



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 195 738**

⑫ Número de solicitud: 200101859

⑬ Int. Cl.7: **A01N 63/00**
A01N 63/02
C12N 1/20
// (C12N 1/20
C12R 1:07)

⑭

PATENTE DE INVENCION

B1

⑮ Fecha de presentación: **31.07.2001**

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **01.12.2003**

Fecha de la concesión: **23.11.2004**

Fecha de modificación de las reivindicaciones:
21.10.2004

⑰ Fecha de anuncio de la concesión: **01.01.2005**

⑱ Fecha de publicación del folleto de la patente:
01.01.2005

⑲ Titular/es: **Universitat de València-Estudi General
c/ L'Antiga Senent, 11
46023 Valencia, ES**

⑳ Inventor/es: **Caballero Murillo, Primitivo;
Martínez Rico, Clara;
Ferré Manzanero, Juan;
Porcar Miralles, Manuel;
Sara Hernández, Carmen y
González Cabrera, Joel**

㉑ Agente: **No consta**

㉒ Título: **Nueva cepa de *Bacillus thuringiensis* para el control de orugas de lepidópteros y en especial de la
gardama, *Spodoptera exigua*.**

㉓ Resumen:

Nueva cepa de *Bacillus thuringiensis* para el control de
orugas de lepidópteros y en especial de la gardama, *Spo-*
doptera exigua.

Nueva cepa de *Bacillus thuringiensis* para el control de
orugas de lepidópteros y en especial de la gardama, *Spo-*
doptera exigua. El objeto de la presente invención se re-
fiere a la cepa NA118, una nueva cepa de *B. thuringiensis*,
con demostrada actividad insecticida contra larvas del or-
den lepidóptera. En concreto, la cepa NA118 posee una
elevada toxicidad contra larvas de la rosquilla verde o gar-
dama (*S. exigua*). Así pues, NA118 constituye un valioso
ingrediente activo para la obtención de bioinsecticidas de-
bido a la gran efectividad que presenta esta nueva cepa
de *B. thuringiensis* frente a larvas de estos lepidópteros
plaga. La invención también incluye a las cepas mutantes
que se puedan obtener a partir de la cepa NA118 y a ge-
nes nuevos de esta cepa que codifiquen para proteínas
tóxicas contra las especies de insectos mencionadas.

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Nueva cepa de *Bacillus thuringiensis* para el control de orugas de lepidópteros y en especial de la gardama, *Spodoptera exigua*.

Objeto de la invención

La presente invención pertenece al sector de la técnica de bioinsecticidas no contaminantes. Se presenta y reivindica una nueva cepa de *Bacillus thuringiensis*, denominada NA118, con demostrada actividad insecticida para larvas de lepidópteros, y en particular contra larvas de la gardama, *Spodoptera exigua* (Hübner), la polilla de las crucíferas, *Plutella xylostella* (L.) y la polilla del racimo de la vid *Lobesia botrana* (Denis y Schiff). La presente invención, también incluye el uso de los mutantes derivados de NA118. Por tanto, esta cepa o sus mutantes pueden ser utilizados para controlar dichas plagas.

Estado de la técnica

Bacillus thuringiensis es una bacteria aerobia y Gram + que forma un tipo distintivo de célula en reposo denominada endospora. La principal característica que la diferencia de otras bacterias próximas es su capacidad de sintetizar grandes cantidades de ciertas proteínas que, durante la esporulación, se agregan para formar uno o más cristales en el citoplasma de la célula esporulada. Esta bacteria fue aislada originariamente de larvas muertas de *Bombyx mori* y *Ephesia kuehniella* por lo que, en principio, se la consideró como un patógeno de insectos. Su función ecológica, por ahora, no está clara y se define como una bacteria patógena oportunista que puede ser aislada de hábitats tan distintos como el suelo, granos de almacén, ceno de charcas, cadáveres de insectos, superficie de las plantas, etc. (Damgaard, 2001, En: Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application, pp. 23-40. J.F. Charles, A. Delécluses y C. Nielsen-LeRoux (eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands). Actualmente se conocen miles de aislados de esta bacteria que están clasificados, en función de su antígeno flagelar, en 82 *serovares* distintos (Lecadet et al., 1999, J. Appl. Microbiol. 86: 660-672) sin que exista una correlación entre serovar y toxicidad para insectos.

