



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 203 310**

② Número de solicitud: 200102916

⑤ Int. Cl.7: **C12N 15/31**  
A01N 63/00

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **28.12.2001**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **01.04.2004**

Fecha de la concesión: **09.05.2005**

⑭ Fecha de anuncio de la concesión: **01.06.2005**

⑮ Fecha de publicación del folleto de la patente:  
**01.06.2005**

⑰ Titular/es: **Universidad Pública de Navarra  
Campus Arrosadia, s/n  
O.T.R.I. Edif. el Sario  
31006 Pamplona, Navarra, ES**

⑱ Inventor/es: **Caballero Murillo, Primitivo;  
Martínez Rico, Clara;  
Porcar Miralles, Manuel y  
Murillo Martínez, Jesús**

⑲ Agente: **Tavira Montes-Jovellar, Antonio**

⑳ Título: **Nueva cepa de *bacillus thuringiensis* con múltiples genes cry tóxica contra lepidópteros plaga.**

㉑ Resumen:

Nueva cepa de *bacillus thuringiensis* con múltiples genes cry tóxica contra lepidópteros plaga.

Se describe una nueva cepa HU04-2 de *Bacillus thuringiensis* (Bt), con actividad insecticida contra larvas de las especies de lepidópteros *Helicoverpa armigera*, *Spodoptera exigua*, *S. littoralis* y *S. frugiperda*. La nueva cepa de Bt de la invención se muestra eficaz contra todas estas especies al mismo tiempo. Así mismo, en esta invención también se incluyen tanto los mutantes derivados de esta cepa como los genes que puedan transferirse a otros microorganismos, y puedan utilizarse para el control de estos lepidópteros plaga o plantas y les doten de resistencia contra los mismos.

A su vez se describen las proteínas codificadas por dichos genes.

ES 2 203 310 B1

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

# ES 2 203 310 B1

## DESCRIPCIÓN

Nueva cepa de *Bacillus thuringiensis* con múltiples genes *cry* tóxica contra lepidópteros plaga.

### 5 Objeto de la invención

Se describe una nueva cepa HU04-2 de *Bacillus thuringiensis* (Bt), con actividad insecticida contra larvas de las especies de lepidópteros *Helicoverpa armigera*, *Spodoptera exigua*, *S. littoralis* y *S. frugiperda*. La nueva cepa de Bt de la invención se muestra eficaz contra todas estas especies al mismo tiempo. Así mismo, en esta invención también se incluyen tanto los mutantes derivados de esta cepa como los genes que puedan transferirse a otros microorganismos, y puedan utilizarse para el control de estos lepidópteros plaga o plantas y les doten de resistencia contra los mismos.

A su vez se describen las proteínas codificadas por dichos genes.

### 15 Estado de la técnica

*Bacillus thuringiensis* es una bacteria aeróbica, Gram + ampliamente distribuida en el medio natural que se puede aislar del suelo, insectos enfermos, ambientes acuáticos, superficies vegetales y polvo de almacenes o molinos de cereal. El desarrollo de programas de investigación por los gobiernos, universidades y el sector industrial ha dado como resultado el descubrimiento de muchas cepas de *B. thuringiensis*, con distintas especificidades insecticidas, las cuales se han agrupado por las características de su antígeno flagelar en 82 serovares distintos (Lecadet *et al.*, 1999, *J. Appl. Microbiol.* 86: 660-672).

*B. thuringiensis* puede producir una gran variedad de sustancias, denominadas factores de virulencia, que contribuyen a la toxicidad de esta bacteria. Uno de los primeros factores de virulencia que se descubrieron fue una exotoxina termoestable producida durante la fase de crecimiento vegetativo. Esta exotoxina, denominada  $\beta$ -exotoxina, es un análogo del ATP y debido al parecido con esta molécula, es capaz de inhibir las ARN polimerasas dependientes de ADN (Sebesta y Horská, 1970, *Biochem. Biophys. Acta.* 209: 357-376) por lo que su espectro de toxicidad es inespecífico.

Las propiedades insecticidas de *B. thuringiensis* se deben, además de a los factores de virulencia, a que esta bacteria produce, durante la fase de esporulación, grandes cantidades de proteínas (conocidas como  $\delta$ -endotoxinas) que se agregan en cristales paraesporales y, con frecuencia, son tóxicas para larvas de insectos (Bulla *et al.*, 1980, *C.R.C. Critical Review Microbiology* 8: 147-204; Kumar *et al.*, 1996, *Adv. Appl. Microbiol.* 42: 1-43). Estas proteínas del cristal están unidas por puentes disulfuro y uniones hidrofóbicas, que las hacen resistentes a las proteasas, lo cual permite su acumulación en el interior de la célula. Existen dos tipos de  $\delta$ -endotoxinas, las proteínas Cry, que son específicas, y las proteínas Cyt con actividad citolítica inespecífica.

Las proteínas Cry y las Cyt están codificadas por los genes *cry* o *cyt*, respectivamente, que, aunque se pueden localizar en el cromosoma de la bacteria, normalmente, se localizan en plásmidos de gran peso molecular, que también pueden contener genes para la síntesis de  $\beta$ -exotoxina. La presencia de genes se determina mediante la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) utilizando cebadores específicos para cada gen. Esta técnica fue introducida por primera vez por Carozzi *et al.* (1991) (*Appl. Environ. Microbiol.* 57: 3057-3061) y, desde entonces, ha sido ampliamente utilizada en el estudio de colecciones de cepas de *B. thuringiensis* (Cerón *et al.*, 1995, *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 3826-3831; Ben-Dov *et al.*, 1997, *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 4965-4972; Bravo *et al.*, 1998, *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 4965-4972; Ferrandis *et al.*, 1999, *System. Appl. Microbiol.* 22: 179-185; Porcar *et al.*, 2000, *Entomol. Exper. Appl.* 97: 339-346). Los genes *cry* y *cyt* se han clasificado según el criterio propuesto por Crickmore *et al.* (1998) (*Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 807-813), que se basa en el grado de homología de la secuencia de nucleótidos. Así por ejemplo, según este sistema, todos los genes *cry* que comparten un mismo número arábigo (*cry1*), tienen aproximadamente el 45% de homología, los que comparten una letra en mayúscula (*cry1A*), tienen el 78% de homología y los que, además, comparten una letra en minúscula (*cry1Aa*) tienen hasta el 95%. En ocasiones, se adjunta un último número arábigo (*cry1Aa1*) para diferenciar genes que comparten más del 95% de su secuencia. Hasta la fecha, se conocen varias decenas de genes *cry*, que pueden ser consultados en el sitio web "<http://www.biols.susx.ac.uk/Home/Neil-Crickmore/Bt/index.html>". Tanto el número de genes *cry*, como las proteínas Cry, para las que codifican, está creciendo continuamente, lo cual hace que aumente el espectro de huéspedes de *B. thuringiensis*.

El primer formulado comercial basado en *B. thuringiensis* se produjo en Francia en 1938 y durante la década de los 60 se manufacturaron gran número de formulaciones industriales basadas en *B. thuringiensis* en los Estados Unidos, la antigua URSS, Francia y Alemania. En la década de los 80, el interés comercial por *B. thuringiensis* creció rápidamente ya que muchos insecticidas químicos resultaban inefectivos debido a la selección de resistencia en las poblaciones de insectos.

