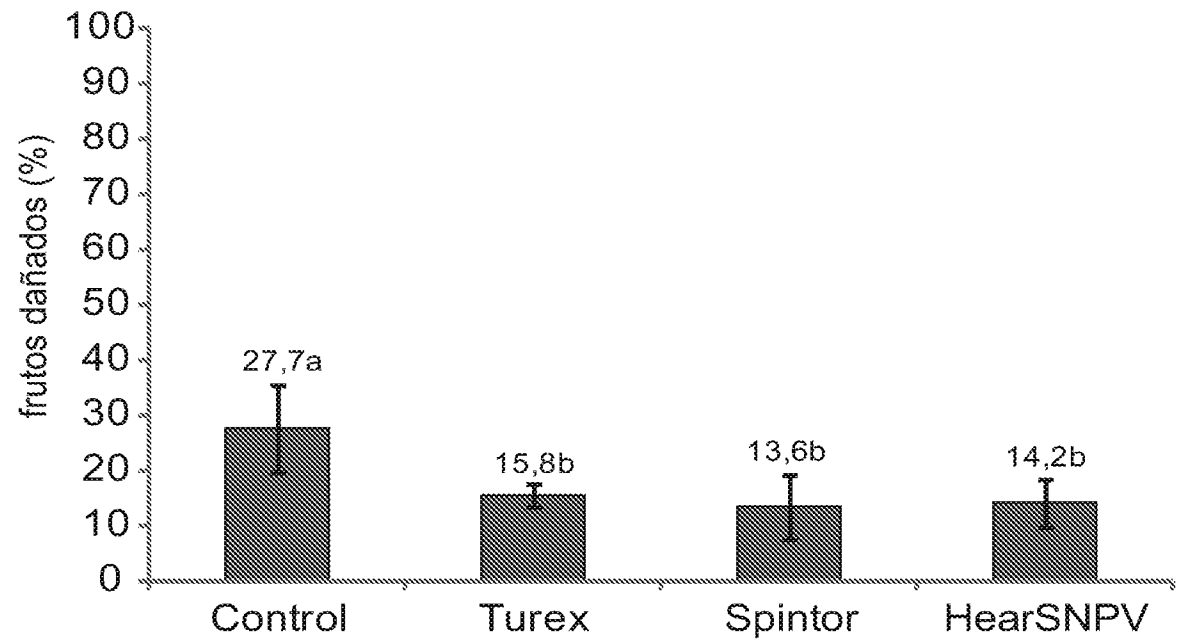


Fig. 19

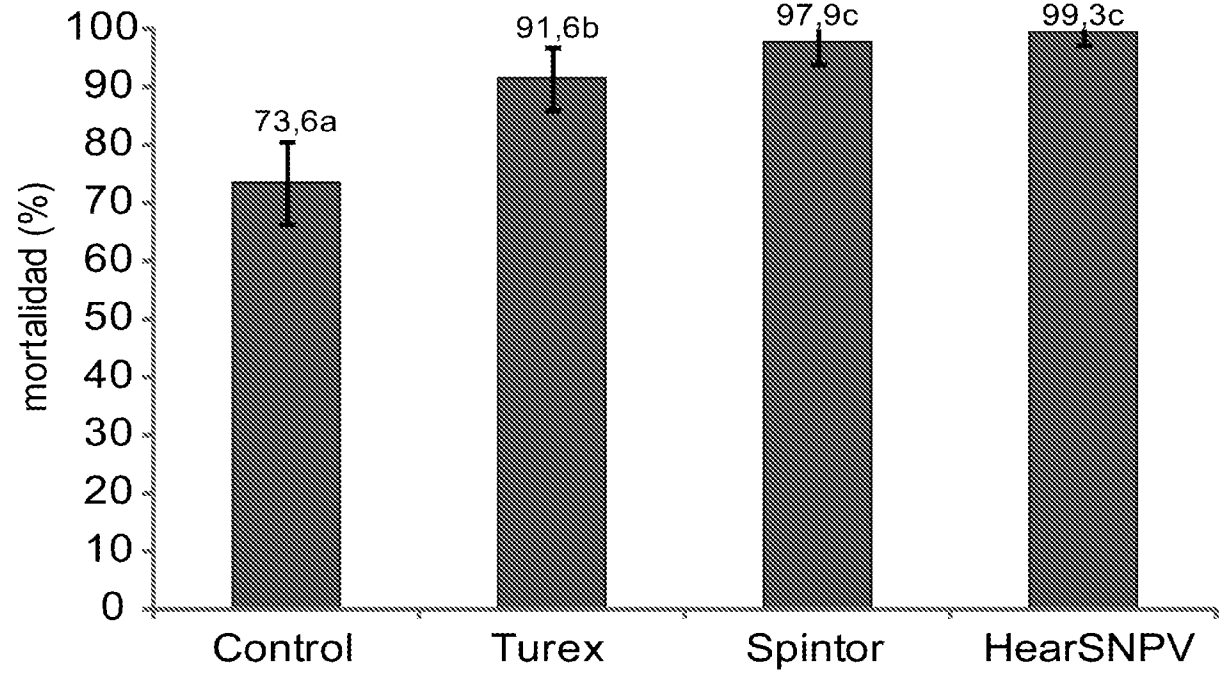


Fig. 20

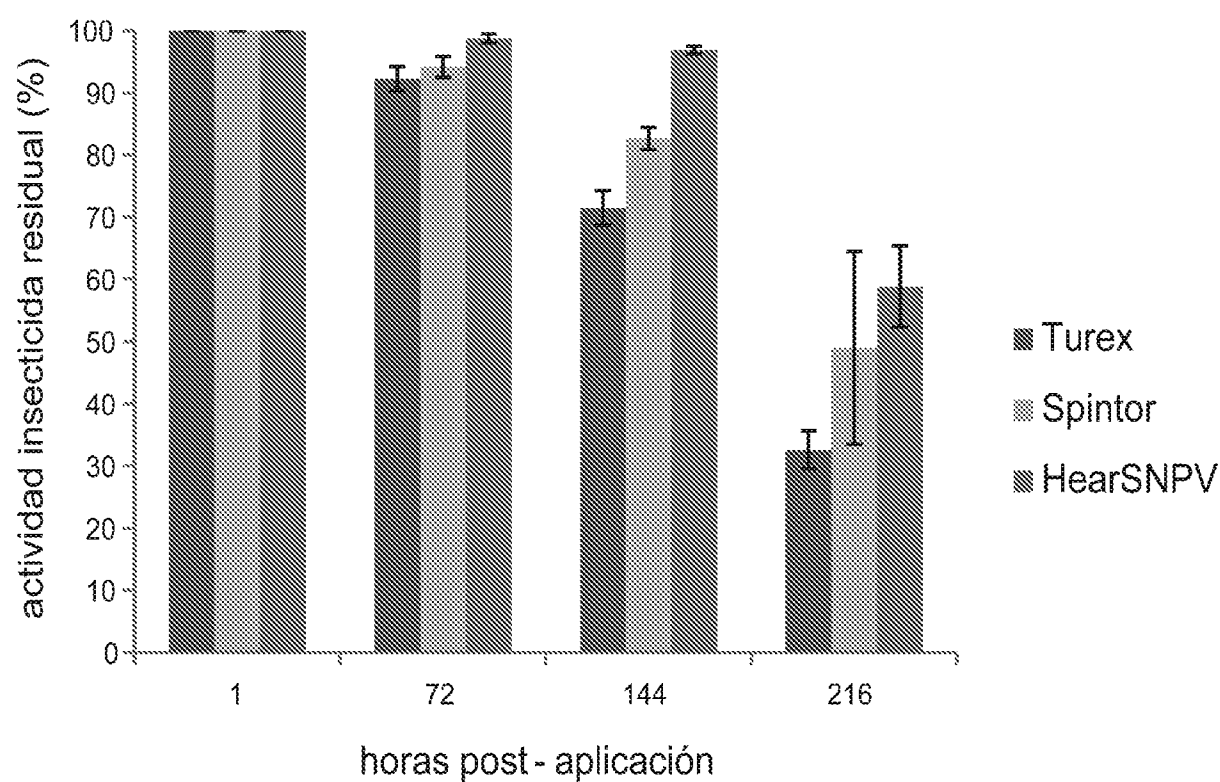
