



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 180 381**

⑫ Número de solicitud: 200001716

⑬ Int. Cl.⁷: A01N 63/00

A01N 63/02

C12N 1/20

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **04.07.2000**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **01.02.2003**

⑭ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
01.02.2003

⑰ Solicitante/s:
**Universitat de València, Estudi General
C/ L'antigua Senda de Senent, 11
46023 Valencia, ES**

⑱ Inventor/es: **Ferré Manzanero, Juan;
Ferrandis Sebastiá, María;
Caballero Murillo, Primitivo;
Iriarte García, Javier;
Porcar Miralles, Manuel y
Bel Cortés, Yolanda**

⑲ Agente: **No consta**

⑳ Título: **Formulación a base de una nueva cepa de Bacillus thuringiensis CECT 5310 para el control de plagas de lepidópteros.**

㉑ Resumen:
Formulación a base de una nueva cepa de Bacillus thuringiensis CECT 5310 para el control de plagas de lepidópteros. La presente invención pertenece al sector de la técnica de bioinsecticidas no contaminantes. Se presenta y reivindica una formulación que comprende una nueva cepa de Bacillus thuringiensis activa contra larvas de lepidópteros, en especial contra larvas de la polilla de las crucíferas, Plutella xylostella (Linnaeus), la polilla del racimo, Lobesia botrana (Denis y Schiff), la oruga del tomate, maíz y algodón, Helicoverpa armigera (Hübner), y la rosquilla verde o gardama, Spodoptera exigua (Hübner). Por tanto la formulación basada en la nueva cepa de Bacillus thuringiensis o en cualquier mutante derivado de la misma, puede ser utilizada para controlar dichas plagas.

ES 2 180 381 A1

DESCRIPCION

Formulación a base de una nueva cepa de *Bacillus thuringiensis* CECT 5310, para el control de plagas de lepidópteros.

Objeto de la invención

Se presenta y reivindica una nueva cepa de *Bacillus thuringiensis*, designada como V-V54.36, activa contra larvas de lepidópteros, en especial contra larvas de la polilla de las crucíferas, *Plutella xylostella* (Linnaeus), la polilla del racimo, *Lobesia botrana* (Denis y Schiff), la oruga del tomate, maíz y algodón, *Helicoverpa armigera* (Hübner), y la rosquilla verde o gardama, *Spodoptera exigua* (Hübner). Por tanto, esta cepa, o mutantes generados a partir de la misma, puede ser utilizada para controlar dichas plagas. La presente invención pertenece al sector de la técnica de bioinsecticidas no contaminantes.

Estado de la técnica

Es de tiempo conocida la *capacidad de ciertas cepas de la bacteria Bacillus thuringiensis* de producir proteínas tóxicas frente a determinados grupos de insectos. Esta es una bacteria Gram-positiva que durante el proceso de esporulación sintetiza un cristal proteico con propiedades insecticidas (Höfte, H. y H.R. Whiteley, 1989, *Microbiol. Rev.* 53: 242-255; Koziel, M.G., et al., 1993, *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* 11: 171-228; Schnepf, E., et al., 1998, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 775-806). Entre las ventajas que ofrece la utilización de los productos basados en esta bacteria destacan su alta especificidad, que no contaminan el medio ambiente y que no resultan tóxicos para insectos beneficiosos, plantas, animales, ni para el hombre. Precisamente esta alta especificidad puede convertirse también en una de sus desventajas, ya que en la mayoría de los casos, los productos, basados en *B. thuringiensis* resultan tóxicos para ciertos insectos plaga, aunque no para otros, lo que puede requerir el uso combinado de distintos productos microbiológicos o incluso la utilización de insecticidas químicos por la ausencia de formulados de *B. thuringiensis* con toxicidad para ciertas plagas (por ejemplo, contra insectos chupadores).