Existe una gran diversidad de cepas de *B. thuringiensis*, fruto de los programas de muestreo realizados en todo el mundo, que potencialmente pueden ser el componente básico de nuevos formulados comerciales. Para ello, éstas cepas no deben de producir  $\beta$ -exotoxina cuya actividad tóxica es inespecífica. En la mayoría de los bioinsecticidas, se utilizan cepas pertenecientes a los serovares *kurstaki* y *aizawai* (contra lepidópteros), *israelensis* (contra dípteros) y *morrisoni* [tenebrionis cepa 256-82 (contra coleópteros)]. Biobit(r), Dipel(r), Foray(r), Cutlass(r) y Thuricide(r) son productos comerciales basados en la cepa HD-1 serovar *kurstaki* y contienen las proteínas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac,

Cry2Aa y Cry2Ab expresadas por esta cepa. Los productos basados en HD-1 son eficaces para el control de larvas de especies del grupo *Heliothis*, *Plutella* y *Lobesia* pero resultan poco efectivos contra larvas del género *Spodoptera*. Por este motivo, se han buscado nuevos productos insecticidas, como el producto comercial Xentari(r), basado en una cepa de *B. thuringiensis* serovar *aizawai* la cual, además de las proteínas Cry1A, expresa las proteínas Cry1C y Cry1D. Sin embargo, no se han encontrado cepas de *B. thuringiensis* que sean efectivas al mismo tiempo para especies del género *Spodoptera* y especies de otros géneros (p.e. *Helicoverpa*). La existencia de poblaciones de insectos resistentes, ha conducido a un aumento del esfuerzo dedicado a la búsqueda de nuevas cepas de *B. thuringiensis* para su utilización en control de plagas. El objetivo de los muestreos es la identificación de nuevas cepas que presenten una actividad insecticida especialmente elevada contra un determinado insecto plaga, o bien un nuevo espectro de huéspedes.

La caracterización insecticida de cepas de *B. thuringiensis* tradicionalmente se ha realizado mediante bioensayo. Estos, debido al tiempo que conlleva su realización, durante la década anterior fueron parcialmente sustituidos por la identificación de genes *cry* mediante la PCR. Sin embargo, conviene señalar que el contenido en genes *cry* es sólo una aproximación preliminar en la caracterización de una cepa ya que los genes poco expresados o genes crípticos (Masson *et al.*, 1998, *Appl. Environ. Microbiol.* 64:4782-4788) y las interacciones de las proteínas que forman el cristal (Wu y Chang, 1985, *FEES Lett.* 190:232-236) son fenómenos que pueden afectar de forma importante la toxicidad de una cepa. Así pues, mediante la realización de bioensayos se obtienen datos complementarios a los resultados de PCR que son esenciales para completar la caracterización de una cepa de *B. thuringiensis*.

### Breve descripción de la invención

La presente invención concierne a una nueva cepa de *B. thuringiensis* con demostrada actividad insecticida contra larvas de las especies de lepidópteros, *H. armigera*, *S. exigua*, *S. littoralis* y *S. frugiperda*. En concreto, la invención se refiere a la cepa HU04-2, la cual presenta múltiples genes *cry* (ocho genes distintos, entre ellos, uno no descrito previamente) y cuyo espectro de toxicidad incluye especies de insectos que, en su conjunto, no son efectivamente controladas por ninguna de las cepas actualmente comercializadas. Así pues, HU04-2 constituye un valioso material biológico para la obtención de la materia activa de bioinsecticidas debido a la gran efectividad que presenta frente a las larvas de estos lepidópteros plaga. La presente invención también incluye a las cepas mutantes que se puedan obtener a partir de HU04-2, a los genes nuevos que presente dicha cepa y a las proteínas tóxicas contra las plagas antes mencionadas, codificadas por estos genes.

### Descripción detallada de la invención

La cepa de *B. thuringiensis* HU04-2 que se presenta en esta invención posee las siguientes características:

La cepa puede crecerse en medios de cultivo ricos en sales y una temperatura adecuada. Bajo estas condiciones, se producen colonias grandes, mates, de aspecto céreo y forma redondeada con bordes ligeramente irregulares (morfología similar a la que presentan otras cepas de *B. thuringiensis*) y un cristal bipiramidal. Además, la cepa puede fermentarse industrialmente en medios de cultivo suplementados con sales minerales en una concentración adecuada.

La clasificación de la cepa está basada en su antígeno flagelar. Según este sistema de clasificación, la cepa posee el antígeno H-7 y, por tanto, pertenece al serovar *aizawai*.

La cepa, durante la fermentación, no produce el compuesto termoestable  $\beta$ -exotoxina del tipo I, que es un análogo de la adenosina-monofosfato y cuya toxicidad es inespecífica.

Las proteínas Cry sintetizadas por esta cepa durante la fase de esporulación poseen un peso molecular de 130-140 kDa y tienen actividad tóxica frente a larvas de *H. armigera*, *S. exigua*, *S. littoralis* y *S. frugiperda*.

Los genes *cry* identificados en la cepa codifican para las proteínas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ad, Cry1C, Cry1D, Cry1F, Cry1I y Cry2. Sin embargo, no se han identificado los genes implicados en la síntesis de las proteínas Cry1Ac, Cry1B, Cry1E, Cry1G ni Cry1Ib.

La cepa tiene un nuevo gen *cryII* cuya pauta de lectura abierta es de 2.160 pares de bases que codifican para un polipéptido de 80,9 kDa. La secuencia aminoacídica de este polipéptido tiene una homología del 96,1% con la secuencia de la proteína CryIIa1, del 92,8% con CryIIb1 y del 89,6% con CryIIc1. La comparación de su secuencia nucleotídica con los genes del grupo *cryIIa*, con los cuales comparte un mayor grado de homología, nos ha permitido clasificarlo como el gen *cryIIa7*.

La cepa HU04-2, 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 CECT5950 y fecha de 3 de julio de 2001.

La materia activa de la cepa HU04-2, se obtiene como se describe en el ejemplo 6 y consiste en una mezcla de esporas y cristales. Para su aplicación en campo, dicha materia activa puede presentarse formulada como una suspensión concentrada, polvo mojable, gránulos dispersables, microgránulos o cebos alimenticios mediante la adición de productos coadyuvantes (mojantes, adherentes, protectores solares, tensioactivos, etc.).

## ES 2 203 310 B1

La cepa HU04-2 también puede ser utilizada como fuente de genes para su uso en biotecnología. Los genes, mediante varios métodos, pueden utilizarse para la transformación (introducción de genes) de bacterias, plantas u otros microorganismos confiriéndoles parte o la totalidad de las propiedades insecticidas de HU04-2. Esta técnica, permite que los organismos transformados puedan ser usados eficazmente en el control de las plagas frente a las que la cepa HU04-2 presenta toxicidad.

Los ejemplos que se dan a continuación ilustran los procedimientos para poner en práctica la invención de la mejor manera posible. Sin embargo, estos ejemplos no deben de ser considerados como exclusivos y, por tanto, no limitan la invención en modo alguno.