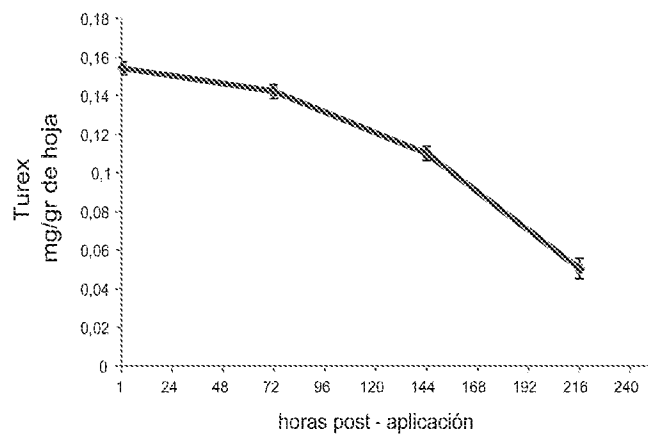
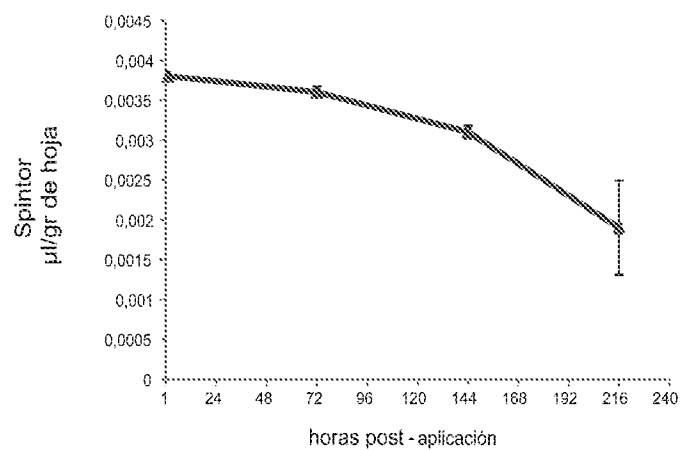


Fig. 21

A)



B)



C)