El cristal de *B. thuringiensis* es el principal responsable de la actividad insecticida de la bacteria y está compuesto por una o varias proteínas denominadas proteínas cristalinas. Sus dimensiones, teniendo en cuenta el tamaño de la bacteria son considerables. Normalmente, su tamaño es similar al de la espora, y mide aproximadamente 1 µm de largo por 0.5 µm de ancho. La morfología del cristal puede ser de diversos tipos, predominando, entre las cepas tóxicas contra lepidópteros, la forma bipiramidal. Dicha morfología depende de los componentes proteicos del cristal y éstos, a su vez, de los genes que los codifican (genes *cry* y *cyt*), los cuales se encuentran en su mayoría localizados en plásmidos (Lereclus, D., et al., 1993, En: *Bacillus thuringiensis*, an Environmental Biopesticide: Theory and Practice. P.F. Entwistle, J.S. Cory, M.J. Bailey y S. Higgs, eds. John Wiley and Sons Ltd., Chichester, Inglaterra, pp. 37-69.). Así pues, distintas cepas de *B. thuringiensis* se diferencian en la composición proteica del cristal paraesporal y, por tanto en su espectro de toxicidad.

Los insecticidas a base de *B. thuringiensis* actúan por ingestión. Su modo de acción requiere que la larva (o, en algunos casos, el adulto) ingiera el cristal paraesporal (Schnepf, E., et al., 1998, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 775-806). Una vez en el intestino del insecto, el cristal se disuelve dejando libres las proteínas componentes, que se encuentran normalmente en forma de "protoxina" y que requieren un procesamiento proteolítico (llevado a cabo por proteasas del intestino) en el que se digiere parcialmente la proteína hasta dejarla en su forma 'activada' o de "toxina activa", forma que resulta estable frente a la acción de las proteasas. En las proteínas cristalinas de elevado peso molecular, alrededor de 130kDa, este procesamiento suele eliminar la mitad C-terminal (de la proteína) y una parte pequeña del extremo N-terminal. La toxina activada atraviesa la membrana peritrófica y se une a receptores específicos situados en la membrana epitelial del intestino medio del insecto. Esto provoca, mediante un mecanismo desconocido todavía, la formación de poros que permiten la entrada de agua e iones en la célula, causando un desequilibrio osmótico y posterior lisis celular. Estos procesos dan lugar, en pocas horas, a la parálisis del insecto, lo que provoca su muerte, bien por inanición o por la proliferación de las esporas si éstas han sido ingeridas juntamente con los cristales.

Las diversas formulaciones de *B. thuringiensis* que existen en el mercado están basadas en un número muy reducido de cepas de esta bacteria. En la inmensa mayoría de los casos cada formulado sólo posee bacterias de una única cepa y, por tanto, su espectro de acción depende de la composición de proteínas de su cristal paraesporal. Aunque la información sobre el tipo de proteínas cristalinas que produce la cepa en la que está basado el formulado no viene nunca indicado en las especificaciones del producto, sí se indica

normalmente el serovar al cual pertenece dicha cepa. La clasificación en serovares se basa en la determinación de los antígenos flagelares que posee la bacteria, habiéndose determinado al menos 82 serovares distintos (Lecadet, M.-M. et al., 1999, *J. Appl. Microbiol.* 86: 660-672). Los primeros productos de *B. thuringiensis* que se usaron ampliamente contra plagas de lepidópteros y los que se siguen utilizando en la actualidad son, en su mayoría, formulados de cepas pertenecientes al serovar *kurstaki*, los cuales poseen proteínas Cry1A y Cry2A, aunque no Cry1C ni Cry1D. más recientemente se han introducido productos basados en cepas del serovar *aizawai*, los cuales suelen poseer, además de proteínas Cry1A, las proteínas Cry1C y Cry1D. Dentro del orden Lepidoptera, es muy importante saber seleccionar el producto formulado adecuado para la plaga o plagas que se quieran combatir. Por ejemplo, las proteínas cristalinas del subgrupo Cry1A son muy tóxicas para especies del género *Heliothis*, *Plutella* y *Lobesia*, sin embargo son prácticamente inocuas para especies del género *Spodoptera*. Ocurre lo contrario con la proteína Cry1C, la cual es tóxica para *Spodoptera* spp. pero no para *Heliothis*, *Plutella* ni *Lobesia* (Caballero-Murillo, P. y Ferré-Manzanero, J., 2000, Desarrollo y Aplicaciones de *Bacillus thuringiensis* como bioinsecticida, Publ. Univ. Pública de Navarra; Zeigler, D.R. 1998, *Bacillus Genetic Stock Center Catalog of Strains*, 7a edición, Vol. 2, Ohio State University).