Las proteínas del cristal (proteínas Cry y Cyt, también llamadas δ -endotoxinas) de algunos de los aislados de *B. thuringiensis* son tóxicas para los insectos que las ingieren y, en la actualidad, constituyen el ingrediente activo más utilizado para el desarrollo de bioinsecticidas (Höfte y Whiteley, 1989, Microbiol. Rev. 53: 242-255; Schnepf et al., 1998, Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62: 775-806). Tanto las proteínas Cry como Cyt tienen su espectro de toxicidad restringido a invertebrados, particularmente insectos, y, en general, sólo suelen ser tóxicas para unas cuantas especies filogenéticamente próximas. Esta alta especificidad es la que hace que *B. thuringiensis* sea considerado como un agente de control seguro para ser utilizado como bioinsecticida ya que no crea residuos en el medio ambiente, es compatible con otros agentes de control (parasitoides, depredadores, insecticidas químicos, etc), no es fitotóxico y no representa peligrosidad para el hombre u otros animales superiores. Ciertas cepas de *B. thuringiensis*, además de estas proteínas insecticidas, también excretan durante su crecimiento vegetativo una toxina termoestable que se denomina β -exotoxina. Esta molécula es un análogo de la adenosina-monofosfato, que inhibe la ARN polimerasa dependiente del ADN, por lo que tiene un amplio espectro de toxicidad contra vertebrados incluido el hombre (Sebesta y Horská, 1970, Biochem. Biophys. Acta 209: 357-376; Sebesta y Sternbach, 1970, FEBS Lett. 8: 223-235). La producción de β -exotoxina es una característica específica de cada cepa de *B. thuringiensis* que impide su desarrollo comercial como bioinsecticida salvo algunas excepciones en Finlandia y el este de Europa (Smits, 1997, BCPC Symposium Proceedings N° 68: 21-28).

Las proteínas Cry o Cyt son el producto de los denominados genes *cry* o *cyt*, respectivamente. Hasta ahora, se han clonado 89 de estos genes a partir de *B. thuringiensis*, que codifican para diferentes proteínas insecticidas, y de los que se puede encontrar una lista completa en "http://www.biols.susx.ac.uk/home/Neil-Crickmore/Bt/" (Maagd et al., 2001, Trends in Genetics 17: 193-199). Los genes *cry* o *cyt*, en general, se encuentran localizados en los plásmidos nativos de elevado peso molecular y, con menor frecuencia, insertados en el propio cromosoma bacteriano (Lereclus et al., 1993, En: Bacillus thuringiensis, an Environmental Biopesticide: Theory and Practice, pp. 37-69. P.F. Entwistle, J.S. Cory, M.J. Bailey y S. Higgs (eds.), John Wiley and Sons Ltd., Chichester, UK.). La mayoría de las cepas de *B. thuringiensis* contienen varios genes *cry* y el mismo gen se puede encontrar en diferentes cepas de *B. thuringiensis*. Esta movilidad de genes entre cepas no es extraña dada la facilidad con que los plásmidos pueden ser transferidos entre dos cepas distintas que crecen mezcladas en un mismo cultivo y porque algunos genes *cry* están asociados a elementos transponibles (Rosso et al., 2001, En: Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application, pp.143-166. J.F. Charles, A. Delécluses y C. Nielsen-LeRoux (eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands). Los genes *cry* presentes en una cepa concreta de *B. thuringiensis* se pueden identificar mediante la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa o PCR utilizando cebadores específicos de cada gen (Carozzi et al., 1991, Appl. Environ. Microbiol. 57:3057-3061; Juárez-Pérez et al., 1997, Appl. Environ. Microbiol. 63: 2997-3002; Porcar et al., 2000, Entomol. Exp. Appl. 97: 3397-346). Esta técnica no permite, en cambio, determinar qué genes se expresan o, en su caso, cual es el nivel de expresión de cada gen en una cepa determinada.

El cristal de la mayoría de las cepas de *B. thuringiensis* contiene entre tres y cinco δ -endotoxinas, cada una de las cuales tiene su propia especificidad insecticida. Estos componentes del cristal se pueden determinar separando las proteínas, por su peso molecular, mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida en (Iriarte et al., 1998, System. Appl. Microbiol. 21: 97-106. La toxicidad y efectividad insecticida de una cepa viene determinada tanto por la combinación de δ -endotoxinas como por su proporción relativa en el cristal ya que, como es sabido, entre las proteínas insecticidas

se pueden producir efectos sinérgicos, antagonistas o no producirse efecto alguno (Wu y Chang, 1985, FEBS Lett. 190: 232-236.). Otros factores que determinan el efecto patogénico de *B. thuringiensis* sobre un insecto son la solubilidad del cristal y la posterior digestión proteolítica de las δ -endotoxinas, los cuales dependen fundamentalmente del insecto. *B. thuringiensis* sólo produce su efecto tóxico contra insectos cuando es ingerido por éstos (Schnepf et al., 1998, Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62: 775-806). Para que dicho efecto tenga lugar es necesario que se produzca la disolución de las δ -endotoxinas del cristal en el medio alcalino (pH = 9,5-10) del mesenterón. Las proteínas disueltas son digeridas por proteasas, presentes en el tubo digestivo o asociadas a la superficie de la espora, que eliminan un gran fragmento estructural en su extremo C-terminal y un pequeño fragmento de su extremo N-terminal, dando lugar a la toxina activa (Lüthy y Wolfersberger., 2001, En: Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application, pp.167-180. J.F. Charles, A. Delécluse y C. Nielsen-LeRoux (eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands). Esta toxina se une a receptores específicos, presentes en la membrana de las células epiteliales del mesenterón, haciendo posible que las α -hélices del dominio tóxico se inserten en la membrana de las células susceptibles formando un poro inespecífico que permite el flujo de iones y agua. Como consecuencia de ello las células afectadas se hinchan y se lisan, permitiendo que el contenido del tubo digestivo invada la cavidad hemocélica. En el insecto se produce una parálisis del tubo digestivo que cesa de alimentarse y las esporas, si llegan a la hemolinfa, germinan produciendo una septicemia.