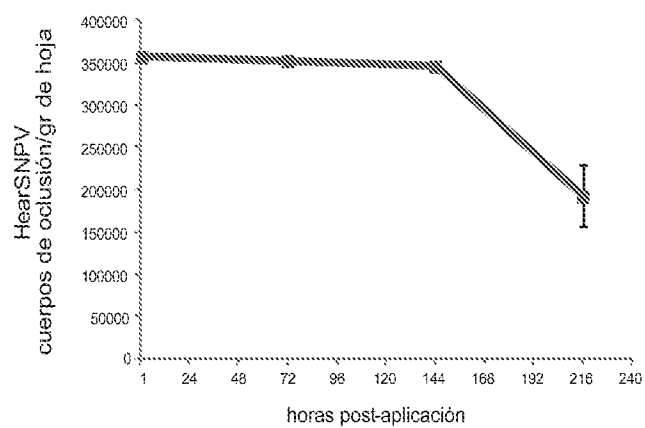
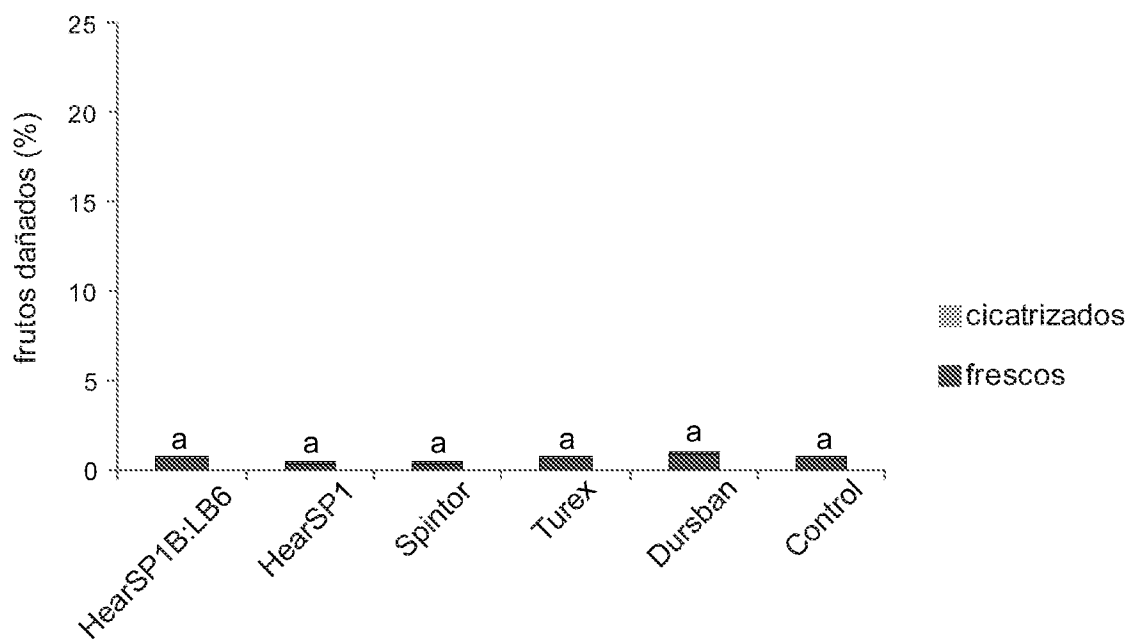
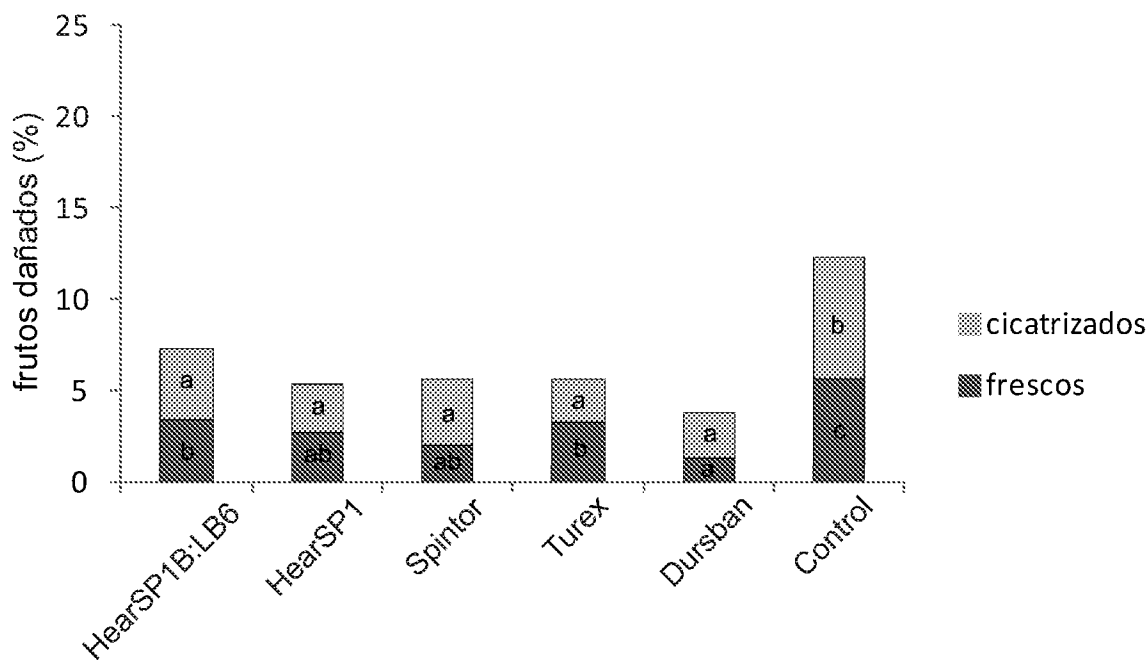