### Ejemplo 1

*Procedimiento para determinar si la cepa HU04-2 produce  $\beta$ -exotoxina (Hernández et al., 2001, J. Appl. Microbiol. 90: 643-647)*

La detección de la síntesis de la tóxina termoestable  $\beta$  exotoxina se realiza mediante la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Para ello, se crece una colonia de la cepa HD2 de *B. thuringiensis*, que se utiliza como control positivo de la producción de  $\beta$ -exotoxina, y una colonia de la cepa HU04-2 a una temperatura de 29°C en 10 ml de medio CCY (descrito en el ejemplo 6) con agitación durante 48 h. Se centrifuga a 9.000xg durante 10 min y el sobrenadante recuperado se esteriliza mediante autoclave a 120°C, 20 min a 1 atm de presión. El  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (50 mM, pH 3,0) constituye la fase móvil y se prepara disolviendo  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  en agua destilada desionizada y ajustando su pH con ácido fósfórico al 85%. El flujo de la fase móvil es de 2,0 ml/min. El sobrenadante y la fase móvil se filtran a través de membranas de nylon de 0,45  $\mu\text{m}$ . Se analiza un volumen de inyección de 20  $\mu\text{l}$  de sobrenadante en una columna  $\mu$ -Bondapak C18 a una temperatura que oscila entre 25°C y 30°C y se detecta a 260 nm. Transcurrida la inyección, en los cromatogramas, se observan los picos de la  $\beta$ -exotoxina en su forma fosforilada y en su forma desfosforilada.

### Ejemplo 2

*Determinación del perfil plasmídico de la cepa HU04-2 (Jensen et al., 1995, J. Bacteriol. 177: 2914-2917.)*

Se centrifugan 2 ml de cultivo crecido toda la noche en LB y el precipitado se resuspende en 100  $\mu\text{l}$  de tampón TE (40 mM Tris; 2 mM EDTA; pH 7,9). Las células se lisan con 200  $\mu\text{l}$  de solución de lisis (3% SDS; 15% sacarosa; 50 mM Tris; pH 12,5), se incuban a 60°C durante 30 min y se mantienen 5 min a temperatura ambiente. Para digerir las proteínas se añaden 5 unidades de proteinasa K (Sigma), los tubos se invierten suavemente varias veces y se incuban a 41°C durante 90 min. Para eliminar las proteínas, se añade 1 ml de fenol: cloroformo: isoamilalcohol (25:24:1), se invierten los tubos 40 veces y se centrifugan durante 10 min a 9.000xg. El ADN se encuentra en la fase acuosa de la que se analizan aproximadamente 30  $\mu\text{l}$  mediante electroforesis en gel de 0,5% agarosa 1xTBE (Tris Borato EDTA) durante 5-7 h a 64 V y 4°C.

### Ejemplo 3

*Identificación de los genes cry en la cepa HU04-2*

Los cebadores descritos a continuación permiten, mediante la técnica de PCR, amplificar fragmentos concretos de ADN de la cepa HU04-2 correspondientes a algunos de los genes *cry* de *B. thuringiensis* que codifican para proteínas tóxicas contra larvas de lepidópteros.

TABLA

Cebador	Gen que reconoce	Secuencia de nucleótidos (5'-3')	Producto (bp) amplificado <sup>a</sup>	Ref. <sup>b</sup>
I(-)	Genes <i>cryI</i>	SEQ ID NO: 1	-	1
IAa	<i>cryIAa</i>	SEQ ID NO: 2	1286	1
IAb	<i>cryIAb</i>	SEQ ID NO: 3	1371	1
IAc	<i>cryIAc</i>	SEQ ID NO: 4	844	1
IAd	<i>cryIAd</i>	SEQ ID NO: 5	1212	1
IB	<i>cryIB</i>	SEQ ID NO: 6	1323	1

# ES 2 203 310 B1

TABLA (continuación)

	Cebador	Gen que reconoce	Secuencia de nucleótidos (5'-3')	Producto (bp) amplificado <sup>a</sup>	Ref. <sup>b</sup>
5	IC	<i>cry1C</i>	SEQ ID NO: 7	1176	1
	ID	<i>cry1D</i>	SEQ ID NO: 8	1138	1
10	IE	<i>cry1E</i>	SEQ ID NO: 9	1137	1
	IF	<i>cry1F</i>	SEQ ID NO: 10	967	1
	IG	<i>cry1G</i>	SEQ ID NO: 11	1128	1
	II(98)Fw	<i>cry1I</i>	SEQ ID NO: 12	1006	2
15	II(98)Rv	<i>cry1I</i>	SEQ ID NO: 13	-	2
	MUTFw	<i>cry1I</i>	SEQ ID NO: 14	2200	3
	II(E)Rv	<i>cry1I</i>	SEQ ID NO : 15	-	3
	II(+)	Genes	SEQ ID NO: 16	1600	4
20		<i>cry2</i>			
	II(-)	Genes	SEQ ID NO: 17	-	4
		<i>cry2</i>			

<sup>a</sup> Referido al fragmento amplificado al usarse un determinado cebador en combinación con el cebador general de familia I(-), excepto en el caso de la pareja de cebadores II(+)-II(-), y II(98)Fw-II(98)Rv, en cuyo caso se refiere a la banda amplificada al usarse dicho par conjuntamente. El tamaño está dado en pb (pares de bases).

<sup>b</sup> 1, Juárez-Pérez *et al.*, 1997, *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 2997-3002; 2, Van Rie, comunicación personal; 3, este trabajo, 4 Ferrandis *et al.*, 1999, *System. Appl. Microbiol.* 22, 179-185.

## Ejemplo 4

### Preparación de la muestra de ADN y manera de realizar la 5 amplificación por PCR

El ADN se obtiene a partir de las células de una única colonia que, después haber sido crecidas en una placa de LB a 28°C durante toda la noche, se resuspende en 100 µl de agua, se hierve durante 10 min y después se enfría en hielo. El ADN se encuentra en el sobrenadante acuoso del que se toman 5 µl que se traspasan a un tubo de microcentrífuga de 0,2 ml que contiene la siguiente mezcla: 1 U de *Taq* ADN polimerasa (Pharmacia Biotech), 0,25 mM de cada uno de los cuatro nucleótidos trifosfato y 1 µM de cada uno de los cebadores en un volumen total de 50 µl. La PCR se realiza en un termociclador (Eppendorf Mastercycler) usando una primera fase de desnaturalización (3 min a 95°C), seguida de 30 ciclos de amplificación consistentes en 1 min a 95°C, 1 min a 45°C y 1 min a 72°C. Se finaliza con un paso extra de extensión a 72°C durante 10 min. Cada experimento se asocia con un control negativo (sin ADN) y uno positivo (ADN de la cepa HD1 o de una cepa del LEAPI portadora del gen que se pretende amplificar).

## Ejemplo 5

### Clonaje y secuenciación de un nuevo gen *cry*

A continuación se describe el procedimiento llevado a cabo para la secuenciación, clonación y expresión del nuevo gen *cryIIa7* de la cepa de *Bacillus thuringiensis* HU04-2. Este es uno de los ocho genes *cry* identificados en la cepa HU04-2 pero, a diferencia de los otros siete, no había sido descrito previamente. La secuencia de ADN que contiene el nuevo gen *cryII*, se obtiene mediante una amplificación por PCR con los cebadores MUTFw, que incluye en su secuencia el sitio de restricción *NheI*, y II(E)Rv bajo las condiciones descritas en el ejemplo 4. El producto amplificado, de 2160 pares de bases, se clona en el vector pGEM-T y se transforman células de *Escherichia coli*, cepa DH5α, siguiendo exactamente las recomendaciones del protocolo del vector pGEM-T (Promega Corporation, Woods Hollow Road, Madison, USA). Para su secuenciación, se requiere ADN purificado de la construcción resultante en una concentración de 0,1 µg/µl. Las muestras se secuenciaron en el servicio de secuenciación de ADN del CIB-CSIC de Madrid obteniéndose la secuencia nucleotídica codificante (SEQ ID NO: 18), junto con la del péptido correspondiente (SEQ ID NO: 19).