Hasta hace pocos años, casi todos los bioinsecticidas basados en *B. Thuringiensis*, que se ha utilizado por su efectividad contra plagas de lepidópteros, han venido utilizando como principio activo la mezcla de esporas y cristales de la cepa HD1 del serovar *kurstaki*. Esta cepa, que sintetiza una mezcla de proteicas Cry1A y Cry2A, tiene una elevada actividad insecticida contra un buen número de plagas importantes, entre las que cabe incluir *Helicoverpa armigera*, *Plutella xylostella* y *Lobesia botrana*, pero no controla eficazmente otras plagas importantes como, por ejemplo, algunas especies del género *Spodoptera*. Para estas especies, que son poco susceptibles a la mayoría de la toxinas de *B. thuringiensis*, en los últimos años se han seleccionado y comercializado algunas cepas del serovar *aizawai* que, además de las proteínas Cry1A, también producen las proteínas Cry1C y Cry1D (Porcar et al., 2000, Entomol. Exp. Appl. 97: 3397-346). Los productos comerciales más efectivos para el control de especies del género *Spodoptera* se basan en cepas del serovar *aizawai*. Sin embargo, estos productos no resultan del todo adecuados para el control de *Heliothis*, *Plutella* ni *Lobesia* (Caballero, P. y Ferré, J. (eds.), 2001, Bioinsecticidas: fundamentos y aplicaciones de *Bacillus thuringiensis* en el control integrado de plagas, Phytoma -Universidad Pública de Navarra; Zeigler, 1998, Bacillus Genetic Stock Center Catalog of Strains, 7a edición, Vol. 2, Ohio State University). Actualmente se tiende, por parte de las pequeñas compañías, al desarrollo de una mayor diversidad de productos basados en cepas de *B. thuringiensis* que son específicas para el control de una plaga o grupo de plagas en un cultivo concreto. El desarrollo de tales cepas implica, además de su caracterización genética y bioquímica, llevar a cabo su caracterización insecticida para demostrar su utilidad en el control de una o más plagas concretas.

La actividad insecticida de una cepa de *B. thuringiensis* se determina mediante bioensayo. Un bioensayo mide la interacción entre el insecto utilizado como huésped y la proteína o mezcla de proteínas producidas por la cepa. El tipo de bioensayo está en función de la especie huésped pero, normalmente, la mezcla de esporas y cristales producida por la cepa se aplica al substrato alimenticio que va a comer el insecto. La respuesta más válida de un insecto a un bioinsecticida basado en *B. thuringiensis*, y la más fácil de medir, es la muerte del insecto. El parámetro más adecuado para medir el poder insecticida de un producto es la concentración letal media (CL₅₀), (o la dosis letal media (DL₅₀)), que es la concentración de producto que teóricamente mata al 50% de los insectos que la ingieren. La CL₅₀ (o la DL₅₀) se determinan exponiendo grupos de larvas a diferentes concentraciones (o diferentes dosis) del producto y manteniéndolas en condiciones favorables para su supervivencia. Durante un periodo de tiempo, normalmente entre 2 y 5 días, se registra el porcentaje de mortalidad producida en cada una de las concentraciones (o dosis) evaluadas y se determina la respuesta dosis-mortalidad mediante análisis estadísticos. Este procedimiento permite, igualmente, comparar la potencia relativa de dos o más productos.

Breve descripción de la invención

El objeto de la presente invención se refiere a la cepa NA118, una nueva cepa de *B. thuringiensis*, con demostrada actividad insecticida contra larvas del orden Lepidoptera. En concreto, la cepa NA118 posee una elevada toxicidad contra larvas de la rosquilla verde o gardama (*S. exigua*), la polilla de las crucíferas (*P. xylostella*) y polilla del racimo de la vid (*L. botrana*). Así pues, NA118 constituye un valioso ingrediente activo para la obtención de bioinsecticidas debido a la gran efectividad que presenta esta nueva cepa de *B. thuringiensis* frente a larvas de estos lepidópteros plaga. La invención también incluye a las cepas mutantes que se puedan obtener a partir de la cepa NA118 y a genes nuevos de esta cepa que codifiquen para proteínas tóxicas contra las especies de insectos mencionadas.

Descripción de la invención

La cepa de *B. thuringiensis* NA118 que se presenta en esta invención posee las siguientes características:

El crecimiento de la cepa puede realizarse en medios de cultivo suplementados con una concentración apropiada de sales minerales. En estas condiciones, la cepa produce colonias de morfología similar a la que presentan otras cepas de *B. thuringiensis* (colonias grandes, mates, de aspecto céreo y forma redondeada con bordes ligeramente irregulares) y un cristal bipiramidal de 1,7 μ m de longitud. La cepa puede fermentarse a gran escala en medios de cultivo ricos en sales.

ES 2 195 738 B1

La cepa se clasifica, según su antígeno flagelar, como perteneciente al serovar *aizawai* (antígeno H-7).