Fig. 22

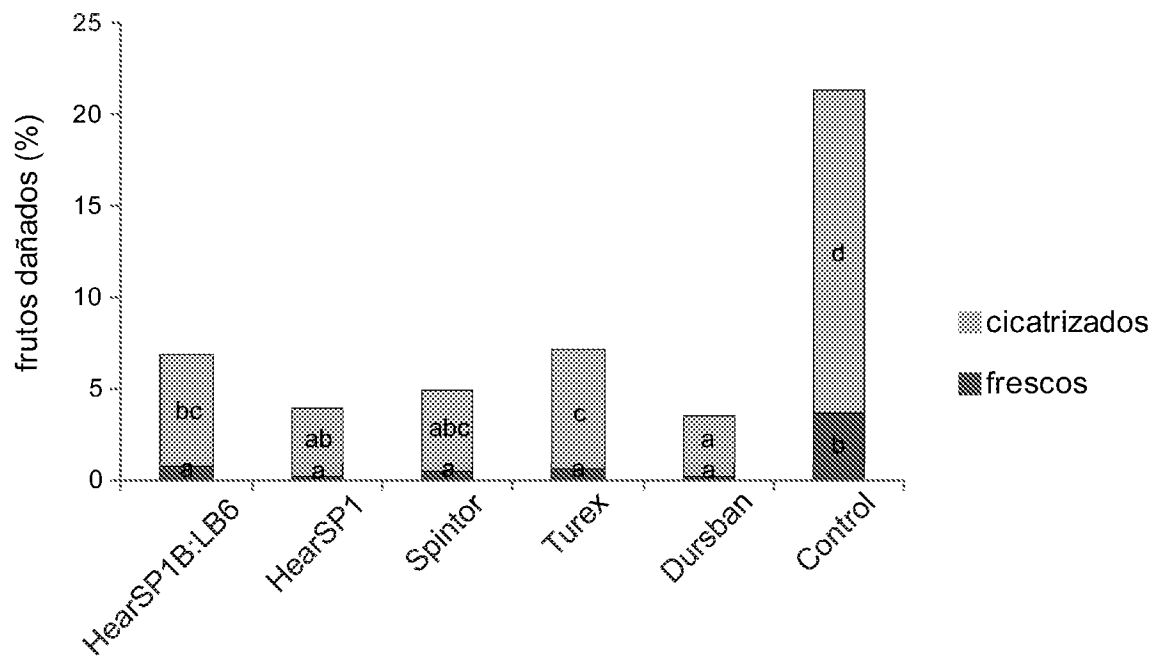
A)



B)



C)



D)

