



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 301 352**

⑫ Número de solicitud: 200601065

⑮ Int. Cl.:
C12N 7/01 (2006.01)
A01N 63/00 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **26.04.2006**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **16.06.2008**

⑭ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
16.06.2008

⑰ Solicitante/s: **Universidad Pública de Navarra
Campus de Arrosadía, s/n
(OTRI) Edificio El Sario
31006 Pamplona, Navarra, ES**

⑱ Inventor/es: **Caballero Murillo, Primitivo;
Williams, Trevor;
Muñoz Labiano, Delia;
Murillo Pérez, Rosa y
Lasa Covarrubias, Rodrigo**

⑳ Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

② Título: **Nuevos genotipos del nucleopoliedrovirus de *Spodoptera exigua* y uso de los mismos en el control de las plagas producidas por este insecto.**

③ Resumen:

Nuevos genotipos del nucleopoliedrovirus de *Spodoptera exigua* y uso de los mismos en el control de las plagas producidas por este insecto.

La invención se refiere a seis nuevos genotipos del nucleopoliedrovirus múltiple de *Spodoptera exigua* denominados AIPstM0935, AIPstM1400, AIPstM1033, AIPstM1449, AIPstM0923, y AIPstM0657 y su uso, preferentemente como mezcla de dos o más genotipos, dentro de composiciones insecticidas contra plagas producidas por *Spodoptera exigua*. Una forma preferida de realización de la invención es añadir a estas composiciones abrillantadores ópticos, potenciando así su capacidad insecticida. La invención describe también un método de producción de poliedros del virus inoculando larvas de *Spodoptera exigua*, preferiblemente tratadas previamente con un análogo de la hormona juvenil de este lepidóptero. Las composiciones insecticidas de la invención representan una tecnología limpia y segura, al no dejar residuos tóxicos sobre las cosechas ni ser tóxicas para el hombre ni otros animales, incluidos parasitoides y depredadores de plagas.

ES 2 301 352 A1

DESCRIPCIÓN

Nuevos genotipos del nucleopoliedrovirus de *Spodoptera exigua* y uso de los mismos en el control de las plagas producidas por este insecto.

Ámbito de la invención

La invención se adscribe al sector técnico de los plaguicidas biológicos de aplicación al control de plagas provocadas por las larvas del lepidóptero *Spodoptera exigua*, mediante el uso de nuevos genotipos de nucleopoliedrovirus.

Estado de la técnica

Problemática fitosanitaria en los invernaderos: control de Spodoptera exigua

Alguno de los principales cultivos producidos en invernadero, por producción y valor de la misma, son pimiento, tomate, sandía, melón, calabacín, pepino, judía y berenjena. La problemática fitosanitaria asociada a estos cultivos es bastante amplia concurriendo en ellos plagas, incluyendo larvas del lepidóptero *Spodoptera exigua* (Moreno, R. *et al.* 1992; Belda, J. *et al.* 1994). El control de *S. exigua* en los invernaderos se realiza por medio de la aplicación de plaguicidas químicos. Sin embargo, la utilización sistemática de estos insecticidas no funciona con la eficacia esperada a causa de graves problemas de resistencias en esta plaga (Cuadrado Gómez I.M. y Viñuela Sandoval, E. 1998). Adicionalmente, el control químico de *S. exigua* conlleva problemas relacionados con los niveles de residuos de plaguicidas que deben ser mantenidos por debajo de los límites máximos de residuos, siguiendo las regulaciones establecidas para frutas y hortalizas en la Unión Europea (http://europa.eu.int/comen/food/fvo/specialreports/pesticides_index_en.htm).

Los Baculovirus como insecticidas biológicos

La familia *Baculoviridae* agrupa a virus de DNA de doble cadena cuyos viriones están característicamente incluidos en una matriz cristalina de naturaleza proteica, de 3 a 15 de diámetro, en la que puede estar incluido un alto número de partículas virales y a la que se hace referencia en la presente memoria con el nombre de cuerpo de oclusión (abreviados "OB", del inglés "*occlusion body*") o también, debido a su forma geométrica, con el nombre de poliedro. A efectos también de la presente memoria, el término virión se define como la partícula viral formada por una o más moléculas circulares de ADN de doble hebra empaquetadas individualmente en una cápsida proteica y envueltas por una membrana lipoproteica de estructura laminar. La familia consta de los géneros *Nucleopoliedrovirus* (NPV) y *Granulovirus* (GV); la mayoría de los cuales han sido aislados de lepidópteros (Caballero, P. *et al.* 2001). Los virus de esta familia se caracterizan por tener un estrecho espectro de huéspedes y una elevada patogenicidad y virulencia. El poliedro que los caracteriza los hace estables durante largos periodos (Jaques, R. P. 1985) y facilita su aplicación mediante pulverizaciones acuosas convencionales. Además, el uso insecticida de los baculovirus, debido a su estrecho espectro de huéspedes (Gröner, A. 1986) y a la ausencia de otros posibles efectos perjudiciales, no entraña riesgos ambientales mayores.

El estado susceptible del lepidóptero es el de la larva que es infectada al alimentarse de un sustrato vegetal contaminado con poliedros del virus. Al final del proceso infeccioso, que se completa entre tres y ocho días, la larva muere y el tegumento se degrada liberando grandes cantidades de poliedros que contaminan las plantas, los cuales constituyen el inóculo que sirve para dar origen al proceso de infección en otras larvas susceptibles.

La utilidad y efectividad de los baculovirus para el control de las plagas han sido ampliamente demostradas (Moscardi, F. 1999). Se sabe que, en general, la actividad insecticida del virus (medida en términos de la dosis letal media, DL_{50}) cambia en función del estadio larvario, siendo el virus más activo, en general, para las larvas más jóvenes (las de los primeros estadios) y disminuyendo su actividad (aumenta el valor de la DL_{50}) a medida que aumenta el tamaño de la larva. Actualmente hay comercializados más de treinta bioinsecticidas basados en baculovirus contra algunas de las plagas más importantes en el ámbito mundial entre las que se incluye *S. exigua*. Los bioinsecticidas basados en baculovirus, dadas sus características, son agentes de control ideales para su inclusión en programas de control integrado y su acción insecticida es especialmente útil: (i) contra aquellas especies fitófagas que han desarrollado resistencia múltiple o cruzada a los insecticidas químicos de síntesis y (ii) en los programas de control donde se incluyen agentes biológicos de control susceptibles a la acción de los insecticidas químicos (Hunter-Fujita *et al.*, 1998).