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

Las proteínas cristalinas que sintetiza esta cepa durante la fase de esporulación poseen un peso molecular de 130-140 kDa. Estas proteínas tienen actividad tóxica frente a larvas de *S. exigua*, *P. xylostella* y *L. botrana*.

La cepa contiene los genes que codifican para las proteínas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1C, Cry1D, Cry1Ia, Cry2 y Cry7,8. No contiene, sin embargo, los genes responsables de las proteínas Cry1Ac, Cry1Ad, Cry1B, Cry1E, Cry1F, Cry1G, Cry1Ib, Cry3 ni Cry4.

La cepa NA118, 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 València, 46100-Burjassot, Valencia, España) autoridad internacional de depósito de microorganismos, con el número de acceso 5347 y fecha 27 de julio de 2000.

La materia activa producida por la cepa NA118 puede obtenerse como se describe en el ejemplo 5, que es un método común para otras cepas de *B. thuringiensis*. Dicha materia, que consiste en una mezcla de esporas y cristales, se obtiene, una vez completado el proceso de fermentación, mediante centrifugación o cualquier otro medio conocido en la técnica. El precipitado puede ser formulado, mediante la adición de productos coadyuvantes (mojantes, adherentes, protectores solares, tensoactivos, etc.) y otras materias inertes, como una suspensión concentrada, polvo mojable, gránulos dispersables, microgránulos, así como cebos alimenticios.

La cepa NA118 puede ser una fuente de genes de interés para la transformación (introducción de genes) de bacterias u otros microorganismos así como para la construcción de plantas transgénicas a las que les confieren parte, o todas, las propiedades insecticidas de NA118. En la técnica se conocen varios métodos para realizar dicha transformación. Los organismos así construidos se pueden usar para el control de las plagas frente a las que la cepa NA118 presenta toxicidad.

Manera de realizar la invención

Los ejemplos que se describen a continuación 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

Aislamiento de la cepa NA118 de B. thuringiensis (Iriarte et al., 1998, System. Appl. Microbiol. 21: 97-106)

La presente cepa se aisló a partir de una muestra procedente de suelo, recogida a unos 2 ó 3 cm de profundidad, que se mantuvo almacenada a -20°C en una bolsa de plástico estéril hasta que fue analizada. Para llevar a cabo el aislamiento se pesa 1 g de la muestra y se añaden 10 ml de tampón fosfato (13 mM KH_2PO_4 , 26 mM K_2HPO_4 , pH 7,0). Se agita la mezcla vigorosamente durante 10 min, se calienta en un baño a 70°C durante 15 min, se repite la agitación y se vuelve a calentar otros 15 min a 70°C. De esta suspensión se transfieren alícuotas de 2, 5 y 10 μl a placas que contienen medio CCY (Stewart et al., 1981, Biochem. J. 198: 101-106) y se incuban a 28°C de 48 a 72 h. Las colonias que presentan el aspecto típico de *B. thuringiensis* (mates con brillo céreo y bordes irregulares) se examinan al microscopio óptico y se seleccionan aquellas que contienen espores y cristal. Para la purificación de colonias se siembran por triple estría en placas CCY. El nuevo aislado se transfirió a viales estériles, que contenían una solución acuosa de glicerol al 50%, se etiquetó con la denominación de NA118 y se almacenó a -20°C.

Ejemplo 2

Clasificación serológica de la cepa NA118 (de Barjac 1981, Microbial control of pests and plant diseases 1970-1980, pp.35-44. Burges, H. D. (Eds), Academic Press, London)

La clasificación serológica se hace utilizando células flageladas del aislado NA118 que, después de ser seleccionadas mediante tres pases sucesivos en tubos Craigie, se crecen en 12 ml de medio LB a 28°C en agitación continua. Cuando el cultivo bacteriano alcanza una densidad óptica de 0,8 a 1,0, se fijan las células mediante la adición de formalina a una concentración final de 0,5. El antígeno flagelar de la cepa se determina preparando para cada uno de los sueros conocidos, en un tubo de vidrio de borosilicato de 10x75 mm, una mezcla que consiste en 150 μl la suspensión de células flageladas, 600 μl de agua destilada estéril, 100 μl de NaCl (0,9%) y 100 μl de una dilución 1:40 de uno de los sueros de la colección proporcionada por el Instituto Pasteur, París, Francia. Todos los tubos se incuban a 37°C durante 2 h. La reacción positiva se verifica en aquél tubo que presenta un sobrenadante claro y un precipitado algodonoso.