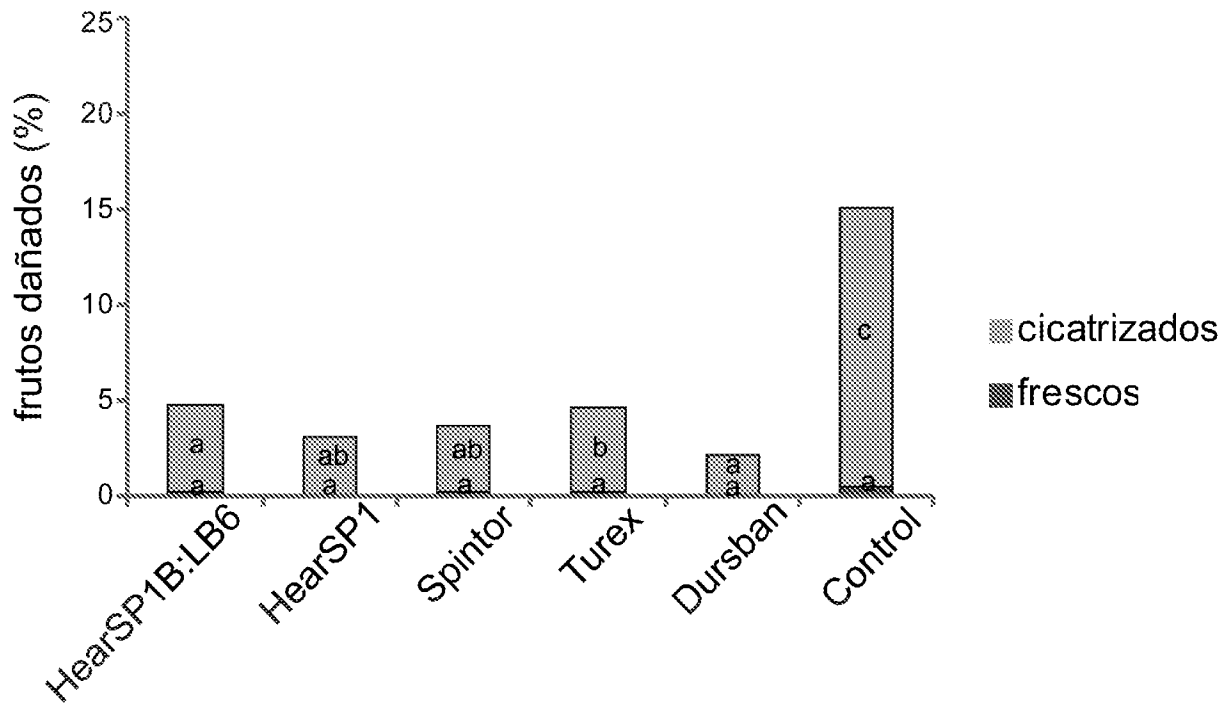


Fig. 23

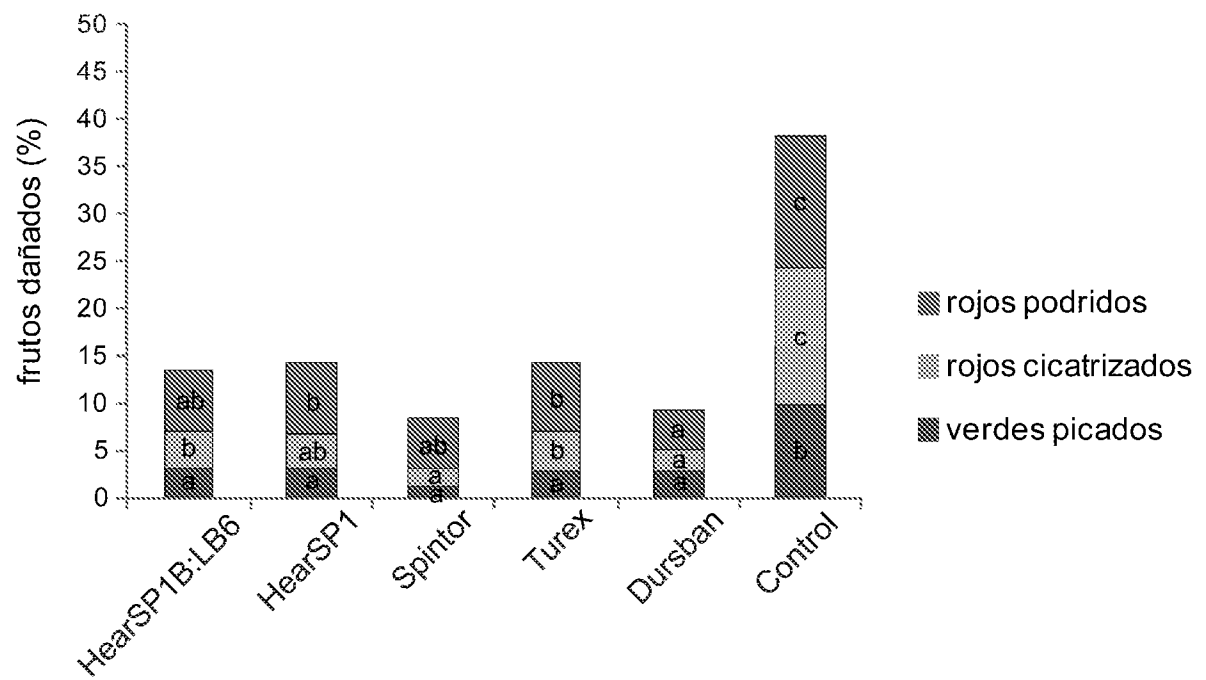
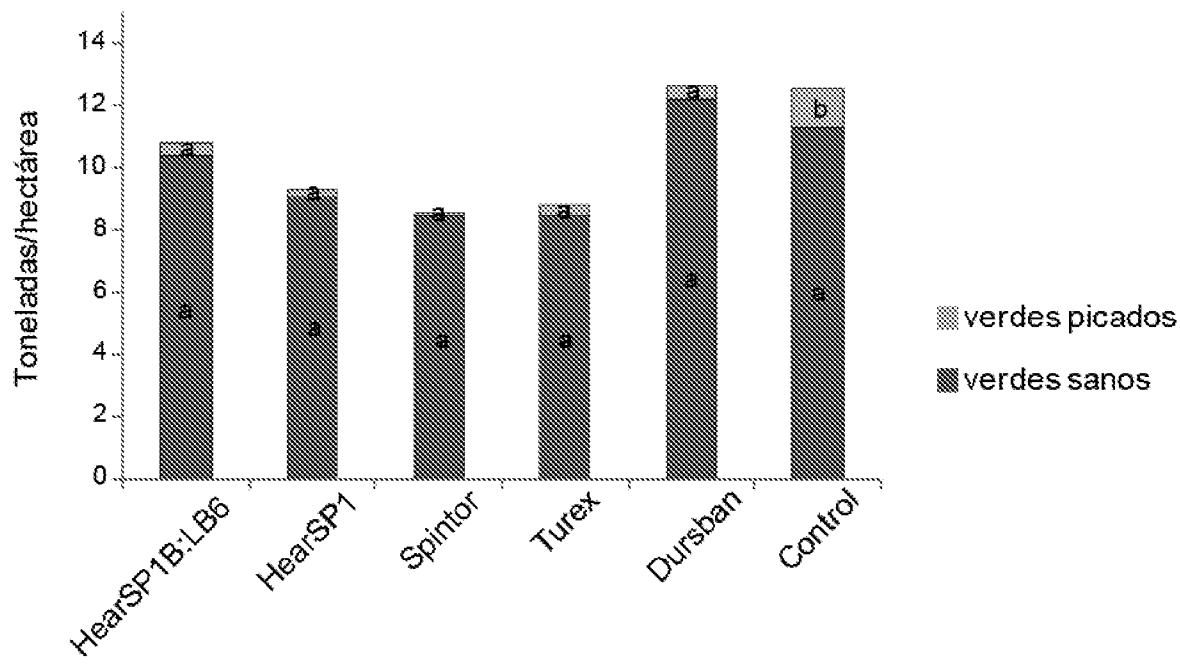


Fig. 24

A)



B)