El nucleopoliedrovirus de S. exigua: selección de una materia activa adecuada

Con frecuencia se encuentra que los distintos aislados de un mismo baculovirus difieren significativamente en sus propiedades insecticidas para un mismo insecto. Por tanto, la selección de la variante más efectiva para una determinada especie fitófaga es un importante elemento a la hora de desarrollar un bioinsecticida. El nucleopoliedrovirus múltiple de *Spodoptera exigua* (al que se hace referencia también en la presente memoria mediante sus correspondientes siglas en inglés SeMNVPV) es un virus de la familia *Baculoviridae*, capaz de infectar y matar larvas del lepidóptero *Spodoptera exigua*, que se ha aislado en diferentes regiones del mundo incluyendo Norte América, Tailandia, Países Bajos, Taiwán, India, Egipto y Japón (Hara K. *et al.* 1995). Este virus también se ha aislado en España, donde provoca epizootias naturales en poblaciones de *S. exigua* en girasol y en los cultivos hortícolas de los invernaderos de Almería (Caballero P. *et al.* 1992). La eficiencia de preparados simples de algunos aislados de SeMNVPV ha resultado igual o

mejor que el grado de control logrado por aplicación de insecticidas químicos de síntesis (Kolodny-Hirsch, D. M., *et al.* 1997).

Un aislado del SeMNPV originario de Florida, USA, se ha desarrollado como un producto comercial registrado bajo el nombre de Spod-X® en Holanda, Estados Unidos y Tailandia (Smits, P. H. y Vlak, J. M. 1994). El producto se utiliza en los invernaderos de los Países Bajos en cultivos de plantas ornamentales. Actualmente el virus es comercializado por la empresa Certis USA (<http://www.certisusa.com/products/viruses.html>). Sin embargo, este producto presenta importantes problemas relacionados con su efectividad: la calidad biológica del producto está afectada por la presencia de genotipos autoparásitos que reducen la capacidad insecticida del virus (Muñoz, D. *et al.*, 1998). Los genotipos autoparásitos se caracterizan por haber perdido genes esenciales para su replicación y dependen de manera parasítica de otros genotipos presentes en la cepa silvestre para producir las proteínas necesarias durante su replicación (Muñoz, D. *et al.*, 2000).

Hoy en día se pueden identificar las diferentes variantes genotípicas presentes en poblaciones naturales de baculovirus mediante técnicas moleculares basadas en el uso de endonucleasas de restricción y secuenciación del genoma o de fragmentos del mismo. Se ha reconocido la presencia de diversas variantes genotípicas con diferentes actividades insecticidas en aislados de SeMNPV colectadas en el sur de España (Muñoz, D. *et al.*, 1999).

Formulación de los bioinsecticidas basados en baculovirus

Los bioinsecticidas basados en baculovirus, a diferencia de los plaguicidas químicos, actúan exclusivamente por ingestión y su persistencia sobre el cultivo es mucho menor. La mayoría de los baculovirus actualmente comercializados como bioinsecticidas utilizan el mismo tipo de formulación que los insecticidas químicos.

Los abrillantadores ópticos son un grupo de compuestos químicos que, por su capacidad de absorber la radiación ultravioleta y emitir luz en la región azul del espectro visible, son utilizados comúnmente para dar mayor brillo a pinturas, fibras, etc.. Los más conocidos son los derivados del estilbeno. Se ha demostrado la capacidad que tienen estas sustancias de potenciar la actividad insecticida del baculovirus (Patente de EE.UU. US5124149) debido a la interacción del blanqueador con la membrana peritrófica del intestino del insecto (Wang, P. y Granados, R. R. 2000). En *S. exigua*, la actividad sinérgica de la sustancia aumenta con la edad del huésped tratado de forma que los valores de las concentraciones letales requeridas para el control de larvas de los últimos estadios puede reducirse a valores similares a los que se requieren para el control de larvas de los primeros estadios (Murillo, R. *et al.* 2003).

Producción de SeMNPV

La producción *in vivo* sobre huéspedes permisibles es la metodología actualmente utilizada para la producción de todos los bioinsecticidas basados en baculovirus disponibles en el mercado incluido el SeMNPV. Básicamente consiste en alimentar larvas con dieta semisintética que es superficialmente contaminada con una determinada suspensión acuosa del virus que se quiere multiplicar. Algunos de los aspectos esenciales de esta metodología, como por ejemplo las dietas para insectos o los métodos de cría masiva, deben ser específicamente desarrollados para cada sistema huésped-patógeno. El método de cría masiva de *S. exigua* ha sido optimizado para la producción de SeMNPV en Tailandia (Cherry, A. J. *et al.* 1997). También se ha desarrollado un sistema de producción de baculovirus el cual utiliza una alta densidad de larvas que aun no ha sido probado para la producción de SeMNPV (Patente de EE.UU. US5351643).

Descripción de la invención

La invención se refiere a seis nuevos genotipos del nucleopoliedrovirus múltiple de *Spodoptera exigua* denominados AIPstM0935, AIPstM1400, AIPstM1033, AIPstM1449, AIPstM0923, y AIPstM0657, cuyo depósito se ha efectuado en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes, Institut Pasteur, París, Francia. Estos genotipos se diferencian entre sí, y con respecto a otros descritos en la literatura, por la secuencia de nucleótidos localizados entre las 10.637 y 11.744 pares de bases del genoma viral, tomando como referencia la secuencia del genoma cuyo número de GeneBank es N0002169 y que corresponde a un genotipo procedente de un aislado de Estados Unidos. Una diferenciación rápida y precisa de cada uno de estos genotipos puede obtenerse empleando una combinación de la técnica de la PCR y la digestión con endonucleasas de restricción de los fragmentos amplificados. Cada genotipo posee una actividad insecticida característica para las larvas de *Spodoptera exigua*, la cual se determina como la relación estadística entre el número de partículas del virus (poliedros) y la mortalidad inducida en larvas tratadas y se expresa como dosis letal media (DL₅₀). La mezcla de dos o más genotipos tiene una actividad insecticida significativamente mayor que la de los genotipos individuales. Mediante la adición de abrillantadores ópticos, como por ejemplo Leucophor, se puede incrementar la actividad insecticida del virus entre 20 y 1000 veces. Los poliedros, en los cuales radica la actividad insecticida, pueden producirse de forma masiva *in vivo*, inoculando larvas de *Spodoptera exigua* con dosis elevadas. El tratamiento de las larvas con un análogo de la hormona juvenil, previamente a su inoculación con el virus, permite aumentar la producción de poliedros por larva entre 3 y 8 veces. Los poliedros extraídos de las larvas, pulverizados como suspensiones acuosas, protegen de una forma efectiva a los cultivos de las plagas ocasionadas por larvas de *Spodoptera exigua*, incluso cuando estas han desarrollado resistencias a los insecticidas químicos. Este producto representa una tecnología limpia y segura ya que no deja residuos tóxicos sobre las cosechas y no es tóxico para el hombre ni otros animales, incluidos los enemigos los parasitoides y depredadores de las plagas.