## Ejemplo 6

### Manera de obtener la materia activa producida por la cepa HU04-2

La materia activa de la cepa HU04-2, constituida por : cristales proteicos, se obtiene fermentando la cepa en CCY (Stewart *et al.*, 1981, *Biochem. J.* 198: 101-106), un medio de cultivo esporulante. Para preparar un litro de CCY, se

## ES 2 203 310 B1

añaden los componentes del tampón del medio (solución 1) y los componentes de la fuente de carbono (solución 2). Se completa hasta un litro con agua destilada y se esteriliza en autoclave. El medio esterilizado se completa con 1 ml de la solución acuosa de sales (solución 3) previamente esterilizada por filtración.

5	Solución 1. Tampón del medio 2, Ph 7 (500 ml)	
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,026 M
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,052 M
10	Solución 2. 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
15	Glicerina	6 ml
	Agua destilada	hasta 100 ml
	Solución 3. Solución acuosa de sales (1 ml)	
20	ZnCl <sub>2</sub>	0,05 M
	MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0,5 M
	MnCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0,01 M
	CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0,2 M
	FeCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0,05 M
25	HCl fumante	1%

En el medio de cultivo esporulante se inoculan 100 ml de una suspensión de esporas y cristales previamente tratadas. Este tratamiento consiste en calentar la suspensión a 70°C, durante 30 min, y tiene como objetivo eliminar las células vegetativas y que las esporas germinen sincronizadamente. El cultivo se incuba a una temperatura de entre 28 y 30°C, con agitación, durante aproximadamente 72 h. Para determinar el final del proceso de la fermentación, se toman alícuotas del cultivo y mediante la inspección al microscopio óptico de contraste de fases, se comprueba que alrededor del 90% de las células esporuladas ya han lisado y liberado al medio las esporas y los cristales. Para purificar las esporas y cristales del cultivo ya lisado se centrifuga y se lava el sedimento obtenido con un 10% del volumen inicial de NaCl 1M / EDTA 10 mM para inactivar las proteasas que pudiesen degradar los cristales. Se centrifuga de nuevo y el precipitado se puede liofilizar y guardar a 4°C o a temperatura ambiente, hasta el momento de su formulación, o bien resuspender en una solución de KCl 10 mM (10 ml/l cultivo inicial) y mantenerlo a -20°C.

### Ejemplo 7

*Determinación del peso molecular de las proteínas que componen el cristal de la cepa HU04-2 (Laemmli (1970) (Nature 227: 680-685)*

La determinación del peso molecular de las proteínas que componen los cristales se realiza mediante una electroforesis en un gel de dodecil sulfato sódico y poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes. Debido a que se obtiene una mezcla de esporas y cristales (ejemplo 6), éstos han de ser previamente purificados. La purificación puede ser realizada mediante varios métodos, incluido el método de gradiente discontinuo de Thomas y Ellar, 1983 (*J. Cell Sci.* 60: 181-197). Tras la purificación, se calienta a 100°C durante 5 min un tubo de 1,5 ml que contiene 10 µl de proteína (los cristales purificados o el marcador de peso molecular de New England Biolabs) y 5 µl de una mezcla formada por 30x Reducing Agent (1/10 del volumen) y 3x SDS Sample Buffer (1 volumen) de New England Biolabs. Se cargan en gel de dodecil sulfato sódico-poliacrilamida al 10% (100:1 acrilamida/bis acrilamida) durante 1h a 36 mA y transcurrida la carrera, el gel se tiñe durante 40 minutos 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 y se destiñe en una solución 6,75% (v/v) de ácido acético glacial y 9,45% (v/v) de etanol.

### Ejemplo 8

*Ensayo de toxicidad, en hojas de lechuga, con la mezcla de cristales y esporas de la cepa HU04-2 y larvas de H. Armigera, S. Exigua, S. Littoralis y S. Frugiperda*

Para realizar los ensayos de toxicidad, se requiere la materia activa de la cepa, obtenida como se describe en el ejemplo 6, discos de lechuga de 0,5 cm de diámetro y larvas neonatas de las cuatro especies de lepidópteros. Con la materia activa se prepara, por dilución, una serie de cinco concentraciones de cristales y esporas, que constituyen términos de una progresión geométrica cuya razón es un factor de dilución de entre 3 y 5, los cuales llevan incorporado un agente mojante. Los discos de lechuga se sumergen en estas soluciones acuosas y se dejan secar al aire. Una vez secos, se colocan en pocillos individuales de 4 cm<sup>2</sup> (placas Sterilin, de 25 pocillos) cuyo fondo está recubierto con una delgada capa de agar al 3% en agua que mantiene fresca la lechuga. A cada pocillo, se transfiere una larva neonata.

## ES 2 203 310 B1

En el bioensayo, se utilizan un total de 20 a 25 larvas por cada una de las concentraciones evaluadas. Las placas con los insectos se mantienen a 25°C, 70% de HR y un fotoperíodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad. La mortalidad se registra a los 2 días.

### 5 Ejemplo 9

*Potencia insecticida, en hojas de lechuga, de la mezcla de cristales y esporas de la cepa HU04-2 frente a diferentes lepidópteros plaga*

10 El cálculo de la potencia insecticida de la suspensión de esporas y cristales de la cepa HU04-2 se realiza a partir de los datos de mortalidad obtenidos en el ejemplo 8. Como productos de referencia se utilizan una mezcla de esporas y cristales de la cepa *B. thuringiensis* HD-1, y la cepa aislada del producto comercial Xentari(c). La cepa HD-1 (*B. thuringiensis ser. kurstaki*) es la referencia internacional para muchas especies de lepidópteros y, además, la materia activa de varios productos comerciales, como Dipel(r) 2x (Abbot). Esta cepa se utiliza como referencia en bioensayos  
15 realizados contra *H. armigera*, entre otros lepidópteros. La cepa aislada del producto comercial Xentari(c) se utiliza como referencia en los bioensayos contra lepidópteros del género *Spodoptera*. Los datos se analizan mediante el programa estadístico POLO-PC (LeOra software, 1987, Berkeley, CA.) para determinar la LC<sub>50</sub>, es decir, los valores de concentración de cristales y esporas que producen la muerte al 50% de los insectos expuestos durante el tiempo que dura el bioensayo. Los valores de la LC<sub>50</sub> se dan en UA<sub>600</sub> (unidades de absorbancia a la longitud de onda de 600 nm),  
20 que es una medida directamente proporcional a la concentración de cristales y esporas en la suspensión evaluada.

25	Especie de insecto	LC <sub>50</sub> (UA <sub>600</sub> )		
		HU04-2	HD-1	Xentari
	<i>H. armigera</i>	5.11	2.35	ND
	<i>S. exigua</i>	3.38	ND	2.19
	<i>S. littoralis</i>	2.64	ND	1.94
30	<i>S. frugiperda</i>	2.22	ND	1.34

ND: no determinado.