ES 2 195 738 B1

Ejemplo 3

Procedimiento para determinar si la cepa NA118 produce β -exotoxina (Hernández et al., 2001, J. Appl. Microbiol. 90: 643-647)

La síntesis de β -exotoxina, tóxina termoestable, análogo de la adenosina-monofosfato y cuya toxicidad es inespecífica, se detecta mediante la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). La cepa NA118 se crece, a 29°C, en 10 ml de medio CCY con agitación durante 48 h. El cultivo crecido se centrifuga a 9000xg durante 10 min. Se recupera el sobrenadante, se esteriliza mediante autoclave (20 min, 120°C y 1 atm) y se filtra a través de membranas de nilón de 0,45 μ m. Como control positivo se utiliza la cepa HD2 de *B. thuringiensis*. Las muestras (volumen de inyección de 20 μ l) se analizan en una columna μ -Bondapak C18 a una temperatura que oscila entre 25°C y 30°C. La fase móvil es KH₂PO₄ (50 mM) disuelto en agua destilada desionizada, ajustado a pH 3,0 con ácido fósfórico al 85% y filtrado a través de una membrana de nilón de 0,45 μ m. El flujo de la fase móvil es de 2,0 ml/min y la detección se realiza midiendo la absorbancia a 260 nm. En los cromatogramas se observan los picos que corresponden a la forma fosforilada y a la forma desfosforilada de la β -exotoxina.

Ejemplo 4

Identificación de los genes contenidos en la cepa NA118 (Porcar et al., 2000, Entomol. Exp. Appl. 97: 3397-346)

Los genes *cry* contenidos en la cepas pueden ser identificados mediante la reacción en cadena de la polimerasa o PCR. Esta técnica permite amplificar fragmentos concretos del DNA de la cepa a partir de cebadores específicos para los genes *cry*. A continuación se describen los cebadores utilizados para la identificación de algunos de los genes *cry* conocidos en *B. thuringiensis*.

Cebador	Gen que reconoce	Tamaño del fragmento amplificado ^a	Referencia ^b
I(+)	Genes <i>cry1</i>	1500 aprox.	1
I(-)	Genes <i>cry1</i>	-	1
Un1(d)	Genes <i>cry1</i>	277	2
Un1(r)	Genes <i>cry1</i>	-	2
IAa ^a	<i>cry1Aa</i>	1286	1
IAb ^a	<i>cry1Ab</i>	1371	1
IAc ^a	<i>cry1Ac</i>	844	1
IAd ^a	<i>cry1Ad</i>	1212	1
IB ^a	<i>cry1B</i>	1323	1
IC ^a	<i>cry1C</i>	1176	1
ID ^a	<i>cry1D</i>	1138	1
IE ^a	<i>cry1E</i>	1137	1
IF ^a	<i>cry1F</i>	967	1
IG ^a	<i>cry1G</i>	1128	1
II(98)Fw	<i>cry1I</i>	1006	3
II(98)Rv	<i>cry1I</i>	-	3
IIa(10)Fw	<i>cry1Ia</i>	726	3
IIa(11)Rv	<i>cry1Ia</i>	-	3
IIb(8)Fw	<i>cry1Ib</i>	727	3
IIb(9)Rv	<i>cry1Ib</i>	-	3
II(+)	Genes <i>cry2</i>	1600	4
II(-)	Genes <i>cry2</i>	-	4
Un2(d)	Genes <i>cry</i>	700	2
Un2(r)	Genes <i>cry2</i>	-	2
Un3(d)	Genes <i>cry3</i>	600	2
Un3(r)	Genes <i>cry3</i>	-	2
Un4(d)	Genes <i>cry4</i>	439	2
Un4(r)	Genes <i>cry4</i>	-	2
Un7,8(d)	Genes <i>cry7</i> y/o <i>cry8</i>	420	2
Un7,8(r)	Genes <i>cry7</i> y/o <i>cry8</i>	-	2

ES 2 195 738 B1

^a Se refiere al fragmento amplificado al utilizar un determinado cebador en combinación con el cebador general de familia I(-), excepto en los casos de las parejas de cebadores I(+)/I(-), Un1(d)/Un1(r), II(98)Fw/II(98)Rv, II (+)/II(-), Un2(d)/Un2(r), Un3(d)/Un3(r), Un4(d)/Un4(r) y Un7,8(d)/Un7,8(r), donde la banda amplificada se refiere a la obtenida al usarse dicho par conjuntamente. El tamaño viene dado en pb (pares de bases). ^b1, Juárez-Pérez et al., 1997, Appl. Environ. Microbiol. 63: 2997-3002; 2, Ben-Dov et al., 1997, Appl. Environ. Microbiol. 63:4883-4890; 3, Van Rie (comunicación personal); 4, Ferrandis et al. 1999, Lett. Appl. Microbiol. 28: 440-444.

Ejemplo 5

10 Manera de obtener la materia activa producida por la cepa NA118

La materia activa de la cepa NA118 la constituye la mezcla de cristales proteicos y esporas que produce, durante la fase de esporulación, cuando se crece en un medio esporulante. Para preparar un litro del medio de cultivo esporulante, se añaden los siguientes componentes (soluciones 1 y 2) en las cantidades indicadas entre paréntesis y finalmente se completa hasta un litro con agua destilada. Tras esterilizar en autoclave, se añade 1 ml de la solución 3 esterilizada por filtración.