Un objeto de la presente invención es un nucleopoliedrovirus múltiple de *Spodoptera exigua* que pertenece a un genotipo seleccionado entre AIPstM0935, AIPstM1400, AIPstM1033, AIPstM1449, AIPstM0923 o AIPstM0657, preferentemente en forma de poliedro. Dicho nucleopoliedrovirus se caracteriza por comprender una secuencia de ADN seleccionada entre: SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8 ó SEQ ID NO:9.

Otro objeto de la presente invención son composiciones plaguicidas que contengan, en forma de poliedros, alguno de los nucleopoliedrovirus AIPstM0935, AIPstM1400, AIPstM1033, AIPstM1449, AIPstM0923 o AIPstM0657, o combinaciones de los mismos, con cualquier otro excipiente o vehículo apropiado en el sector agrícola que lo haga apto para ser aplicado según cualquiera de los métodos habituales en agricultura: pulverización a nivel de tierra, pulverización aérea, en disolución, en forma de polvo, por cualquier tipo de sistema de riego o irrigación, en forma sólida, asociado a abonos, fertilizantes, etc.

Son también objeto de la presente invención las composiciones plaguicidas definidas anteriormente que comprendan un agente potenciador del efecto patógeno del nucleopoliedrovirus sobre el lepidóptero. Especialmente útiles se han mostrado las composiciones plaguicidas en que dicho agente potenciador es un abrillantador óptico, particularmente un derivado del estilbénico y, en concreto, composiciones plaguicidas que contengan Leucophor AP.

Descripción detallada de la invención

Ejemplo 1

Aislamiento de los genotipos del nucleopoliedrovirus de S. exigua AIPstM0935, AIPstM1400, AIPstM1033, AIPstM1449, AIPstM0923 y AIPstM0657 de muestras de suelo o insectos

Los genotipos del SeMNPV AIPstM0935, AIPstM1400, AIPstM1033, AIPstM1449, AIPstM0923 y AIPstM0657 han sido aislados de muestras de suelo incorporadas a dieta artificial [Richards y Christian, 1999]. Aproximadamente 10 g de suelo se añaden en 90 ml de dieta artificial (7,2% germen de trigo, 3,3% caseína, 2,9% azúcar comercial, 1,4% levadura de cerveza, 0,94% mezcla de sales de Wesson, 0,15% ácido sórbico, 0,09% colesterol, 0,09% nipagina, 1,9% agar industrial y 82,8% agua destilada). De este preparado se colocan pequeñas pastillas (5x5x5 mm) en viales de 1 ml y se infestan con una larva de primer o segundo estadio. Para cada muestra se tratan un total de 50 larvas y como control un grupo de larvas alimentadas con dieta a la que se incorporó una muestra de suelo previamente esterilizado. Las larvas así tratadas se mantienen en condiciones de temperatura constante de $26 \pm 2^\circ\text{C}$ y oscuridad. Las larvas que mueren en los días siguientes se examinan al microscopio óptico en contraste de fases para determinar el agente causante de la muerte. En las larvas muertas por nucleopoliedrovirus se purifican los poliedros triturando los cadáveres en agua bidestilada que contiene dodecilsulfato sódico al 0,01% y filtrando la suspensión resultante a través de un filtro de muselina. Los poliedros se precipitan por centrifugación a 6000 g durante 10 min. Posteriormente se realiza un lavado con agua que contiene cloruro sódico al 0,01% y se precipitan por centrifugación en las mismas condiciones. Para conservar los poliedros se resuspenden finalmente en agua estéril. Debido a sus características los poliedros pueden ser almacenados en refrigeración durante largos periodos de tiempo en agua o en un 50% de glicerol a -80°C o por liofilización. En suspensiones acuosas almacenadas a 4°C también mantienen su capacidad patogénica durante largos periodos de tiempo, mientras que a temperatura ambiente pierden parte de esta capacidad después de ocho o diez meses.

Ejemplo 2

Caracterización de los genotipos AIPstM0935, AIPstM1400, AIPstM1033, AIPstM1449, AIPstM0923, y AIPstM0657

Para producir una mayor cantidad de poliedros de los genotipos AIPstM0935, AIPstM1400, AIPstM1033, AIPstM1449, AIPstM0923 y AIPstM0657 es necesario infectar larvas sanas de *S. exigua* alimentándolas con dieta artificial contaminada o también en distintas líneas celulares de *S. exigua* cultivadas *in vitro*, en medio de cultivo (Hara K. *et al.*, 1994).

Para poder diferenciar genéticamente los seis genotipos se pueden utilizar métodos bien conocidos en la técnica (Muñoz, D. *et al.*, 2001). Un método preciso, reproducible y ampliamente utilizado es el análisis del ADN genómico, aprovechando la existencia de regiones que muestran una alta variabilidad estructural entre distintos aislados geográficos (Li *et al.*, 2005) o incluso entre genotipos purificados de un mismo aislado (García-Maruniak *et al.*, 1996), como las regiones homólogas (*hr*), que se localizan en número variable a lo largo del genoma. En el genoma del SeMNPV existen 6 *hrs*, de las que la denominada *hr1*, que actúa como origen de replicación del virus *in vitro*, es la que muestra mayor variabilidad entre los genotipos (Muñoz, D. *et al.*, 1999). Esta zona hipervariable del genoma del virus SeMNPV está localizada en el fragmento de restricción *PstI*-M (Fig. 1) y es útil para diferenciar variantes genotípicas en distintos aislados del SeMNPV. La digestión del ADN de los genotipos AIPstM0935, AIPstM1400, AIPstM1033, AIPstM1449, AIPstM0923 y AIPstM0657 con las endonucleasas de restricción *Bgl*III y *PstI* produce un perfil de restricción característico y único para cada genotipo (Fig. 2). Por ejemplo, los fragmentos polimórficos generados por la endonucleasa de restricción *Bgl*III (*Bgl*III-A, *Bgl*III-H, *Bgl*III-J o K) o por *PstI* (*PstI*-M), pueden utilizarse como marcadores para diferenciar entre dos o más genotipos.