### 35 Breve explicación de las figuras

Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa (0,5%, 1xTBE) donde se compara el ADN plasmídico de HU04-2 (carril 2) con el de las cepas estándar de *B. thuringiensis*: HD-1 del producto comercial Dipel(r) (carril 1), *israelensis* del patrón IPS82 (carril 3), y la cepa berliner 1715 (carril 4).  
40

Figura 2. Electroforesis en un gel de dodecil sulfato sódico y poliacrilamida al 10% (100:1 acrilamida/bis acrilamida) de cristales purificados de HU04-2 (carril 2) y de las cepas obtenidas de los biopesticidas comercial es Dipel(r) (carril 3) y Xentari(r) (carril 4). El peso molecular de las proteínas incluidas en el marcador proteico (carril 1) se da a la izquierda.  
45

Figura 3. Mapa del vector de clonación pGEM-T (Promega). Los productos de PCR se clonaron entre dos timinas (T) que rompen la ORF del gen lacZ como se aprecia en la figura.  
50

55

60

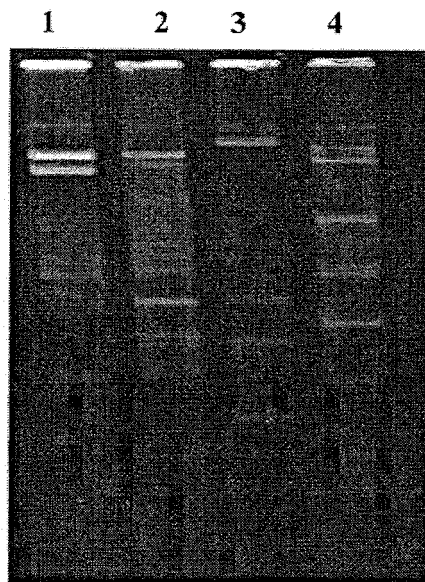
65

# ES 2 203 310 B1

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Secuencia de ADN recombinante de uso en clonación de ADN en microorganismos, particularmente bacterias y células vegetales, que comprende una secuencia de ADN seleccionada entre:
- 10 a) SEQ ID NO:18 que codifica para una proteína como la representada por SEQ ID NO:19 con función insecticida particularmente frente a lepidópteros
  - 15 b) Secuencias de ADN capaces de codificar para una proteína como la representada por SEQ ID NO:19 con función insecticida particularmente frente a lepidópteros
  - c) Secuencias de ADN capaces de hibridar con las secuencias complementarias respectivas de a) o b) y que son capaces de codificar para una proteína como la representada por SEQ ID NO:19 con función insecticida particularmente frente a lepidópteros
  - 20 d) Secuencias de ADN que deriven de SEQ ID NO:18 debido a la degeneración del código genético y que sean capaces de codificar para una proteína como la representada por SEQ ID NO:19 con función insecticida particularmente frente a lepidópteros.
2. Formulación insecticida que comprenda cualquier microorganismo que contenga en su genoma cualquiera de las secuencias de ADN recombinante de la reivindicación 1 o esporas de los mismos, que contengan las proteínas con función insecticida codificadas por dichas secuencias.
- 25 3. Formulación insecticida, de acuerdo con la reivindicación 2, **caracterizada** porque el microorganismo es *Bacillus thuringiensis*.
4. Formulación insecticida, de acuerdo con la reivindicación 3, **caracterizada** porque el microorganismo es una cepa pura de *Bacillus thuringiensis* CECT5950.
- 30 5. Formulación insecticida que contenga la proteína representada como SEQ ID NO:19.
6. Formulación insecticida, de acuerdo con la reivindicación 5, **caracterizada** porque la proteína se encuentra en forma de cristales.
- 35 7. Formulación insecticida de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, **caracterizada** por comprender además la proteína representada como SEQ ID NO:19, particularmente en forma de cristales.
- 40 8. Método de control de plagas de insectos, particularmente lepidópteros, **caracterizado** por poner en contacto dichos insectos o el ambiente donde se encuentran con una cantidad efectiva de al menos una de las formulaciones de las reivindicaciones 2 a 7.
- 45 9. Método de control de plagas de insectos, particularmente lepidópteros, **caracterizado** por clonar cualquiera de las secuencias de ADN de la reivindicación 1 en las células de una planta susceptible de ser infectada por dicha plaga.
- 50
- 55
- 60
- 65