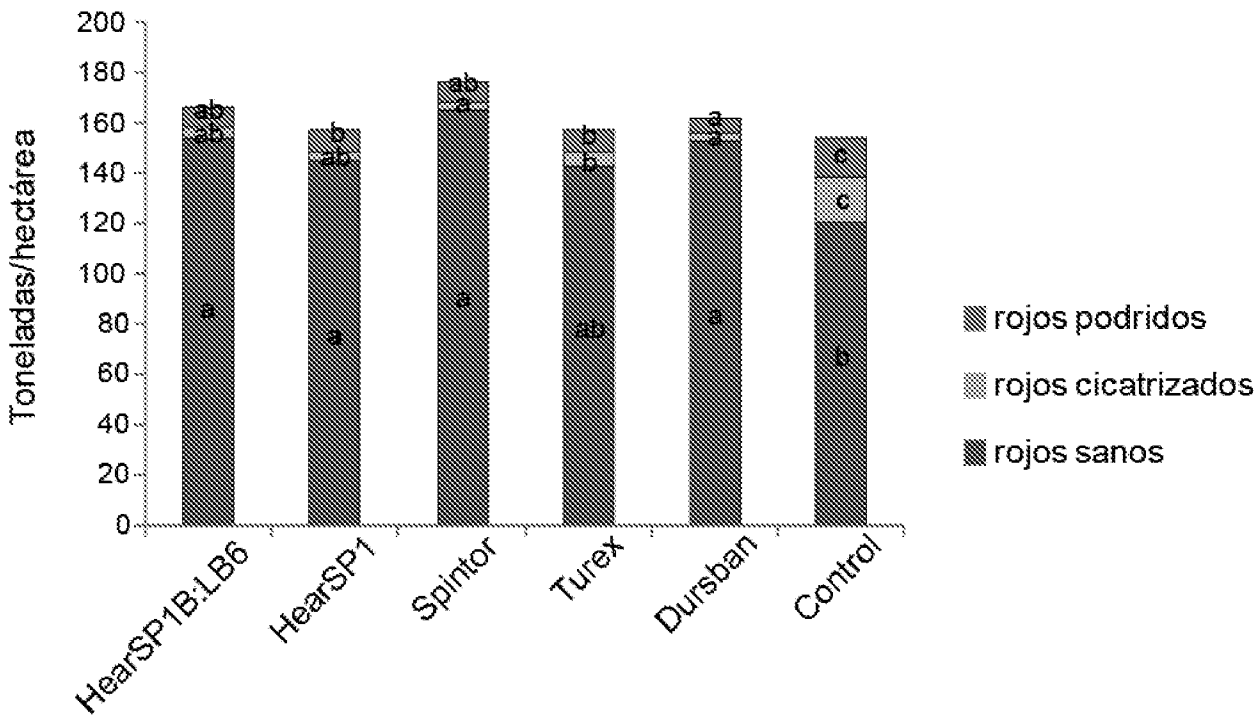


Fig. 25

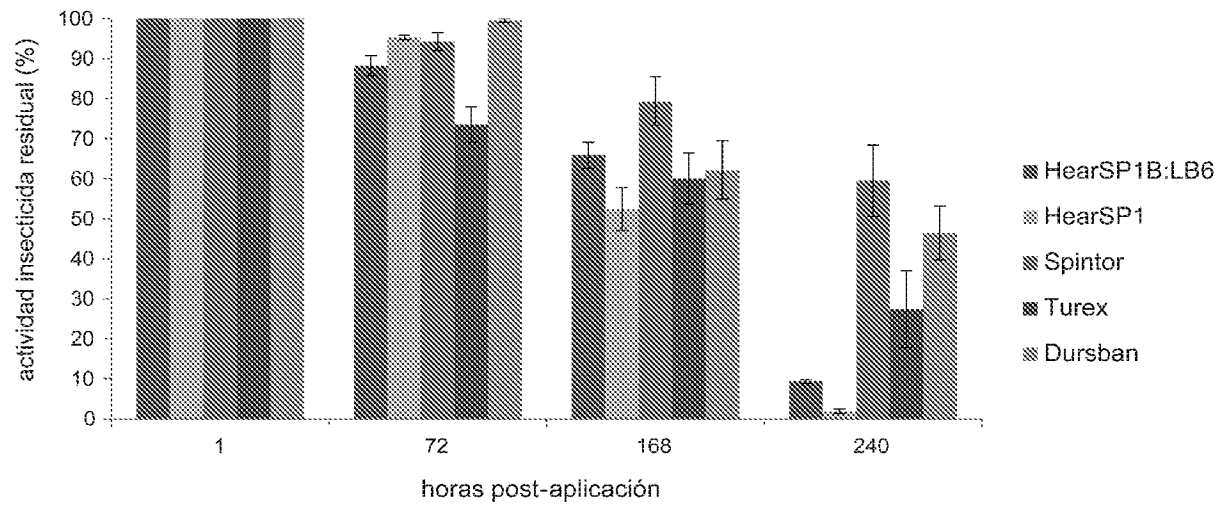
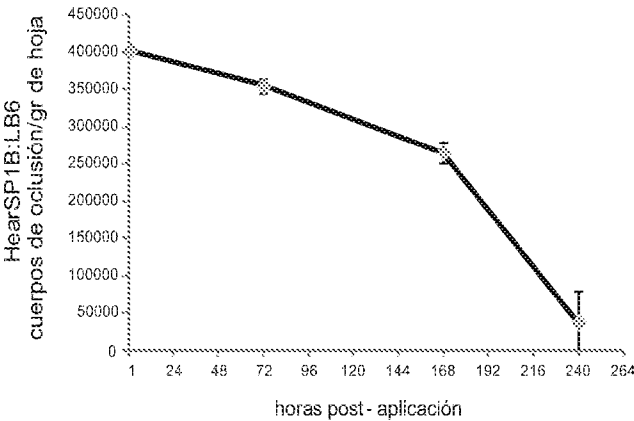
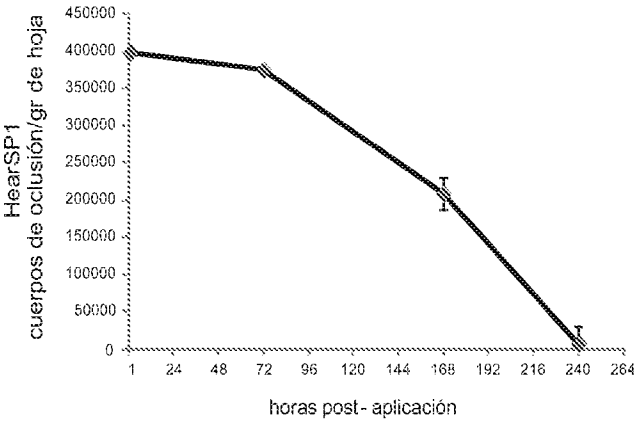