Una diferenciación más precisa de cada genotipo (AIPstM0935, AIPstM1400, AIPstM1033, AIPstM1449, AIPstM0923, y AIPstM0657) se obtiene empleando una combinación de la técnica basada en la reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction, PCR) junto con la digestión de los fragmentos amplificados por PCR con endonucleasas de restricción (Restriction Endonuclease, REN). El empleo de dos cebadores genéricos para todos estos genotipos (SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2) permite amplificar una zona hipervariable del genoma comprendida en el fragmento de restricción *Pst*IM (Tabla 1).

TABLA 1

Genotipo	Tamaño estimado del fragmento amplificado (kilobases)	Tamaño del fragmento secuenciado (pares de bases)
AIPstM0935	1,2	1197
AIPstM1400	1,7	1661
AIPstM1033	1,3	1294
AIPstM1449	1,6	1619
AIPstM0923	1,2	1151
AIPstM0657	0,9	896

La digestión de los fragmentos amplificados por PCR con la endonucleasa de restricción *Bg*III produce perfiles de restricción únicos para cada uno de los genotipos AIPstM0935, AIPstM1400, AIPstM1033, AIPstM1449, AIPstM0923, y AIPstM0657 (Tabla 2; Fig. 3). De esta manera el genotipo AIPstM0935 se caracteriza por dar un producto de PCR de 1,2 kb que al ser digerido por *Bg*III genera tres fragmentos de 0,55; 0,4 y 0,25 kb. El genotipo AIPstM1400 se caracteriza por dar un producto de PCR de 1,7 kb que al ser digerido por *Bg*III genera tres fragmentos de 0,25; 0,4 y 1,05 kb. El genotipo AIPstM1033 se caracteriza por dar un producto de PCR de 1,3 kb que al ser digerido por *Bg*III genera dos fragmentos de 0,4 y 0,9 kb. El genotipo AIPstM1449 se caracteriza por dar un producto de PCR de 1,6 kb que al ser digerido por *Bg*III genera cuatro fragmentos de 0,2; 0,3, 0,4 y 0,7 kb. El genotipo AIPstM0923 se caracteriza por dar un producto de PCR de 1,2 kb que no produce fragmentos al ser digerido por *Bg*III.

El genotipo AIPstM0657 se caracteriza por dar un producto de PCR de 0,9 kb que al ser digerido por *Bg*III genera dos fragmentos de 0,4 y 0,5 pb.

TABLA 2

Genotipo	Fragmentos de restricción generados por <i>Bg</i> III (kb)
AIPstM0935	0,55; 0,4; 0,25
AIPstM1400	0,25; 0,4; 1,05
AIPstM1033	0,4; 0,9
AIPstM1449	0,2; 0,3; 0,4; 0,8
AIPstM0923	1,2
AIPstM0657	0,4; 0,5

La secuencia de nucleótidos de la región variable entre genotipos es el método más preciso para la caracterización e identificación de los genotipos. El diseño de un nuevo cebador interno situado en la región conservada para todos los genotipos del extremo 5', cuya secuencia viene representada por SEQ ID NO:3, permite obtener la secuencia de nucleótidos completa correspondiente a la zona variable entre los genotipos AIPstM0935, AIPstM1400, AIPstM1033, AIPstM1449, AIPstM0923, y AIPstM0657.

ES 2 301 352 A1

Genotipo AIPstM0935: Se llevaron a cabo nueve reacciones de secuenciación utilizando el ABI PRISM^R Big DyeTM Terminator Ready Reaction Cycle Sequencing kit en un termociclador modelo 9600 de Perkin-Elmer. Tras este proceso, los productos de las reacciones se han analizado en un secuenciador automático modelo ABI PRISM 3110 de Applied Biosystems. Finalmente se ha realizado el ensamblaje y edición en un solo contig. El procedimiento interno que describe estos procesos es el PEN06 (SEQ ID NO: 4).

Genotipo AIPstM1400: Se llevaron a cabo nueve reacciones de secuenciación utilizando el ABI PRISM^R Big DyeTM Terminator Ready Reaction Cycle Sequencing kit en un termociclador modelo 9600 de Perkin-Elmer. Tras este proceso, los productos de las reacciones se han analizado en un secuenciador automático modelo ABI PRISM 3110 de Applied Biosystems. Finalmente se ha realizado el ensamblaje y edición en un solo contig. El procedimiento interno que describe estos procesos es el PEN06 (SEQ ID NO: 5).

Genotipo AIPstM1033: Se llevaron a cabo nueve reacciones de secuenciación utilizando el ABI PRISM^R Big DyeTM Terminator Ready Reaction Cycle Sequencing kit en un termociclador modelo 9600 de Perkin-Elmer. Tras este proceso, los productos de las reacciones se han analizado en un secuenciador automático modelo ABI PRISM 3110 de Applied Biosystems. Finalmente se ha realizado el ensamblaje y edición en un solo contig. El procedimiento interno que describe estos procesos es el PEN06 (SEQ ID NO: 6).

Genotipo AIPstM1449: Se llevaron a cabo catorce reacciones de secuenciación utilizando el ABI PRISM^R Big DyeTM Terminator Ready Reaction Cycle Sequencing kit en un termociclador modelo 9600 de Perkin-Elmer. Tras este proceso, los productos de las reacciones se han analizado en un secuenciador automático modelo ABI PRISM 3110 de Applied Biosystems. Finalmente se ha realizado el ensamblaje y edición en un solo contig. El procedimiento interno que describe estos procesos es el PEN06 (SEQ ID NO: 7).

Genotipo AIPstM0923: Se llevaron a cabo catorce reacciones de secuenciación utilizando el ABI PRISM^R Big DyeTM Terminator Ready Reaction Cycle Sequencing kit en un termociclador modelo 9600 de Perkin-Elmer. Tras este proceso, los productos de las reacciones se han analizado en un secuenciador automático modelo ABI PRISM 3110 de Applied Biosystems. Finalmente se ha realizado el ensamblaje y edición en un solo contig. El procedimiento interno que describe estos procesos es el PEN06 (SEQ ID NO: 8).