20	Solución 1. <i>Tampón del medio, pH 7 (500 ml)</i>	
	KH ₂ PO ₄	0,026 M
	K ₂ HPO ₄	0,052 M
25	Solución 2. <i>Fuente de carbono (10 ml)</i>	
	L-glutamina	0,2 g
	Caseína hidrolizada (ácida)	10 g
	Bacto casitona	10 g
	Extracto de levadura bacteriológica	4 g
	Glicerina	6 ml
30	Agua destilada hasta	100 ml
35	Solución 3. <i>Solución acuosa de sales (1 ml)</i>	
	ZnCl ₂	0,05 M
	MgCl ₂ · 6H ₂ O	0,5 M
	MnCl ₂ · 6H ₂ O	0,01M
	CaCl ₂ · 2H ₂ O	0,2 M
	FeCl ₃ · 6H ₂ O	0,05 M
40	HCl fumante	1%

Como inóculo se utiliza una suspensión de esporas y cristales que, previamente se calienta a 70°C, durante 30 min, para eliminar las células vegetativas y conseguir así que las esporas germinen y se desarrollen de forma sincronizada durante la fermentación. El inóculo representa aproximadamente un 1% del volumen del cultivo, el cual, posteriormente, se incuba a una temperatura de entre 28 y 30°C, con agitación y abundante aporte de oxígeno. El tiempo de incubación puede oscilar entre 48 y 72 h. El momento de finalización de la fermentación se determina, mediante inspección al microscopio óptico de contraste de fases, cuando alrededor del 90% de las células esporuladas ya han lisado y liberado al medio las esporas y los cristales.

La concentración de las esporas y cristales se puede llevar a cabo mediante centrifugación, entre otras técnicas. El sedimento se puede lavar con un 10% del volumen inicial de NaCl 1M / EDTA 10 mM, para inactivar las proteasas y proteger así la integridad de los cristales, y se centrifuga de nuevo. El sedimento se puede liofilizar y guardar a 4°C o a temperatura ambiente, o bien resuspender en una solución de KCl 10 mM (10 ml/l cultivo inicial) y mantenerlo a -20°C hasta su formulación.

Ejemplo 6

60 Determinación del peso molecular de las proteínas que componen el cristal de la cepa NA118 (Iriarte et al., 1998, Sytem. Appl. Microbiol. 21: 97-106)

La mezcla de esporas y cristales, obtenidas como se describe en el ejemplo 5, se somete a sonicación durante 20 s (Soniprep 150 MSE) y se carga inmediatamente en un gradiente discontinuo de sacarosa compuesto por tres soluciones de sacarosa al 69%, 72% y 79% (peso/volumen) (Thomas y Ellar, 1983, J. Cell Sci. 60: 181-197). Se centrifugan 16 h a 70.000xg y la fase que contiene los cristales se recupera mediante una pipeta Pasteur. Los cristales se lavan con agua estéril hasta un volumen final de 200 ml, y se centrifugan de nuevo 45 min a 20.000xg. Los cristales precipitados se resuspenden de nuevo en agua y se comprueba su pureza mediante microscopía de contraste de fases.

ES 2 195 738 B1

Aproximadamente 10 μ l de estas muestras de cristales se añaden a un tubo de 1,5 ml que contiene 5 μ l de una mezcla formada por 30x Reducing Agent (1/10 del volumen) y 3x SDS Sample Buffer (1 volumen) de Biolabs. Después se calienta a 100°C durante 5 min y se separan mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% (100:1 acrilamida/bis acrilamida) conteniendo sodio dodecilsulfato, durante 1h a 36 mA tal y como se describe en Laemmli (1970). El gel se tiñe en una solución 50% (v/v) de etanol, 10% (v/v) de ácido acético y 0,1% (peso/volumen) de azul de Coomassie R 250 durante 40 minutos, después de los cuales se destiñen en una solución 6,75% (v/v) de ácido acético glacial y 9,45% (v/v) de etanol. Los pesos moleculares de las proteínas se obtuvieron por comparación con un marcador de peso molecular (Biolabs, New England).

Ejemplo 7

Ensayo de toxicidad, en medio artificial, con la mezcla de cristales y esporas de la cepa NA118 y larvas de S. exigua

El medio artificial consiste en:

Agua	1000 ml
Agar	18 g
Harina de maíz	96 g
Germen de trigo	64 g
Caseína	10 g
Levadura de panadería	34 g
Nipagin	1 g
Hidrocloruro de tetraciclina	0,5 g
Ácido sórbico	2,5 g
Ácido ascórbico	9 g
Aceite de maíz	4 ml
Mezcla de sales Wesson	5 g
Mezcla de vitaminas	0,12 g
<i>Mezcla de sales Wesson</i>	
CaCo ₃	210 g
CUSO ₄ · 5H ₂ O	0,39 g
FePO ₄	14,7g
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
KCl	120 g
KH ₂ PO ₄	310 g
KI	0,05 g
NaCl	105 g
NaF	0,57 g
Ca ₃ (PO ₄) ₂	149 g
<i>Mezcla de vitaminas</i>	
Ácido nicotínico	1 g
Riboflavina	0,5 g
Tiamina	0,23 g
Piridoxina	0,23 g
Calcio pantotenato	1 g
Ácido fólico	20 mg
Biotina	20 mg
Vitamina B ₁₂	2 mg