Fig. 26

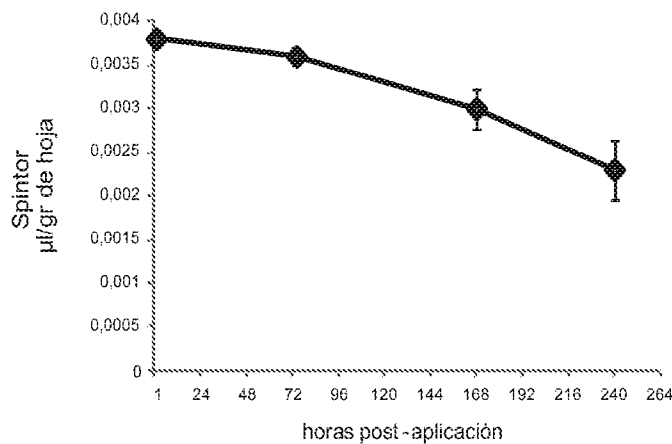
A)



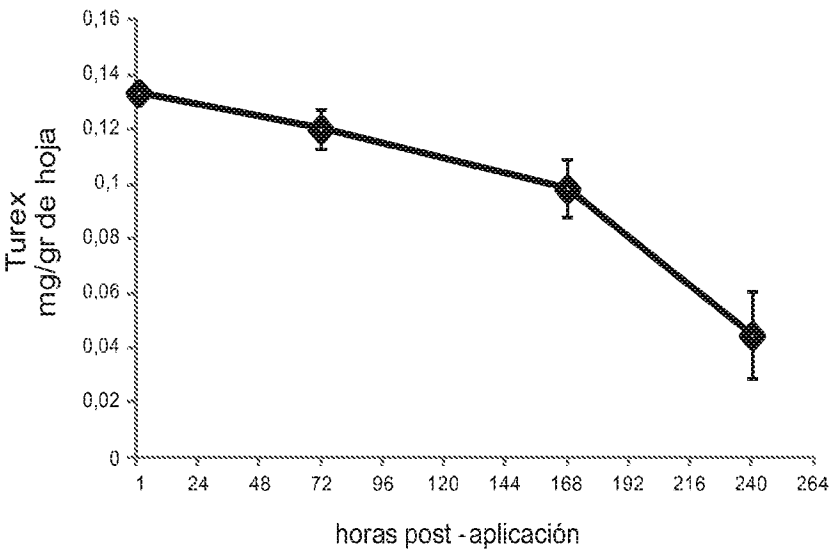
B)



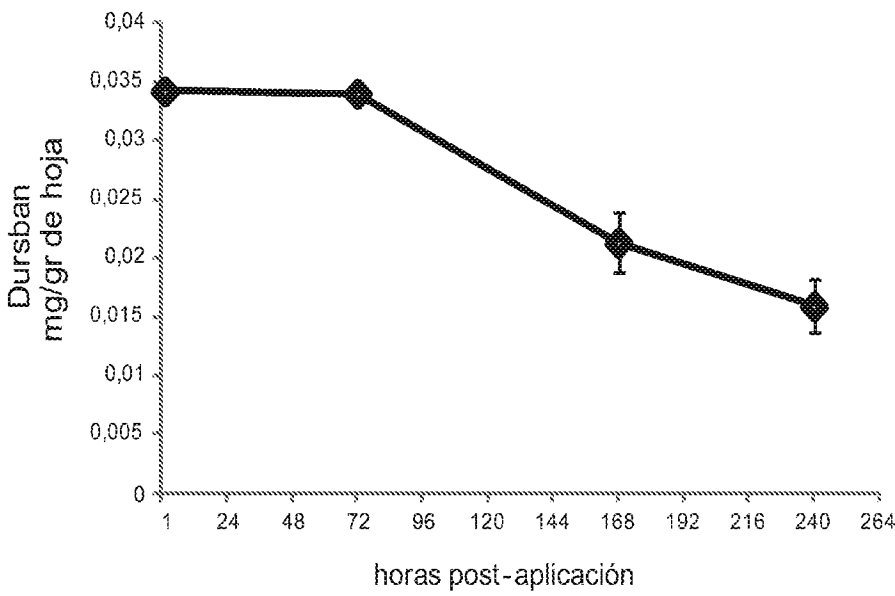
C)



D)



E)



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2015/070490

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A01N63/02 (2006.01)

C12N7/02 (2006.01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A01N, C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPIAP, EPODOC, INVENES, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE, NPL, XPESP, Bases de datos de secuencias del EBI, buscadores de internet (Google, google scholar), Chemical Abstracts, base de datos MESH del NCBI,

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Accession Number: AP010907 of DataBase ENA; 11.10.2008 [Recuperada in 23.04.2015], OGEMBO J.G. et al. <i>Helicoverpa armigera</i> NPV NNg 1 DNA, complete genome	1-39
A	EP 0908099 A1 (NESTLE SA) 14/04/1999, Ej. 4, Table 3	32-39
A	ARRIZUBIETA, M. <i>et al.</i> , "Selection of a nucleopolydedrovirus isolate from <i>Helicoverpa armigera</i> as the basis for a biological insecticide", 22/06/2006. Pest Management Science 70, pgs. 967-976. Doi: 10.1002/ps.3637 Abstract;	1-39

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.	
"E" earlier document but published on or after the international filing date	
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
21/09/2015

Date of mailing of the international search report
(02/10/2015)