Genotipo AIPstM0657: Se llevaron a cabo ocho reacciones de secuenciación utilizando el ABI PRISM^R Big DyeTM Terminator Ready Reaction Cycle Sequencing kit en un termociclador modelo 9600 de Perkin-Elmer. Tras este proceso, los productos de las reacciones se han analizado en un secuenciador automático modelo ABI PRISM 3110 de Applied Biosystems. Finalmente se ha realizado el ensamblaje y edición en un solo contig. El procedimiento interno que describe estos procesos es el PEN06 (SEQ ID NO: 9).

Ejemplo 3

Actividad insecticida de los genotipos AIPstM0935, AIPstM1400, AIPstM1033, AIPstM1449, AIPstM0923, y AIPstM0657 y distintas mezclas de estos genotipos

La actividad insecticida de los genotipos individuales o distintas mezclas de genotipos se determina en términos de patogenicidad y tiempo de matar. La patogenicidad de los genotipos AIPstM0935, AIPstM1400, AIPstM1033, AIPstM1449, AIPstM0923, y AIPstM0657 y las mezclas AIPstM-M1 (AIPstM1400:AIPstM1033 en la proporción 1:1), AIPstM-M2 (AIPstM0935:AIPstM1400:AIPstM1033 en la proporción 1:1:1), y AIPstM-M3 (AIPstM0935:AIPstM1033 en la proporción 1:1) se expresa como la dosis letal media (DL_{50}). Este valor se determina mediante bioensayo (Hughes y Wood, 1981) sobre larvas de *S. exigua* del segundo estadio. Las larvas se inoculan por ingestión de la cantidad de poliedros correspondiente para obtener cada una de las siguientes concentraciones: $7,50 \times 10^5$; $2,50 \times 10^5$; $8,18 \times 10^4$; $2,72 \times 10^4$; $9,03 \times 10^3$ poliedros/ml, que corresponden a las dosis de 3, 9, 27, 81, y 243 poliedros/larva (esta relación, el número de poliedros por larva, se abreviará en lo sucesivo como OB/larva). Como testigo se incluye un grupo de larvas tratadas con la misma solución sin poliedros. Las larvas tratadas se mantienen a 26°C y cada 12 horas se registra el número de larvas muertas por infección de poliedros (Tabla 3).

ES 2 301 352 A1

TABLA 3

Tratamiento	Dosis (OB/larva)	Larvas tratadas	Larvas muertas
AlPstM0935	3	119	10
	9	119	28
	27	119	52
	81	120	65
	243	120	109
AlPstM1400	3	120	25
	9	116	31
	27	120	59
	81	118	81
	243	118	110
AlPstM1033	3	120	20
	9	119	32
	27	117	55
	81	119	82
	243	118	105
AlPstM1449	3	116	20
	9	119	34
	27	120	59
	81	120	81
	243	118	109
AlPstM-M1	3	120	23
	9	120	39
	27	120	57
	81	120	81
	243	118	115
AlPstM-M2	3	118	12
	9	120	21
	27	120	44
	81	120	66
	243	118	112
AlPstM-M3	3	117	30
	9	118	41
	27	118	60
	81	120	84
	243	120	115

Las mezclas de genotipos corresponden a las siguientes combinaciones :

AlPstM-M1= AlPstM1400:AlPstM1033

AlPstM-M2= AlPstM0935:AlPstM1400:AlPstM1033

AlPstM-M3= AlPstM0935: AlPstM1033.

ES 2 301 352 A1

Los datos dosis-mortalidad son analizados mediante una regresión probit entre el logaritmo de la dosis y la mortalidad que nos permite obtener los valores de la DL_{10} DL_{50} para los genotipos individuales y las mezclas de varias combinaciones de los mismos (Tabla 4). La patogenicidad de las mezclas AlPstM-M2 y AlPstM-M3 es mayor que la de los genotipos individuales.

TABLA 4

Genotipo	DL_{10} (OBs/larva)	DL_{50} (OBs/larva)
AlPstM0935	2,61	50,50
AlPstM1400	1,48	27,29
AlPstM1033	1,53	29,86
AlPstM1449	1,31	29,33
AlPstM-M1	1,05	27,89
AlPstM-M2	1,03	22,62
AlPstM-M3	0,77	24,17

Las mezclas de genotipos corresponden a las siguientes combinaciones :

AlPstM-M1= AlPstM1400:AlPstM1033

AlPstM-M2= AlPstM0935:AlPstM1400:AlPstM1033

AlPstM-M3= AlPstM0935: AlPstM1033.

El tiempo de matar de los genotipos AlPstM0935, AlPstM1400, AlPstM1033, AlPstM1449 y las mezclas AlPstM-M1, AlPstM-M2, AlPstM-M3 se muestra como el porcentaje de mortalidad medido en dos momentos distintos a lo largo de la infección, porcentajes que no son acumulativos, sino que corresponden a las muertes de larvas registradas a las 72 horas de haber sido tratadas y en el período comprendido entre las 72 y las 96 horas después de haber sido tratadas (Tabla 5).

TABLA 5

Genotipo	% Mortalidad (72 horas)	% Mortalidad (96 horas)
AlPstM0935	35,6	15,3
AlPstM1400	28,3	30,0
AlPstM1033	35,6	17,0
AlPstM1449	18,64	37,3
AlPstM-M 1	28,9	24,4
AlPstM-M2	36,4	25,0
AlPstM-M3	49,0	18,4

Las mezclas de genotipos corresponden a las siguientes combinaciones :

AlPstM-M1= AlPstM1400:AlPstM1033

AlPstM-M2= AlPstM0935:AlPstM1400:AlPstM1033

AlPstM-M3= AlPstM0935: AlPstM1033.

El pico de mortalidad se registra a las 72 horas, es decir, el período comprendido entre las 60 horas postinfección y las 72 horas postinfección, es el período en el que se registra mayor porcentaje de larvas muertas.

Ejemplo 4

Efecto del abrillantador óptico Leucophor AP sobre la actividad insecticida del nucleopoliedrovirus de S. exigua

Tal como se comentó anteriormente, la actividad insecticida del virus (medida en términos de la dosis letal media, DL_{50}) cambia en función del estadio larvario. En general, puede decirse que el virus es más activo (presenta un menor valor de DL_{50}) para las larvas más jóvenes (de los primeros estadios) y disminuye su actividad (aumenta el valor de la DL_{50}) a medida que aumenta el tamaño de la larva. Interesa, sin embargo, que el virus pueda matar a las larvas a la dosis más baja posible, para que sea necesario aplicar menos producto y el correspondiente insecticida resulte más barato. Por ello, se buscó un producto que pudiera mostrar una actividad sinérgica con el virus.