La presencia o ausencia de genes para las proteínas cristalinas de *B. thuringiensis* se puede determinar mediante análisis por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) utilizando cebadores específicos de cada gen (Juárez-Pérez, V.M., et al., 1997, *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 2997-3002; Alberola, T.M., et al., 1999, *J. Invertebr. Pathol.* 74, 127 -136). Aunque esta información nos puede orientar en cuanto al posible espectro de toxicidad de un formulado o cepa en cuestión, el inconveniente de este método analítico es que no nos dice nada en cuanto a si los genes se expresan o no y, aun en el caso de que se expresen, en qué proporciones relativas lo hacen (análisis porcentual). En la práctica, la manera de resolver este problema es mediante la realización de bioensayos con los diferentes insectos plaga para los que se quiere obtener información sobre la toxicidad de un determinado formulado o cepa.

Breve descripción de la invención

El objeto de la presente invención concierne a una nueva cepa de *B. thuringiensis* que posee actividad insecticida contra varias especies de lepidópteros, en especial contra larvas de la polilla de las crucíferas (*P. xylostella*), la polilla de la vid (*L. botrana*), la oruga del tomate, maíz y algodón (*H. armigera*), y la rosquilla verde o gardama (*S. exigua*). En concreto, la invención se refiere a la cepa V-V54.36 de *B. thuringiensis*, la cual tiene una efectividad inusualmente alta contra la polilla de las crucíferas y, a la vez, mantiene una efectividad muy buena contra otros lepidópteros plaga. Esta alta efectividad frente a varias especies de lepidópteros que originan plagas hace de este nuevo aislado de *B. thuringiensis* un valioso ingrediente activo para la obtención de productos formulados que permitan el control microbiano de plagas de lepidópteros. La invención también incluye las cepas mutantes que se puedan obtener a partir de la cepa V-V54.36 y a genes nuevos de dicha cepa que codifiquen proteínas tóxicas contra las plagas antes mencionadas.

Descripción de la invención

La cepa de *Bacillus thuringiensis* V-V54.36 que se presenta en esta invención posee las siguientes características:

El crecimiento de la cepa en medios de cultivo suplementados con una concentración apropiada de sales minerales produce colonias de morfología externa similar a la que presentan otras cepas de *B. thuringiensis*. Las colonias son grandes, mates, de tono céreo y con bordes irregulares. La fermentación de la cepa a gran escala se realiza también en medios de cultivo ricos en sales para favorecer el proceso de esporulación.

La cepa pertenece al serovar *kurstaki*.

Los cristales paraesporales producidos por esta cepa son de forma bipiramidal, forma típica de los cristales producidos por un gran número de otras cepas pertenecientes al serovar *kurstaki*.

La cepa no produce β -exotoxina del tipo I, análogo de la adenosina-monofosfato, que resulta tóxico para animales y el hombre y se produce (y libera al medio) durante la fermentación de ciertas cepas de *B. thuringiensis*.

Las proteínas cristalinas que produce esta cepa durante la fase de esporulación poseen un peso molecular de aproximadamente 130 y 65 kDa y tienen actividad tóxica frente a larvas de *Helicoverpa armigera*,

Lobesia botrana, *Plutella xylostella* y *Spodoptera exigua*.

Posee, al menos, los genes de las proteínas cristalinas Cry1Ab, Cry1Ac y Cry2. Esta cepa no posee, sin embargo, los genes de las proteínas Cry1Aa, Cry1Ad, Cry1B, Cry1C, Cry1D, Cry1E, Cry1F ni Cry1G.

La cepa V-V54.36, objeto de la presente invención, ha sido depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (Departamento de Microbiología y Ecología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universitat de Valencia, 46100 -Burjassot, Valencia, España) autoridad internacional de depósito de microorganismos, con el número de acceso 5310 y fecha 30 de Marzo de 2000.

La cepa V-V54.36 puede ser cultivada utilizando medios y técnicas estándar. Una vez completado el ciclo de fermentación, los cristales para-esporales y esporas pueden recogerse mediante centrifugación o cualquier otro medio bien conocido en la técnica. El sedimento puede formularse en polvo mojado, spray, líquido concentrado, gránulos, u otras formulaciones mediante la adición de surfactantes, dispersantes, sustancias inertes y otros componentes que faciliten su manejo y aplicación. También puede aplicarse en gránulos con atrayente para las plagas a controlar. La mezcla de cristales y esporas puede ser sometida a tratamientos químicos y/o físicos para prolongar la actividad insecticida del formulado.