**FIGURA 1**

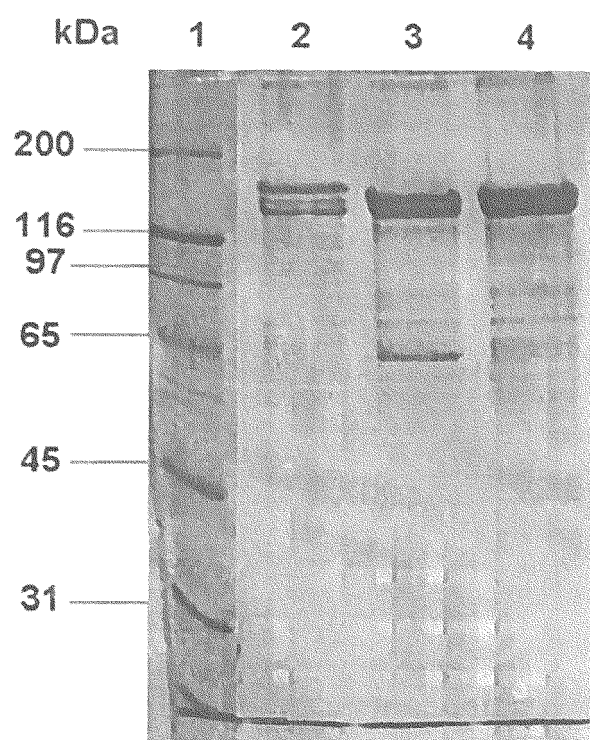


FIGURA 2

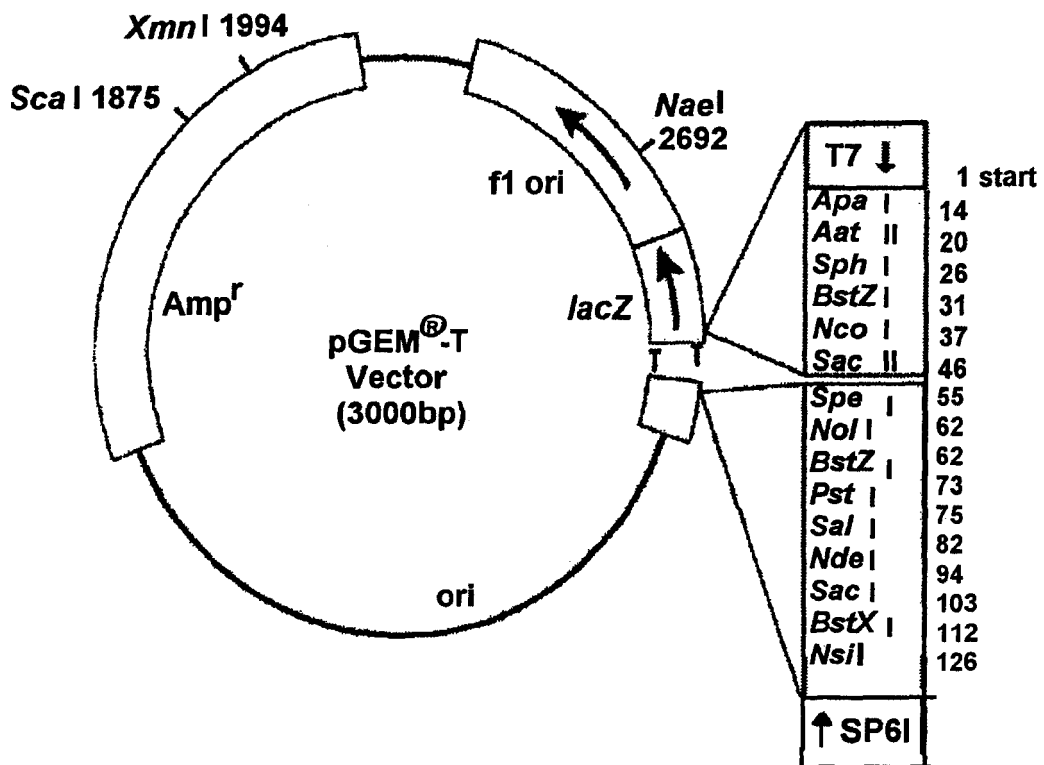


FIGURA 3

# ES 2 203 310 B1

## LISTA DE SECUENCIAS

5	<110> UNIVERSIDAD PÚBLICA DE NAVARRA	
	<120> “NUEVA CEPA DE <i>BACILLUS THURINGIENSIS</i> CON MÚLTIPLES GENES <i>CRY</i> TÓXICA CONTRA LE- PIDÓPTEROS PLACA”	
	<130> P-99719	
10	<160> 19	
	<210> SEQ ID NO.: 1	
	<211> 20	
15	<212> polinucleótido	
	<213> secuencia artificial	
	<220> cebador I(-)	
	<223> reconoce genes <i>cryI</i>	
20	<400>	
	MDATYTCTAK RTCTTGACTA	20
25	<210> SEQ ID NO.: 2	
	<211> 20	
	<212> polinucleótido	
30	<213> secuencia artificial	
	<220> cebador IAa	
	<223> reconoce gen <i>cryIAa</i>	
35	<400>	
	TTCCCTITAT TTGGGAATGC	20
40	<210> SEQ ID NO.: 3	
	<211> 20	
	<212> polinucleótido	
45	<213> secuencia artificial	
	<220> cebador IAb	
	<223> reconoce gen <i>cryIAb</i>	
50	<400>	
	CGGATGCTCA TAGAGGAGAA	20
55	<210> SEQ ID NO.: 4	
	<211> 20	
	<212> polinucleótido	
	<213> secuencia artificial	
60	<220> cebador IAc	
	<223> reconoce gen <i>cryIAc</i>	
	<400>	
65	GGAAACTTTC TTTTAAATGG	20

## ES 2 203 310 B1

	<210> SEQ ID NO.: 5	
	<211> 20	
	<212> polinucleótido	
5	<213> secuencia artificial	
	<220> cebador IAd	
	<223> reconoce gen <i>cryIAd</i>	
10	<400>	
	ACCCG TACTG ATCTCAACTA	20
15	<210> SEQ ID NO.: 6	
	<211> 21	
	<212> polinucleótido	
20	<213> secuencia artificial	
	<220> cebador IB	
	<223> reconoce gen <i>cryIB</i>	
25	<400>	
	GGCTACCAAT ACTTTCTATT A	21
30	<210> SEQ ID NO.: 7	
	<211> 20	
	<212> polinucleótido	
	<213> secuencia artificial	
35	<220> cebador IC	
	<223> reconoce gen <i>cryIC</i>	
40	<400>	
	ATTTAATTTA CGTGGTGTG	20
45	<210> SEQ ID NO.: 8	
	<211> 20	
	<212> polinucleótido	
	<213> secuencia artificial	
50	<220> cebador ID	
	<223> reconoce gen <i>cryID</i>	
55	<400>	
	CAGGCCTTGA CAATTCAAAT	20
60	<210> SEQ ID NO.: 9	
	<211> 20	
	<212> polinucleótido	
	<213> secuencia artificial	
65	<220> cebador IE	
	<223> reconoce gen <i>cryIE</i>	

## ES 2 203 310 B1

	<400>		
	TAGGGATAAA TGTAGTACAG		20
5	<210> SEQ ID NO.: 10		
	<211> 20		
	<212> polinucleótido		
10	<213> secuencia artificial		
	<220> cebador IF		
	<223> reconoce gen <i>cryIF</i>		
15	<400>		
	GATTCAGGA AGTGATTCAT		20
20	<210> SEQ ID NO.: 11		
	<211> 20		
	<212> polinucleótido		
	<213> secuencia artificial		
25	<220> cebador IG		
	<223> reconoce gen <i>cryIG</i>		
30	<400>		
	GGTTCTCAAA GATCCGTGTA		20
35	<210> SEQ ID NO.: 12		
	<211> 25		
	<212> polinucleótido		
	<213> secuencia artificial		
40	<220> cebador 1I(98)Fw		
	<223> reconoce gen <i>cryII</i>		
	<400>		
45	CACTAAAAAA TGAAACAGAT ATAGA		25
	<210> SEQ ID NO.: 13		
50	<211> 25		
	<212> polinucleótido		
	<213> secuencia artificial		
	<220> cebador 1I(98)Rv		
55	<223> reconoce gen <i>cryII</i>		
	<400>		
60	CCACATATTC ATATACTGAG TGRTT		25
	<210> SEQ ID NO.: 14		
	<211> 25		
65	<212> polinucleótido		
	<213> secuencia artificial		

## ES 2 203 310 B1

<220> cebador MUTFw  
<223> reconoce gen *cryII*  
<220> sitio restricción  
5 <222> 3-8  
<223> NheI  
  
<400>  
10 GGGCTAGCAT GAAACTAAAG AATCC 25  
  
<210> SEQ ID NO.: 15  
15 <211> 22  
<212> polinucleótido  
<213> secuencia artificial  
<220> cebador II(E)Rv  
20 <223> reconoce gen *cryII*  
  
<400>  
25 AGCATACAAT TAAATTTTCAT CC 22  
  
<210> SEQ ID NO.: 16  
30 <211> 20  
<212> polinucleótido  
<213> secuencia artificial  
<220> cebador II (+)  
35 <223> reconoce genes *cry2*  
  
<400>  
40 AACTCCATCG TTATTTGTAG 20  
  
<210> SEQ ID NO.: 17  
<211> 19  
45 <212> polinucleótido  
<213> secuencia artificial  
<220> cebador II(-)  
<223> reconoce genes *cry2*  
50  
  
<400>  
55 TAAAGAAAGT GGGGATCTT 19  
  
<210> SEQ ID NO.: 18  
<211> 2160  
<212> ADN  
60 <213> *Bacillus Thuringiensis*  
<220>  
<221> ORF  
65 <222> 1-2160  
<223> gen *cryIIa7*