El Leucophor AP aumenta la actividad insecticida del nucleopoliedrovirus de *S. exigua* cuando se suministra mezclado al 0,1 o al 1% con los poliedros de diferentes genotipos de SeMNPV. Dicha mortalidad se determinó mediante el método de bioensayo por contaminación de superficie de dieta (Muñoz, D. *et al.*, 2001). Varias suspensiones del nucleopoliedrovirus, en agua destilada o soluciones acuosas de Leucophor AP (suministrado por Clariant Ibérica, Barcelona, España) al 1% se aplicaron superficialmente sobre la dieta previamente dispensada en los pocillos (400 mm²) de una caja de petri compartimentalizada, para obtener las siguientes concentraciones de virus: 273, 91, 18, 9, 2 y 0 poliedros por mm² de dieta. En cada uno de estos pocillos se coloca una larva de *S. exigua* y se mantienen a 25°C en oscuridad. La mortalidad de las larvas debida a virus se registra a los 7 días (Tabla 6). Se muestran los resultados correspondientes a larvas del cuarto estadio, en las que el efecto sinérgico del abrillantador es más fácil de apreciar debido a que las dosis letales medias de SeMNPV requeridas en ausencia de compuesto con efecto sinérgico (aproximadamente 100 OB/larva) son más elevadas que en estadios más tempranos como por ejemplo el segundo (al que le corresponden un valor de DL_{50} en ausencia de compuesto con efecto sinérgico de aproximadamente 10 OB/larva), siendo la disminución de la DL_{50} más fácil de apreciar cuando se parte de valores más elevados. Los resultados mostraron un importantísimo incremento de la mortalidad causada por el virus.

TABLA 6

Tratamiento	Concentración (OBs/mm ² de dieta)	Nº larvas tratadas	Nº larvas muertas al 7º día
AlPstM-M2 +H ₂ O			
	273	74	55
	91	75	39
	18	74	29
	9	74	18
	2	73	9
	0	50	0
AlPstM-M2 +Leucophor AP (1%)			
	273	74	74
	91	75	75
	18	74	74
	9	74	74
	2	75	72
	0	50	0
La mezcla de genotipos AlPstM-M2 corresponde a la suma de los genotipos AlPstM0935:AlPstM1400:AlPstM1033.			

En un segundo ensayo se utilizaron concentraciones más bajas del nucleopoliedrovirus tanto en suspensiones acuosas de Leucophor AP al 1% (2,73; 0,91; 0,18; 0,05 y 0,01 poliedros/mm² de dieta) como en las suspensiones de Leucophor AP 0,1% (27,3; 9,1; 1,8; 0,5 y 0,1 poliedros/mm² de dieta), de manera que se pudiera establecer la concentración requerida (número de OBs por unidad de superficie o por unidad de volumen) para matar el 50% de

ES 2 301 352 A1

las larvas tratadas en cada caso (CL_{50} ; ver Tabla 7). Los resultados muestran claramente que el Leucophor AP a una concentración del 0,1% produce un incremento de la actividad del virus de más de 20 veces y a la concentración del 1% dicho incremento llega a ser de más de 1000 veces.

TABLA 7

Tratamiento	CL_{50} a los 7 días (OBs/400 mm ² de dieta)
AlPstM-M2 +H ₂ O	22400
AlPstM-M2 +Leucophor AP (1%)	4
AlPstM-M2 +Leucophor AP (0,1%)	888

En cada tratamiento se utilizaron 5 concentraciones de virus y uno (H₂O) o dos controles (H₂O y/o Leucophor+H₂O) y se trataron 25 larvas por concentración. Cada tratamiento se repitió cuatro veces. En ninguno de los controles se observó mortalidad causada por virus.

Ejemplo 5

Producción masiva del nucleopoliedrovirus de S. exigua

Para determinar la producción masiva de la mezcla del nucleopoliedrovirus de *S. exigua* AlPstM-M2 se utiliza como criterio el número de OBs que producen las larvas letalmente infectadas. Para llevar a cabo este procedimiento, se considera que el estadio larvario de *S. exigua* más adecuado para la producción masiva de virus es el último posible (el cual, si el desarrollo larvario se produce de forma natural, sería el quinto) pues es aquel en el que el tamaño del huésped es mayor, por lo que también lo es el número de células en el que puede multiplicarse el virus y mayor es la cantidad de OBs que se obtienen por huésped infectado, pero también podrían utilizarse larvas de otros estadios. En cuanto a la cantidad de virus suministrados por larva, se prefiere utilizar entre 10^6 y 10^7 OB/larva, para asegurar que haya una mortalidad del 100% de las larvas tratadas. La temperatura adecuada para mantener las larvas es de $26 \pm 2^\circ\text{C}$.

Larvas recién mudadas al último estadio (quinto estadio) son individualmente alimentadas con dieta artificial sólida (8 mm³) (preparada tal como se describe en Muñoz, D. *et al.*, 2001), contaminada con 10 μl de una suspensión acuosa de 10^8 OBs/ml del virus. Se trataron un total de 30 larvas por repetición y se hicieron tres repeticiones de la misma prueba. Las larvas tratadas se mantuvieron a 25°C hasta que se produjo su muerte (aproximadamente a los 6 días). Los poliedros producidos por cada larva muerta se extrajeron y se purificaron según se ha indicado anteriormente (ver ejemplo 1). La suspensión final de OBs se tituló al microscopio óptico en contraste de fases haciendo uso de un hemocitómetro (cámara Neubauer). Los resultados indican que la producción de poliedros por larva oscila entre $0,66 \times 10^9$ y $3,94 \times 10^9$ y la producción de poliedros por miligramo de larva varía entre $0,41 \times 10^7$ y $2,35 \times 10^7$ (Tabla 8).