Los genes contenidos en la cepa V-V54.36 pueden ser introducidos en microorganismos o plantas, confiriéndoles propiedades insecticidas. Hay una gran variedad de maneras para tal introducción, bien conocidas en la técnica. Dichos organismos pueden usarse para el control de las plagas susodichas.

Manera de realizar la invención

A continuación se dan ejemplos que ilustran los procedimientos para poner en práctica, de la mejor manera posible, la invención. Estos ejemplos no deben de ser considerados como exclusivos y, por tanto, no limitan la invención en forma alguna.

Ejemplo 1

Medio de cultivo para fermentar las bacterias de la cepa V -V54.36 e inducir su esporulación (Stewart, G.S.A.B., et al., 1981, Biochem. J. 198: 101-106).

Para preparar un litro del medio de cultivo, se añaden los siguientes componentes en las cantidades indicadas entre paréntesis y finalmente se enrasa a un litro con agua destilada.

Tampón del medio 2x (500 ml)

Potasio fosfato, pH 7 0.4 M

Fuente de carbono (10 ml)

L-glutamina 0.2 g

Caseína hidrolizada (ácida) 10 g

Bacto casitona 10 g

Extracto de levadura bacteriológica 4 g

Glicerina 6 ml

Agua destilada hasta 100 ml

Solución acuosa de sales (1 ml)

ZnCl₂ 0.05 M

MgCl₂·6H₂O 0.5 M

MnCl₂·6H₂O 0.01 M

CaCl₂·2H₂O 0.2 M

FeCl₃·6H₂O 0.05 M

HCl fumante 1 %

La fuente de carbono, disuelta en el tampón del medio, se esteriliza en autoclave y se conserva en el frigorífico. La solución de sales se esteriliza por filtración y se conserva en el frigorífico; se añade al medio de cultivo justo antes de su utilización.

Previamente a la inoculación con medio conteniendo esporas y cristales, éste se habrá calentado a 70°C

durante 30 min para eliminar las células vegetativas y sincronizar el cultivo. Después de la inoculación (con aproximadamente un 1 % de inóculo) el cultivo se incuba de 28 a 30°C con agitación y abundante aporte de oxígeno durante un periodo que oscila entre 40 y 72 h. El momento final se determina por inspección al microscopio óptico de contraste de fases. Se considera terminada la fermentación cuando
5 alrededor del 90 % de las células esporuladas se han lisado.

Las esporas y cristales se pueden concentrar por centrifugación, entre otras técnicas. El sedimento se puede lavar con un 10 % del volumen inicial de NaCl 1M / EDTA 10 mM, centrifugar otra vez y suspender en un volumen mínimo de KCl 10 mM. Este concentrado se puede guardar a -20°C para aumentar su
10 estabilidad hasta su formulación.

Ejemplo 2

*Ensayos de toxicidad, en medio artificial, con la mezcla de cristales y esporas de la cepa V-V54.36 y
15 larvas de tercer estadio de P. xylostella*

La dieta artificial que consiste en:

20	Agua	1000 ml
	Agar	20 g
	Germen de trigo	100 g
25	Caseína	45 g
	Sacarosa	40 g
	Levadura de cerveza	30 g
	Colesterol	1 g
	Nipagin	1.6 g
30	Aureomicina-Tetraciclina	0.25 g
	Acido sórbico-potasio sorbato	1.6 g
	Rifampicina	0.25 g
	Acido ascórbico	3 g
35	Aceite de maíz	4 ml
	<i>Mezcla de sales Welson (20 g)</i>	
	CaCO ₃	210 g
40	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.39 g
	FePO ₄	14.7 g
	MnSO ₄ ·H ₂ O	0.2 g
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	90 g
	AlK(SO ₄) ₂ ·12H ₂ O	0.09 g
45	KCl	120 g
	KH ₂ PO ₄	310 g
	KI	0.05 g
	NaCl	105 g
50	NaF	0.57 g
	Ca ₃ (PO ₄) ₂	149 g
	<i>Mezcla de vitaminas (0.03 g)</i>	
	Acido nicotínico	1 g
55	Riboflavina	0.5 g
	Tiamina	0.23 g
	Piridoxina	0.23 g
	Calcio pantotenato	1 g
60	Ácido fólico	20 mg
	Biotina	20 mg
	Vitamina B—12	2 mg

ES 2 180 381 A1

Se lleva a ebullición el agar en agua. Una vez la mezcla se ha enfriado a 55 ó 60°C, se añade el resto de los componentes excepto el aceite de maíz. Se mezcla con un agitador de aspas hasta que el medio quede homogéneo. Finalmente se añade el aceite de maíz y se mezcla bien.