# ES 2 203 310 B1

<400>

	ATG AAA CTA AAG AAT CCA GAT AAG CAT CAA AGT TTT TCT AGC AAT GCG AAA GTA GAT AAA	60
	ATC TCT ACG GAT TCA CTA AAA AAT GAA ACA GAT ATA GAA TTA CAA AAC ATT AAT CAT GAA	120
5	GAT TGT TTG AAA ATA TCT GAG TAT GAA AAT GTA GAG CCG TTT GTT AGT GCA TCA ACA ATT	180
	CAA ACA GGT ATT AGT ATT GCG GGT AAA ATA CTT GGC ACC CTA GGC GTT CCT TTT GCA GGA	240
	CAA GTA GCT AGT CTT TAT AGT TTT ATC TTA GGT GAG CTA TGG CCT AAG GGG AAA AAT CAA	300
	TGG GAA ATC TTT ATG GAA CAT GTA GAA GAG ATT ATT AAT CAA AAA ATA TCA ACT TAT GCA	360
	AGA AAT AAA GCA CTT ACA GAC TTG AAA GGA TTA GGA GAT GCC TTA GCT GTC TAC CAT GAA	420
10	TCG CTT GAA AGT TGG GTT GGA AAT CGT AAG AAC ACA AGG GCT AGG AGT GTT GTC AAG AGC	480
	CAA TAT ATC GCA TTA GAA TTG ATG TTC GTT CAG AAA CTA CCT TCT TTT GCA GTG TCT GGA	540
	GAG GAG GTA CCA TTA TTA CCG ATA TAT GCC CAA GCT GCA AAT TTA CAT TTG TTG CTA TTA	600
	AGA GAT GCA TCT ATT TTT GGA AAA GAG TGG GGA TTA TCA TCT TCA GAA ATT TCA ACA TTT	660
	TAT AAC CGT CAA GTC GAA CGA GCA GGA GAT TAT TCC GAC CAT TGT GTG AAA TGG TAT AGT	720
	ACA GGT CTA AAT AAC TTG AGG GGT ACA AAT GCC GAA AGC TGG GTT CGT TAT AAT CAA TTT	780
15	CGT AAA GAT ATG ACA TTA ATG GTA CTT GAT TTA GTC GCA CTA TTC CCA AGC TAT GAT ACA	840
	CTT GTA TAT CCA ATT AAA ACT ACT TCT CAA CTT ACA AGA GAA GTA TAT ACA GAC GCA ATT	900
	GGG ACA GTA CAT CCG AAT GCA AGT TTT GCA AGT ACG ACT TGG TAT AAT AAT AAT GCC CCT	960
	TCG TTC TCT ACC ATA GAG TCT GCT GTT GTT CGA AAC CCG CAT CTA CTC GAT TTT CTA GAA	1020
	CAA GTT ACA ATT TAC AGC TTA TTA AGT AGG TGG AGT AAC ACT CAG TAT ATG AAT ATG TGG	1080
20	GGA GGA CAT AGA CTT GAA TTC CGA ACA ATC GGA GGA ATG TTA AAT ACC TCA ACA CAA GGA	1140
	TCT ACT AAT ACT TCT ATT AAT CCT GTA ACA TTA CCG TTC ACG TCT CGA GAC GTC TAT AGG	1200
	ACT GAA TCA TTG GCA GGG CTG AAT CTA TTT TTA ACT CAA CCT GTT AAT GGA GTA CCT AGG	1260
	GTT GAT TTT CAT TGG AAA TTC GTC ACA CAT CCG ATC GCA TCT GAT AAT TTC TAT TAT CCA	1320
	GGG TAT GCT GGA ATT GGG ACG CAA TTA CAA GAT TCA GAA AAT GAA TTA CCA CCT GAA ACA	1380
25	ACA GGA CAG CCA AAT TAT GAA TCA TAT AGT CAT AGA TTA TCT CAT ATA GGA CTC ATT TCA	1440
	GCA TCC CAT GTG AAA GCA TTG GTA TAT TCT TGG ACG CAT CGT AGT GCA GAT CGT ACA AAT	1500
	ACA ATT GAG CCA AAT AGC ATT ACA CAA ATA CCA TTA GTA AAA GCG TTC AAT CTG TCT TCA	1560
	GGT GCC GCT GTT GTG AGA GGA CCA GGA TTT ACA GGT GGG GAT ATC CTT CGA AGA ACG AAT	1620
	ACT GGT ACA TTT GGG GAT ATA CGA GTA AAT ATT AAT CCA CCA TTT GCA CAA AGG TAT CGC	1680
	GTA AGG ATT CGC TAT GCT TCT ACT ACA GAT ATA CAA TTC CAT ACG TCA ATT AAC GGT AAA	1740
30	GCT ATT AAT CAA GGT AAT TTT TCA GCA ACT ATG AAT AGA GGA GAG GAC TTA GAC TAT AAA	1800
	ACC TTT AGA ACT GTA GGC TTT ACC ACT CCA TTT AGC TTT TCA GAT GTA CAA AGT ACA TTC	1860
	ACA ATA GGT GCT TGG AAC TTC TCT TCA GGT AAC GAA GTT TAT ATA GAT AGA ATT GAA TTT	1920
	GTT CCG GTA GAA GTA ACA TAT GAG GCA GAA TAT GAT TTT GAA AAA GCG CAA GAG AAG GTT	1980
	ACT GCA CTG TTT ACA TCT ACG AAT CCA GGT GGG TTA AAA ACA AAT GTA ACG GAG TAT CAT	2040
	ATT GAC CAG GTA TCA AAT TTA GTA GAG TCT TTA TCA AAT GAA TTC TAT CTC GAT GAA AAG	2100
35	AGA GAA TTA TTC GAG ATA GTT AAA TAC GCG AAG CAA CTC CAT ACT GGG CGT AAC ATG TAG	2160