(Tabla pasa a página siguiente)

TABLA 8

	Larvas tratadas con AlPstM-M2*	Producción de poliedros por larva ($\times 10^9$)	Peso alcanzado por larva (mg)	Producción de poliedros por mg de larva ($\times 10^7$)
5				
10	1	1,65	169,5	0,97
	2	1,38	175,4	0,79
	3	3,18	295,8	1,07
15	4	2,04	166,7	1,22
	5	1,67	230,6	0,72
	6	3,35	198,6	1,69
20	7	1,89	168,4	1,12
	8	2,40	237,1	1,01
	9	3,73	249	1,50
25	10	1,83	173,6	1,05
	11	3,58	244,9	1,46
	12	1,76	262,3	0,67
	13	1,63	181,5	0,90
30	14	2,02	140,2	1,44
	15	3,45	284,2	1,21
	16	2,92	210	1,39
35	17	2,11	204	1,03
	18	2,66	216,5	1,23
	19	1,65	177,9	0,92
40	20	3,02	244,9	1,23
	21	1,37	175,8	0,78
	22	1,82	203,1	0,90
	23	2,43	222,5	1,09
45	24	2,00	144,2	1,38
	25	1,81	274,2	0,66
	26	1,33	187,4	0,71
50	27	2,30	213,6	1,08
	28	2,65	216,7	1,22
	29	2,70	181,8	1,49
55	30	2,67	266	1,00
	31	2,47	227,4	1,09
	32	2,20	216,1	1,02
60	33	1,66	161,6	1,03
	34	1,29	214,7	0,60
	35	1,35	124,5	1,08
65	36	3,03	240,4	1,26

ES 2 301 352 A1

TABLA 8 (continuación)

	Larvas tratadas con AlPstM-M2*	Producción de poliedros por larva ($\times 10^9$)	Peso alcanzado por larva (mg)	Producción de poliedros por mg de larva ($\times 10^7$)
5				
10	37	1,46	130,1	1,12
	38	2,84	164,8	1,72
15	39	2,21	222,1	0,99
	40	2,33	115,8	2,01
	41	2,37	212,7	1,11
	42	2,37	180,6	1,31
20	43	1,97	261,2	0,75
	44	1,97	190,7	1,03
	45	1,19	217,8	0,55
25	46	1,25	246,9	0,51
	47	2,89	238,8	1,21
	48	2,32	185,2	1,25
30	49	2,61	179,7	1,45
	50	2,10	119,0	1,76
	51	1,65	219,0	0,75
35	52	1,02	247,3	0,41
	53	0,66	151,8	0,43
	54	2,87	168,0	1,71
	55	2,47	185,9	1,33
40	56	3,11	198,4	1,57
	57	3,36	199,4	1,68
	58	3,86	164,2	2,35
45	59	2,02	104,6	1,93
	60	2,23	174,4	1,28
	61	3,94	209,9	1,87
50	62	1,56	201,3	0,77
	63	2,70	201,6	1,34
	64	3,67	212,5	1,73
55	65	3,10	215,1	1,44
	66	3,06	174,5	1,75
	67	2,28	128,5	1,77
	68	3,16	182,6	1,73
60	69	0,76	110,8	0,69
	70	1,86	137,1	1,36
	71	3,03	236,3	1,28
65	72	1,25	246,9	0,51
	73	2,89	238,8	1,21

TABLA 8 (continuación)

Larvas tratadas con AIPstM-M2*	Producción de poliedros por larva ($\times 10^9$)	Peso alcanzado por larva (mg)	Producción de poliedros por mg de larva ($\times 10^7$)
74	2,83	199,6	1,42
75	2,60	180,4	1,44
76	2,10	129,5	1,62
77	2,65	250,9	1,05
78	1,02	247,3	0,41
79	0,68	121,4	0,56
80	2,87	168,0	1,71
81	2,47	185,9	1,33
82	3,11	198,4	1,57
83	3,35	198,6	1,69
84	1,97	190,7	1,03
85	1,81	273,2	0,66

* La mezcla de genotipos AIPstM-M2 corresponde a la suma de los genotipos
AIPstM0935:AIPstM1400:AIPstM1033

En un segundo ensayo se midió la producción de OBs en larvas que habían recibido previamente un tratamiento con un químico análogo de la hormona juvenil. Larvas recién mudadas al quinto estadio fueron alimentadas con dieta artificial superficialmente tratada con una suspensión de Fenoxicarb al 1% en agua destilada. Las larvas así tratadas experimentan una muda supernumeraria, muda extra que da lugar a un sexto estadio. Las larvas recién mudadas al sexto estadio son tratadas utilizando la misma concentración de virus y la misma metodología indicada en el apartado anterior. Los resultados indican que la producción de poliedros por larva oscila entre $1,82 \times 10^9$ y $10,40 \times 10^9$ y la producción de poliedros por miligramo de larva varía entre $0,65 \times 10^7$ y $2,16 \times 10^7$ (Tabla 9).

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 301 352 A1

TABLA 9

	Larvas tratadas con AlPstM-M2+HJ*	Producción de poliedros por larva ($\times 10^9$)	Peso alcanzado por larva (mg)	Producción de poliedros por mg de larva ($\times 10^7$)
5	1	4,28	441,6	0,97
10	2	7,96	605,4	1,31
	3	5,83	524,5	1,11
	4	2,55	242,6	1,05
15	5	4,15	272,5	1,52
	6	6,19	587,2	1,05
	7	4,91	462,3	1,06
	8	5,11	403,1	1,27
20	9	6,68	674,1	0,99
	10	3,97	294,7	1,35
	11	3,19	489,0	0,65
25	12	5,90	487,4	1,21
	13	7,87	481,5	1,63
	14	8,47	545,0	1,55
	15	8,72	467,2	1,87
30	16	5,57	321,5	1,73
	17	7,95	593,7	1,34
	18	7,52	516,6	1,46
35	19	8,40	623,3	1,35
	20	7,05	454,3	1,55
	21	6,47	608,8	1,06
40	22	7,70	379,7	2,03
	23	7,45	495,0	1,51
	24	3,32	323,6	1,03
	25	4,93	431,8	1,14
45	26	5,57	551,8	1,01
	27	7,20	521,4	1,38
	28	3,95	231,3	1,71
50	29	3,17	250,3	1,27
	30	7,80	418,8	1,86
	31	8,25	584,7	1,41
	32	7,05	464,4	1,52
55	33	3,58	336,9	1,06
	34	4,78	467,8	1,02
	35	3,53	416,9	0,85
60	36	3,15	324,0	0,97
	37	3,88	327,6	1,18
	38	8,83	602,6	1,46
	39	5,98	529,9	1,13
65	40	7,75	407,1	1,90