5 El medio caliente se vierte en pocillos de 2 cm² de diámetro (placas Costar, de 24 pocillos) y se deja solidificar al aire. Distintas concentraciones de cristales y esporas (en 50 microlitros de agua destilada) se añaden a los pocillos y se deja secar bien. Se transfiere una larva a cada pocillo, hasta un total de doce por concentración. Las placas con los insectos se colocan a 25°C, HR 70 % y con un fotoperiodo de 16:8 (L:O). La mortalidad se registra a los 2 días (ver ejemplo 6).

10 Ejemplo 3

Ensayos de toxicidad, en medio artificial, con la mezcla de cristales y esporas de la cepa V-V54.36 y larvas neonatas de S. exigua

15 La dieta artificial que consiste en:

20	Agua	1000 ml
	Agar	18 g
	Harina de maíz	96 g
	Germen de trigo	64 g
	Caseína	10 g
25	Levadura de panadería	34 g
	Nipagin	1 g
	Hidrocloruro de tetraciclina	0.5 g
	Acido sórbico	2.5 g
30	Acido ascórbico	9 g
	Aceite de maíz	4 ml
	<i>Mezcla de sales Welson (5 g)</i>	
	CaCO ₃	210 g
35	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.39 g
	FePO ₄	14.7 g
	MnSO ₄ ·H ₂ O	0.2 g
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	90 g
40	AlK(SO ₄) ₂ ·12H ₂ O	0.09 g
	KCl	120 g
	KH ₂ PO ₄	310 g
	KI	0.05 g
	NaCl	105 g
45	NaF	0.57 g
	Ca ₃ (PO ₄) ₂	149 g
	<i>Mezcla de vitaminas (0.12 g)</i>	
50	Acido nicotínico	1 g
	Riboflavina	0.5 g
	Tiamina	0.23 g
	Piridoxina	0.23 g
	Calcio pantotenato	1 g
55	Acido fólico	20 mg
	Biotina	20 mg

60 Se lleva a ebullición el agar en agua. Una vez la mezcla se ha enfriado a 55 ó 60°C, se añade el resto de los componentes excepto la harina de maíz. Esta se añade lentamente mientras se agita con un agitador de aspas.

ES 2 180 381 A1

El medio caliente se vierte en pocillos de 2 cm² de diámetro (placas Costar, de 24 pocillos) y se deja solidificar al aire. Distintas concentraciones de cristales y esporas (en 50 microlitros de agua destilada) se añaden a los pocillos y se deja secar bien. Se transfiere una larva a cada pocillo, hasta un total de doce por concentración. Las placas con los insectos se colocan a 25°C, HR 70 % y con un fotoperiodo de 16:8 (L:O). La mortalidad se registra a los 4 días (ver ejemplo 6).

Ejemplo 4

Ensayos de toxicidad, en medio artificial, con la mezcla de cristales y esporas de la cepa V-V54.36 y larvas de segundo estadio de L. botrana

La dieta artificial que consiste en:

Agua	390 ml
Agar	12 g
Mosto de uva	120 ml
Hoja de vid (peso fresco)	60 g
Germen de trigo	21 g
Sémola de maíz	24 g
Levadura de panadería	22.5 g
Acido ascórbico	3 g
Acido benzoico	1.05 g
Nipagin	1.05 g
Aureomicina-Tetraciclina	0.15 g
Aceite de maíz	1.2 ml

Las hojas de vid pueden ser frescas o congeladas, pero antes de ser usadas han de secarse a 60°C y luego se trituran en un molinillo de café. Para preparar el medio, se lleva a ebullición el agar en agua. Una vez la mezcla se ha enfriado a 55 ó 60°C, se añade el resto de los componentes y se mezcla con un agitador de aspas hasta que el medio quede homogéneo.

El medio caliente se vierte en pocillos de 2 cm² de diámetro (placas Costar, de 24 pocillos) y se deja solidificar al aire. Distintas concentraciones de cristales y esporas (en 50 microlitros de agua destilada) se añaden a los pocillos y se deja secar bien. Se transfiere una larva a cada pocillo, hasta un total de doce por concentración. Las placas con los insectos se colocan a 25°C, HR 70 % y con un fotoperiodo de 16:8 (L:O). La mortalidad se registra a los 4 días (ver ejemplo 6).