ES 2 195 738 B1

Se mezcla el agar, el aceite de maíz y el agua. La mezcla se lleva a ebullición y, cuando la mezcla se ha enfriado a 55 ó 60°C, se añaden el resto de los ingredientes homogeneizando 1., mezcla con un agitador de aspas. En cada bioensayo se utilizan al menos cinco concentraciones de la mezcla liofilizada de cristales y esporas y un control negativo (agua). La mezcla de esporas y cristales se homogeniza con el medio artificial a una temperatura de 50°C y, cuando aún está en estado semilíquido, se vierte aproximadamente 1 ml en cada uno de los pocillos de una placa de cultivo. A cada pocillo, una vez que se ha enfriado el medio artificial, se transfiere una larva de dos días de edad. Para cada concentración de esporas y cristales evaluada, y también para el testigo, se utilizan un total de doce larvas. Las placas con los insectos se colocan a 25°C, HR 70% y con un fotoperiodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad y la mortalidad se registra a los 5 días.

Ejemplo 8

Ensayo de toxicidad, en hojas de lechuga, de la mezcla de cristales y esporas de la cepa NA118 con larvas neonatas de S. exigua

Se sumergen discos de lechuga de 0,5 cm de diámetro en soluciones acuosas que contienen distintas concentraciones de cristales y esporas y un agente mojante. Se dejan secar al aire y, una vez secos, se colocan en pocillos individuales de 4 cm² (placas Sterilin, de 25 pocillos) cuyo fondo está recubierto con una pequeña capa de agar al 3% en agua para prevenir la desecación. A cada pocillo se transfiere una larva neonata, utilizándose un total de 20 a 25 larvas por cada una de las concentraciones evaluadas en el bioensayo. Las placas con los insectos se colocan a 25°C, HR 70% y con un fotoperiodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad. La mortalidad se registra a los 2 días.

Ejemplo 9

Ensayo de toxicidad, en medio artificial, con la mezcla de cristales y esporas de la cepa NA118 y larvas de tercer estadio de P. xylostella

El medio artificial consiste en:

Agua	1000 ml
Agar	20 g
Germen de trigo	100 g
Caseína	45 g
Sacarosa	40 g
Levadura de cerveza	30 g
Colesterol	1 g
Nipagina	1,6 g
Aureomicina-Tetraciclina	0,25 g
Ácido sórbico-potasio sorbato	1,6 g
Rifampicina	0,25 g
Ácido ascórbico	3 g
Aceite de maíz	4 ml
Mezcla de sales Wesson	20 g
Mezcla de vitaminas	0,03 g
<i>Mezcla de sales Welson</i>	
CaCO ₃	210 g
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
KCl	120 g
KH ₂ PO ₄	310 g
KI	0,05 g
NaCl	105 g
NaF	0,57 g
Ca ₃ (PO ₄) ₂	149 g

ES 2 195 738 B1

(Continuación)

<i>Mezcla de vitaminas</i>	
Ácido nicotínico	1 g
Riboflavina	0,5 g
Tiamina	0,23 g
Piridoxina	0,23 g
Calcio pantotenato	1 g
Ácido fólico	20 mg
Biotina	20 mg
Vitamina B ₁₂	2 mg

Se mezcla el agar, el aceite de maíz y el agua. La mezcla se lleva a ebullición y, cuando se ha enfriado a 50 ó 55°C, se añade el resto de los ingredientes y se homogeneiza con un agitador de aspas. Cuando el medio todavía está caliente se distribuye en pocillos de 2 cm² de una placa de cultivo. Sobre la superficie del medio artificial de cada pocillo se añaden 50 µl de agua destilada estéril que contiene una determinada concentración de esporas y cristales y se deja secar bien. Se utilizan cinco concentraciones distintas de esporas y cristales y un control (agua). A cada pocillo se transfiere una larva y se utilizan un total de 12 larvas por concentración incluido el testigo. Las placas con los insectos se colocan a 25°C, HR 70% y fotoperiodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad. La mortalidad se registra a los 2 días.

Ejemplo 10

Ensayo de toxicidad, en medio artificial, con la mezcla de cristales y esporas de la cepa NA118 y larvas del tercer estadio de L. botrana

El medio artificial consiste en:

Agua	390 ml
Agar	12 g
Mosto de uva	120 ml
Hoja de vid (polvo seco)	15 g
Germen de trigo	21 g
Sémola de maíz	24 g
Levadura de panadería	22,5 g
Ácido ascórbico	3 g
Ácido benzoico	1,05 g
Nipagina	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 triturarse posteriormente (por ejemplo en un molinillo de café). Para, preparar el medio, se mezclan el agar, el aceite de maíz y el agua y se lleva a ebullición. Cuando la mezcla se ha enfriado a 55 ó 60°C, se añade el resto de ingredientes y se homogeneiza con un agitador de aspas. En cada ensayo se utilizan al menos 5 concentraciones de la mezcla liofilizada de cristales y esporas, además de un control negativo (agua). La mezcla de cristales y esporas se incorpora al medio artificial, cuando éste todavía está líquido, mediante un homogenizador.

Se recubren placas de 12 pocillos con el medio caliente y se deja solidificar al aire. A los pocillos se les añaden distintas concentraciones de cristales y esporas en un volumen final de 50 µl de agua destilada estéril y se deja secar bien. Se transfiere una larva por pocillo, utilizando un total de doce larvas por concentración. Las placas con los insectos se colocan a 25°C, HR 70% y con un fotoperiodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad y la mortalidad se registra a los 5 días.