Name and mailing address of the ISA/

Authorized officer
M. Serriñá Ramírez

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Facsimile No.: 91 349 53 04

Telephone No. 91 3493072

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2015/070490

C (continuation).		
DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ZHONG-JIAN GUO <i>et al.</i> Biological Comparison of Two Genotypes of <i>Helicoverpa armigera</i> Single-Nucleocapsid Nucleopolyhedrovirus. BioControl, Kluwer Academic Publishers, Do 22/06/2006 VOL: 51 No: 6 Pags: 809 - 820 ISSN 1573-8248 Doi: 10.1007/s10526-006-9008-6 . Abstract from DataBase WPI. Retrieved of EPOQUE	1-22; 31-39
A	CHRISTIAN P D <i>et al.</i> A rapid method for the identification and differentiation of <i>Helicoverpa nucleopolyhedroviruses</i> (NPV Baculoviridae) isolated from the environment..Journal of virological methods Netherlands Jul 2001 VOL: 96 No: 1 Pgs: 51 – 65, 30/06/2001, ISSN 0166-0934 (Print) Doi: pubmed:11516489 Abstract from DataBase WPI. Retrieved of EPOQUE	31
A	ROWLEY DANIEL L <i>et al.</i> Genetic variation and virulence of nucleopolyhedroviruses isolated worldwide from the heliothine pests <i>Helicoverpa armigera</i> , <i>Helicoverpa zea</i> , and <i>Heliothis virescens</i> ..Journal of invertebrate pathology United States Jun 2011, 31/05/2011, VOL: 107 No: 2 Pgs: 112 - 126 ISSN 1096-0805 (Electronic) Doi: 10.1016/j.jip.2011.05.005 . The whole document.	1-39
A	FIGUEIREDO ELISABETE <i>et al.</i> Diversity of Iberian nucleopolyhedrovirus wild-type isolates infecting <i>Helicoverpa armigera</i> (Lepidoptera: Noctuidae). Biological Control JUL 2009, 30/06/2009 VOL: 50 No: 1 Pags: 43-49 ISSN 1049-9644(print) ISSN 1090-2112(electronic) Doi: 10.1016/j.biocontrol.2009.02.005 . Abstract; pg. 48, paragraphs 3-4.	1-22, 31-39

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2015/070490

Information on patent family members

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP0908099 A1	14.04.1999	NONE	

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2015/070490

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

A01N63/02 (2006.01)

C12N7/02 (2006.01)

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A01N, C12N

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

WPIAP, EPODOC, INVENES, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE, NPL, XPESP, Bases de datos de secuencias del EBI, buscadores de internet (Google, google scholar), Chemical Abstracts, base de datos MESH del NCBI,

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
A	Nº de acceso: AP010907 de base de datos ENA; 11.10.2008 [Recuperada en 23.04.2015], OGEMBO J.G. et al. <i>Helicoverpa armigera</i> NPV NNg 1 DNA, complete genome	1-39
A	EP 0908099 A1 (NESTLE SA) 14/04/1999. Ej. 4, Tabla 3	32-39
A	ARRIZUBIETA, M. <i>et al.</i> , "Selection of a nucleopolydedrovirus isolate from <i>Helicoverpa armigera</i> as the basis for a biological insecticide", 22/06/2006. Pest Management Science 70, págs. 967-976. Doi: 10.1002/ps.3637 Resumen;	1-39

☒ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos

☒ Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.	
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.	

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.
21/09/2015

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.
02 de octubre de 2015 (02/10/2015)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional
OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Nº de fax: 91 349 53 04

Funcionario autorizado
M. Serriñá Ramírez
Nº de teléfono 91 3493072

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2015/070490

C (Continuación).		DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES
Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
A	ZHONG-JIAN GUO <i>et al.</i> Biological Comparison of Two Genotypes of <i>Helicoverpa armigera</i> Single-Nucleocapsid Nucleopolyhedrovirus. BioControl, Kluwer Academic Publishers, Do 22/06/2006 VOL: 51 No: 6 Pags: 809 - 820 ISSN 1573-8248 Doi: 10.1007/s10526-006-9008-6. Resumen de la base de datos WPI. Recuperado de EPOQUE	1-22; 31-39
A	CHRISTIAN P D <i>et al.</i> A rapid method for the identification and differentiation of <i>Helicoverpa</i> nucleopolyhedroviruses (NPV Baculoviridae) isolated from the environment..Journal of virological methods Netherlands Jul 2001 VOL: 96 No: 1 Pags: 51 – 65, 30/06/2001, ISSN 0166-0934 (Print) Doi: pubmed:11516489 Resumen de la base de datos WPI. Recuperado de EPOQUE	31
A	ROWLEY DANIEL L <i>et al.</i> Genetic variation and virulence of nucleopolyhedroviruses isolated worldwide from the heliothine pests <i>Helicoverpa armigera</i>, <i>Helicoverpa zea</i>, and <i>Heliothis virescens</i>..Journal of invertebrate pathology United States Jun 2011, 31/05/2011, VOL: 107 No: 2 Pags: 112 - 126 ISSN 1096-0805 (Electronic) Doi: 10.1016/j.jip.2011.05.005. Todo el documento.	1-39
A	FIGUEIREDO ELISABETE <i>et al.</i> Diversity of Iberian nucleopolyhedrovirus wild-type isolates infecting <i>Helicoverpa armigera</i> (Lepidoptera: Noctuidae). Biological Control JUL 2009, 30/06/2009 VOL: 50 No: 1 Pags: 43-49 ISSN 1049-9644(print) ISSN 1090-2112(electronic) Doi: 10.1016/j.biocontrol.2009.02.005. Resumen; pág. 48, párrafos 3-4.	1-22, 31-39

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

PCT/ES2015/070490

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
EP0908099 A1	14.04.1999	NINGUNO	