Ejemplo 5

Ensayos de toxicidad, en hojas de lechuga, con la mezcla de cristales y esporas de la cepa V-V54.36 y larvas de segundo estadio de H. armigera

Discos de lechuga de 5 mm de diámetro se sumergen en soluciones acuosas con un agente humectante y con distintas concentraciones de cristales y esporas, y se escurren al aire. Los discos se colocan en pocillos individuales de 4 cm² (placas Sterilin, de 25 pocillos) que contienen una pequeña capa de agar al 1.5 ó 3 % en agua, con objeto de prevenir la desecación del disco de lechuga. Se transfiere una larva a cada pocillo, hasta un total de 20 a 25 por concentración. Las placas con los insectos se colocan a 25°C, HR 70 % y con un fotoperiodo de 16:8 (L:O). La mortalidad se registra a los 4 días (ver ejemplo 6).

Ejemplo 6

Potencia de la suspensión de cristales y esporas de la cepa V-V54.36 frente a diferentes lepidópteros plaga

Suspensiones de esporas y cristales obtenidas a partir de dicha cepa se sometieron a diluciones seriadas y a su posterior bioensayo con diferentes insectos plaga. Como producto de referencia se utilizó una mezcla de esporas y cristales de la cepa HD-1 de *B. thuringiensis*, ingrediente activo de varios productos comerciales, entre ellos el Dipel® 2x (Abbot), y del estándar internacional de referencia *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1-1980. Los bioensayos se realizaron según se indica en los ejemplos anteriores. Se utilizó el programa estadístico POLO-PC (Russell, R.M., et al., 1977, *Bull. Entomol. Soc. Amer.* 23:

209-213) para obtener los valores de LC₅₀ (concentración de cristales y esporas que produce la muerte al 50 % de los insectos expuestos durante el tiempo que dura el bioensayo) Las unidades están dadas en UA (unidades de absorbancia a la longitud de onda de 600 nm), que es una medida proporcional a la concentración de cristales y esporas en suspensión.

Insecto plaga	LC50	
	V-V54.36	HD-1
<i>Plutella xylostella</i>	0.04	0.4
<i>Lobesia botrana</i>	0.03	0.03
<i>Helicoverpa armigera</i>	0.06	0.2
<i>Spodoptera exigua</i>	0.3	0.3

Los resultados indican que la cepa V54.36 es, respecto a la HD-1, 10 veces más tóxica para *P. xylostella*, unas 3 veces más tóxica para *H. armigera*, e igual de tóxica para *L. botrana* y *S. exigua*.

Ejemplo 7

Determinación de los genes *cry* en la cepa V-V54.36

A continuación se describen los cebadores utilizados para la caracterización de genes *cry* mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), por la que se amplifican fragmentos concretos de DNA sólo en el caso de que los cebadores encuentren sus secuencias complementarias en el DNA que se analiza.

Cebador	Gen que reconoce	Tamaño de la banda amplificada ^a	Referencia
I(-)	Todos los genes <i>cry</i> 1	-	1
IAa	<i>cry</i> 1Aa	1286	1
IAb	<i>cry</i> 1Ab	1371	1
IAc	<i>cry</i> 1Ac	844	1
IAd	<i>cry</i> 1Ad	1212	1
IAe	<i>cry</i> 1Ae	1203	2
IB	<i>cry</i> 1B	1323	1
IC	<i>cry</i> 1C	1176	1
ID	<i>cry</i> 1D	1138	1
IE	<i>cry</i> 1E	1137	1
IF	<i>cry</i> 1F	967	1
IG	<i>cry</i> 1G	1128	1
II(+)	Todos los genes <i>cry</i> 2	1600	2
II(-)	Todos los genes <i>cry</i> 2	-	2

a) Se refiere a la banda amplificada al utilizar un determinado cebador en combinación con el cebador general de familia I(-), excepto en el caso de la pareja de cebadores II(+) y II(-), en cuyo caso se refiere a la banda amplificada al usarse dicho par conjuntamente. El tamaño viene dado en pb (pares de bases).

Referencia 1: Juárez-Pérez, V.M., et al. (1997, Appl. Environ. Microbiol. 63: 2997-3002).

Referencia 2: Ferrandis, M.D., et al. (1999, System. Appl. Microbiol. 22, 179-185).