Ejemplo 11

Potencia insecticida, en hojas de lechuga, de la mezcla de cristales y esporas de la cepa NA118 frente a larvas neonatas de S. exigua

La potencia insecticida de la cepa NA118 se determina mediante un ensayo de toxicidad, como el que se describe en el ejemplo 8, en el que se utiliza como producto de referencia la mezcla de cristales y esporas producida por la cepa

ES 2 195 738 B1

del producto comercial Xentari® (Abbot). A partir de los datos de concentración-mortalidad, obtenidos con cada una de las dos mezclas de cristales y esporas, se estiman los correspondientes valores de la LC_{50} (concentración de cristales y esporas que produce la muerte al 50% de los insectos expuestos durante el tiempo que dura el bioensayo) mediante el programa estadístico POLO-PC (LeOra software, 1987). Los valores se expresan 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	LC_{50}	
	NA118	Xentari®
<i>S. exigua</i>	0,23	0,19

Ejemplo 12

Actividad insecticida, en medio artificial, de la mezcla de cristales y esporas de la cepa NA118 frente a larvas de P. xylostella L. botrana y S. exigua

La actividad insecticida de la mezcla liofilizada de esporas y cristales obtenida a partir de esta cepa se estima a partir de los datos de mortalidad obtenidos en los bioensayos con diferentes diluciones de dicha mezcla (ver ejemplos 7, 9 y 10). Como producto de referencia se utilizó una mezcla de esporas y cristales, liofilizada asimismo, de la cepa aislada del producto comercial Delfin® (Sandoz). La actividad insecticida de la mezcla de esporas y cristales se determinó mediante la estimación del valor de la concentración letal media (CL_{50}): concentración de cristales y esporas que produce la muerte del 50% de los insectos. Este parámetro se determinó con la utilización del programa estadístico POLO-PC (LeOra Software, 1987, Berkeley, CA). Los valores están expresados en ng de liofilizado/cm² en el caso de *P. xylostella*, y en mg de liofilizado/L de medio artificial en *L. botrana* y *S. exigua*.

Insecto plaga	CL_{50}	
	NA118	Delfin®
<i>P. xylostella</i>	101	110
<i>L. botrana</i>	5,0	3,1
<i>S. exigua</i>	2,5	3,8

REIVINDICACIONES

1. Composición insecticida contra *Plutella xylostella* y/o *Lobesia botrana* que comprende la cepa CECT 5347 de *Bacillus thuringiensis* o cualquier mutante derivado de la misma con función insecticida equivalente.

2. Método de control de plagas de *Plutella xylostella* y/o *Lobesia botrana* que consiste en la puesta en contacto de dichos insectos o del ambiente donde se encuentran, con una cantidad efectiva de una composición que comprende la cepa CECT 5347 de *Bacillus thuringiensis* o cualquier mutante derivado de la misma con función insecticida equivalente.

3. Método según la reivindicación 2 **caracterizado** porque la composición comprende cristales, pero no esporas, de la cepa CECT 5347 de *Bacillus thuringiensis* o cualquier mutante derivado de la misma con función insecticida equivalente.

4. Método según la reivindicación 2 **caracterizado** porque la composición comprende cristales y esporas de la cepa CECT 5347 de *Bacillus thuringiensis* o cualquier mutante derivado de la misma con función insecticida equivalente.



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ ES 2 195 738

⑫ Nº de solicitud: 200101859

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 31.07.2001

⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ Int. Cl.7: A01N 63/00, 63/02, C12N 1/20 // (C12N 1/20, C12R 1:07)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	PORCAR, M. et al. Host range and gene contents of <i>Bacillus thuringiensis</i> strains toxic towards <i>Spodoptera exigua</i> . <i>Entomologia Experimentalis et Applicata</i> , 2000, Vol. 97, páginas 339-346.	1,2,4
Y	WO 9213941 A1 (ABBOTT LABORATORIES) 22.08.1992, todo el documento.	1,2,4
Y	EP 401979 A2 (MYCOGEN CORPORATION) 12.12.1990, todo el documento.	1,2,4
Y	EP 405810 A2 (MYCOGEN CORPORATION) 02.07.1991, todo el documento.	1,2,4
Y	MOHAN, M. y GUJAR, G.T. Toxicity of <i>Bacillus thuringiensis</i> strains and commercial formulations to the diamondback moth, <i>Plutella xylostella</i> (L.). <i>Crop Protection</i> , 2001, Vol. 20, páginas 311-316.	1,2,4
Y	CHARMILLOT, P.-J. et al. Efficacité et rémanence de quelques préparations à base de <i>Bacillus thuringiensis</i> (BT) dans la lutte contre les vers de la grappe eudémis et cochylis. <i>Revue suisse Vitic. Arboric. Hortic.</i> , 1991, Vol. 23 (3), páginas 187-194.	1,2,4

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 nº:

Fecha de realización del informe

31.10.2003

Examinador

A. Polo Díez

Página

1/1