<210> SEQ ID NO.: 19

<211> 719

40 <212> proteína

<213> *Bacillus Thuringiensis*

<220>

45 <223> Secuencia de aminoácidos codificada por el gen *cryIIa7*

50

55

60

65



# ES 2 203 310 B1

<400>

	Met	Lys	Leu	Lys	Asn	Pro	Asp	Lys	His	Gln	Ser	Phe	Ser	Ser	Asn	Ala	Lys	Val	Asp	Lys
					5					10					15					20
5	Ile	Ser	Thr	Asp	Ser	Leu	Lys	Asn	Glu	Thr	Asp	Ile	Glu	Leu	Gln	Asn	Ile	Asn	His	Glu
					25					30					35					40
	Asp	Cys	Leu	Lys	Ile	Ser	Glu	Tyr	Glu	Asn	Val	Glu	Pro	Phe	Val	Ser	Ala	Ser	Thr	Ile
					45					50					55					60
10	Gln	Thr	Gly	Ile	Ser	Ile	Ala	Gly	Lys	Ile	Leu	Gly	Thr	Leu	Gly	Val	Pro	Phe	Ala	Gly
					65					70					75					80
	Gln	Val	Ala	Ser	Leu	Tyr	Ser	Phe	Ile	Leu	Gly	Glu	Leu	Trp	Pro	Lys	Gly	Lys	Asn	Gln
					85					90					95					100
	Trp	Glu	Ile	Phe	Met	Glu	His	Val	Glu	Glu	Ile	Ile	Asn	Gln	Lys	Ile	Ser	Thr	Tyr	Ala
					105					110					115					120
15	Arg	Asn	Lys	Ala	Leu	Thr	Asp	Leu	Lys	Gly	Leu	Gly	Asp	Ala	Leu	Ala	Val	Tyr	His	Glu
					125					130					135					140
	Ser	Leu	Glu	Ser	Trp	Val	Gly	Asn	Arg	Lys	Asn	Thr	Arg	Ala	Arg	Ser	Val	Val	Lys	Ser
					145					150					155					160
	Gln	Tyr	Ile	Ala	Leu	Glu	Leu	Met	Phe	Val	Gln	Lys	Leu	Pro	Ser	Phe	Ala	Val	Ser	Gly
					165					170					175					180
20	Glu	Glu	Val	Pro	Leu	Leu	Pro	Ile	Tyr	Ala	Gln	Ala	Ala	Asn	Leu	His	Leu	Leu	Leu	Leu
					185					190					195					200
	Arg	Asp	Ala	Ser	Ile	Phe	Gly	Lys	Glu	Trp	Gly	Leu	Ser	Ser	Ser	Glu	Ile	Ser	Thr	Phe
					205					210					215					220
	Tyr	Asn	Arg	Gln	Val	Glu	Arg	Ala	Gly	Asp	Tyr	Ser	Asp	His	Cys	Val	Lys	Trp	Tyr	Ser
25					225					230					235					240
	Thr	Gly	Leu	Asn	Asn	Leu	Arg	Gly	Thr	Asn	Ala	Glu	Ser	Trp	Val	Arg	Tyr	Asn	Gln	Phe
					245					250					255					260
	Arg	Lys	Asp	Met	Thr	Leu	Met	Val	Leu	Asp	Leu	Val	Ala	Leu	Phe	Pro	Ser	Tyr	Asp	Thr
					265					270					275					280
30	Leu	Val	Tyr	Pro	Ile	Lys	Thr	Thr	Ser	Gln	Leu	Thr	Arg	Glu	Val	Tyr	Thr	Asp	Ala	Ile
					285					290					295					300
	Gly	Thr	Val	His	Pro	Asn	Ala	Ser	Phe	Ala	Ser	Thr	Thr	Trp	Tyr	Asn	Asn	Asn	Ala	Pro
					305					310					315					320
	Ser	Phe	Ser	Thr	Ile	Glu	Ser	Ala	Val	Val	Arg	Asn	Pro	His	Leu	Leu	Asp	Phe	Leu	Glu
					325					330					335					340
35	Gln	Val	Thr	Ile	Tyr	Ser	Leu	Leu	Ser	Arg	Trp	Ser	Asn	Thr	Gln	Tyr	Met	Asn	Met	Trp
					345					350					355					360
	Gly	Gly	His	Arg	Leu	Glu	Phe	Arg	Thr	Ile	Gly	Gly	Met	Leu	Asn	Thr	Ser	Thr	Gln	Gly
					365					370					375					380
	Ser	Thr	Asn	Thr	Ser	Ile	Asn	Pro	Val	Thr	Leu	Pro	Phe	Thr	Ser	Arg	Asp	Val	Tyr	Arg
					385					390					395					400
40	Thr	Glu	Ser	Leu	Ala	Gly	Leu	Asn	Leu	Phe	Leu	Thr	Gln	Pro	Val	Asn	Gly	Val	Pro	Arg
					405					410					415					420
	Val	Asp	Phe	His	Trp	Lys	Phe	Val	Thr	His	Pro	Ile	Ala	Ser	Asp	Asn	Phe	Tyr	Tyr	Pro
					425					430					435					440
45	Gly	Tyr	Ala	Gly	Ile	Gly	Thr	Gln	Leu	Gln	Asp	Ser	Glu	Asn	Glu	Leu	Pro	Pro	Glu	Thr
					445					450					455					460
	Thr	Gly	Gln	Pro	Asn	Tyr	Glu	Ser	Tyr	Ser	His	Arg	Leu	Ser	His	Ile	Gly	Leu	Ile	Ser
					465					470					475					480
	Ala	Ser	His	Val	Lys	Ala	Leu	Val	Tyr	Ser	Trp	Thr	His	Arg	Ser	Ala	Asp	Arg	Thr	Asn
					485					490					495					500
50	Thr	Ile	Glu	Pro	Asn	Ser	Ile	Thr	Gln	Ile	Pro	Leu	Val	Lys	Ala	Phe	Asn	Leu	Ser	Ser
					505					510					515					520
	Gly	Ala	Ala	Val	Val	Arg	Gly	Pro	Gly	Phe	Thr	Gly	Gly	Asp	Ile	Leu	Arg	Arg	Thr	Asn
					525					530					535					540
	Thr	Gly	Thr	Phe	Gly	Asp	Ile	Arg	Val	Asn	Ile	Asn	Pro	Pro	Phe	Ala	Gln	Arg	Tyr	Arg
					545					550					555					560
55	Val	Arg	Ile	Arg	Tyr	Ala	Ser	Thr	Thr	Asp	Ile	Gln	Phe	His	Thr	Ser	Ile	Asn	Gly	Lys
					565					570					575					580
	Ala	Ile	Asn	Gln	Gly	Asn	Phe	Ser	Ala	Thr	Met	Asn	Arg	Gly	Glu	Asp	Leu	Asp	Tyr	Lys
					585					590					595					600

60

65

# ES 2 203 310 B1

	Thr	Phe	Arg	Thr	Val	Gly	Phe	Thr	Thr	Pro	Phe	Ser	Phe	Ser	Asp	Val	Gln	Ser	Thr	Phe
					605					610					615					620
5	Thr	Ile	Gly	Ala	Trp	Asn	Phe	Ser	Ser	Gly	Asn	Glu	Val	Tyr	Ile	Asp	Arg	Ile	Glu	Phe
					625					630					635					640
	Val	Pro	Val	Glu	Val	Thr	Tyr	Glu	Ala	Glu	Tyr	Asp	Phe	Glu	Lys	Ala	Gln	Glu	Lys	Val
					645					650					655					660
	Thr	Ala	Leu	Phe	Thr	Ser	Thr	Asn	Pro	Gly	Gly	Leu	Lys	Thr	Asn	Val	Thr	Glu	Tyr	His
					665					670					675					680
10	Ile	Asp	Gln	Val	Ser	Asn	Leu	Val	Glu	Ser	Leu	Ser	Asn	Glu	Phe	Tyr	Leu	Asp	Glu	Lys
					685					690					695					700
	Arg	Glu	Leu	Phe	Glu	Ile	Val	Lys	Tyr	Ala	Lys	Gln	Leu	His	Thr	Gly	Arg	Asn	Met	
					705					710					715					

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 203 310

② Nº de solicitud: 200102916

③ Fecha de presentación de la solicitud: 28.12.2001

④ Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.7: C12N 15/31, A01N 63/00

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	PORCAR, M. et al. "Host range and gene contents of Bacillus thuringiensis strains toxic towards Spodoptera exigua", ENTOMOLOGIA EXPERIMENTALIS ET APPLICATA, 2000, Vol. 97, páginas 339-346, todo el documento.	1-9
A	PORCAR, M. et al. "Molecular and insecticidal characterization of a Bacillus thuringiensis strain isolated during a natural epizootic", JOURNAL OF APPLIED MICROBIOLOGY, 2000, Vol. 89, páginas 309-316, todo el documento.	1-9
A	CRICKMORE, N. et al. Revision of the nomenclature for the Bacillus thuringiensis pesticidal crystal proteins", MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS, 1998, Vol. 62, Nº 3, páginas 807-813, todo el documento.	1-9

#### 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

10.03.2004

Examinador

J.L. Vizán Arroyo

Página

1/1