ES 2 180 381 A1

El análisis del contenido de genes cry en la cepa V -V54.36 se realizó según se describe en Ferrandis, M.D., et al. (1999, *System. Appl. Microbiol.* 22, 179-185).

Ejemplo 8

Formulación, en forma de polvo mojabable, a base de cristales y esporas de la cepa V-V54.36

A continuación se describe un modelo de composición centesimal de un formulado típico a base de *Bacillus thuringiensis*. La cantidad a usar del ingrediente activo varía en función de la potencia del mismo y de la potencia final que se quiere conseguir (32×10^6 UI/g en nuestro ejemplo).

Producto	Porcentaje (p/p)
Polvo primario (ingrediente activo)	c.s. para 32×10^6 UI/g
TiO ₂	3
Dispersante mezcla	3
Calcio lignosulfato	6
Sílice coloidal	6
CaCl ₂	12
Azúcar (sacarosa)	6
Caolín	hasta 100

El ingrediente activo consiste en esporas y cristales de la cepa V-V54.36, en forma de polvo seco. Igualmente, el ingrediente activo podría consistir en de esporas y cristales procedentes de una mezcla de la cepa V-V54.36 y otra cepa distinta de *B. thuringiensis*.

REIVINDICACIONES

1. Formulación insecticida, particularmente contra lepidópteros, que comprende la cepa de *Bacillus thuringiensis* CECT 5310 o cualquier mutante derivado de la misma con función insecticida equivalente.

5

2. Método de control de plagas de insectos, particularmente lepidópteros, que consiste en la puesta en contacto de dichos insectos o del ambiente donde se encuentran, con una cantidad efectiva de la formulación de la reivindicación 1.

10

3. Método según la reivindicación 2, **caracterizado** porque la formulación comprende cristales y esporas de *Bacillus thuringiensis* CECT 5310 o de cualquier mutante derivado de la misma.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA

- ⑪ ES 2 180 381
⑫ N.º solicitud: 200001716
⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 04.07.2000
⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑮ Int. Cl.⁷: A01N 63/00, 63/02, C12N 1/20

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	US 5747025 A (MEADOWS et al.) 05.05.1998, todo el documento.	1-3
Y	IRIARTE J. et al. Environmental distribution and diversity of <i>Bacillus thuringiensis</i> in Spain. System. Appl. Microbiol., 1998, Vol. 21, páginas 97-106.	1-3
Y	FRETAY G. du. Collapse. Insecticide biologique contre les tordeuses de la grappe. Phytoma Def. Veg., 1993, Vol. 450, páginas 45-46.	1-3
Y	MEENAKSHISUNDARAN K.S. y GUJAR, G.T. Proteolysis of <i>Bacillus thuringiensis</i> subspecies <i>Kurstaki</i> endotoxin with midgut proteases of some lepidopterous species. Indian Journal of Experimental Biology, 1998, Vol. 36, páginas 593-598.	1-3
Y	TAUZIDE, N. y LAVAUD, P. Delfin Insecticide biologique pour la vigne et herbiciculture. Phytoma Def. Veg., 1994, Vol. 46, páginas 49-50.	1-3
Y	ABDULLAH, Md et al. Monitoring insecticide resistance development in beet army worm, <i>Spodoptera exigua</i> (Hüner) (Lepidoptera: Noctuidae). Kasetort J. (Nat. Sci), 2000, Vol. 34, páginas 450-457.	1-3
Y	CN 1118375 A (HUAZHONG AGRICULTURAL UNIV) 13.03.1996 (resumen) [en línea] [recuperado el 07.01.2003] Recuperado de EPO WPI Database	1-3

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones n.º:

Fecha de realización del informe
07.01.2003

Examinador
A. Polo Díez

Página
1/2



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA

- ⑪ ES 2 180 381
⑫ N.º solicitud: 200001716
⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 04.07.2000
⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑮ Int. Cl.⁷: A01N 63/00, 63/02, C12N 1/20

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	Directory of microbial control products and services. Ed: SHAH, P. y GOETTER, M. Microbial Control Division Society for Invertebrate Pathology. 1999. [recuperado el 07.01.2003]. Recuperado de Internet: <URL:http://www.sipweb.org/directory.mcp/directory.htm> Páginas 1-6.	1-3

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones n.º:

Fecha de realización del informe
07.01.2003

Examinador
A. Polo Díez

Página
2/2