ES 2 301 352 A1

TABLA 9 (continuación)

	Larvas tratadas con AIPstM-M2+HJ*	Producción de poliedros por larva ($\times 10^9$)	Peso alcanzado por larva (mg)	Producción de poliedros por mg de larva ($\times 10^7$)
5	41	9,60	643,3	1,49
10	42	10,38	480,3	2,16
	43	2,97	388,1	0,77
	44	9,40	511,8	1,84
	45	4,85	375,9	1,29
15	46	4,65	589,6	0,79
	47	6,70	555,0	1,21
	48	9,45	503,2	1,88
20	49	7,20	537,3	1,34
	50	5,78	497,8	1,16
	51	5,58	704,8	0,79
25	52	5,18	401,2	1,29
	53	6,67	511,8	1,30
	54	2,35	352,2	0,67
	55	3,70	295,0	1,25
30	56	6,33	395,2	1,60
	57	5,02	382,5	1,31
	58	4,30	584,4	0,74
35	59	8,05	438,7	1,83
	60	7,18	597,1	1,20
	61	9,25	563,9	1,64
40	62	5,03	444,3	1,13
	63	8,95	666,0	1,34
	64	7,40	527,3	1,40
	65	5,15	510,1	1,01
45	66	3,08	571,8	0,54
	67	3,65	607,1	0,60
	68	7,13	458,3	1,55
50	69	3,50	404,5	0,87
	70	7,08	361,8	1,96
	71	8,60	510,8	1,68
	72	4,35	332,1	1,31
55	73	6,75	555,7	1,21
	74	8,85	700,9	1,26
	75	6,62	491,7	1,35
60	76	6,30	389,6	1,62
	77	1,82	269,1	0,68
	78	7,85	548,2	1,43
	79	10,10	701,2	1,44
65	80	7,00	390,2	1,79

TABLA 9 (continuación)

Larvas tratadas con AlPstM-M2+HJ*	Producción de poliedros por larva ($\times 10^9$)	Peso alcanzado por larva (mg)	Producción de poliedros por mg de larva ($\times 10^7$)
81	10,00	691,8	1,45
82	5,95	523,0	1,14
83	9,45	503,2	1,88
84	6,03	625,9	0,96
85	5,20	487,3	1,07
86	4,88	289,9	1,68
87	10,40	513,0	2,03
88	3,65	412,3	0,89

* La mezcla de genotipos AlPstM-M2 corresponde a la suma de los genotipos AlPstM0935: AlPstM1400:AlPstM1033. Como químico análogo a la hormona juvenil (HJ) se utilizó una suspensión de Fenoxicarb al 1% en agua destilada.

El método de producción *in vivo* que utiliza un análogo de la hormona juvenil produce un incremento de más de 2,7 veces la cantidad media de cuerpos de poliedros producidos por larva. Los valores de producción por larva así como el peso medio final que adquieren las larvas se puede apreciar en la Tabla 10.

TABLA 10

Tratamiento	Producción de poliedros por larva ($\times 10^9$)	Peso alcanzado por larva (mg)	Producción de poliedros por mg de larva ($\times 10^7$)
AlpstM-M2+H ₂ O	2,28	197,44	1,19
M2+HJ	6,20	476,80	1,31

La mezcla de genotipos AlPstM-M2 corresponde a la suma de los genotipos AlPstM0935:AlPstM1400:AlPstM1033. Como producto químico análogo a la hormona juvenil (HJ) se utilizó una suspensión de Fenoxicarb al 1% en agua destilada.

Ejemplo 6

Estudios de la efectividad en campo del nucleopoliedrovirus de *S. exigua*

Inicialmente, se determina el tiempo que tardan las larvas en infectarse en condiciones de campo cuando el virus se aplicó a dos concentraciones diferentes. Para ello, como criterio se utiliza el porcentaje de mortalidad observado en grupos de larvas recogidas a distintos intervalos de tiempo (0, 6, 24, 48 y 96 horas) después de haber realizado la aplicación de suspensiones del virus a dos concentraciones distintas: 1×10^8 y 5×10^8 poliedros por litro de caldo aplicado. Las larvas se individualizan y se mantienen sobre dieta artificial en el laboratorio hasta que se produce su muerte por infección viral o tiene lugar su pupación (Tabla 11).

TABLA 11

Tratamiento	Momento de recolección (h)	Larvas recogidas	Nº Larvas muertas	% Mortalidad
1x10⁸ poliedros/litro				
	0	72	2	2,8
	6	91	20	22,0
	24	88	17	19,3
	48	114	36	31,6
	96	117	38	32,5
5x10⁸ poliedros/litro				
	0	148	0	0
	6	219	68	31,1
	24	210	72	34,3
	48	245	147	60,0
	96	236	191	80,9

En un segundo ensayo, se comparó la efectividad del virus en campo respecto a un insecticida comercial (Lufenuron 0,05%). Además, se comprobó el incremento de capacidad insecticida de la formulación del virus con el abrillantador óptico Leucophor AP al 0,1% (Tabla 12).

(Tabla pasa a página siguiente)

TABLA 12

Tratamiento	Momento recolección	Larvas recogidas	Larvas muertas	% Mortalidad
Testigo (H ₂ O)				
	2 días	90	9	10,0
	5 días	48	3	6,3
	8 días	55	5	9,1
Lufenuron 0.05%				
	2 días	86	33	38,4
	5 días	27	8	29,6
	8 días	32	6	18,8
AlPstM-M2 (1x10 ⁹ OBs/l)				
	2 días	76	45	59,2
	5 días	84	78	92,9
	8 días	110	104	94,5
AlPstM-M2 (1x10 ⁹ OBs/l)+ Leucophor AP 0.1%				
	2 días	90	80	88,9
	5 días	79	70	88,6
	8 días	118	114	96,6
La mezcla de genotipos AlPstM-M2 corresponde a la suma de los genotipos AlPstM0935: AlPstM1400:AlPstM1033				

Depósito de microorganismos

Depósitos de los 6 genotipos reivindicados del nucleopoliedrovirus múltiple de *Spodoptera exigua* han sido efectuados en una Autoridad de Depósito de acuerdo con el Tratado de Budapest de depósito de microorganismos con fines de patente. La colección es la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM) con sede en el Institut Pasteur, con dirección en el n° 25 de la Rue du Docteur Roux, F-75724 París Cedex 15 (Francia).

El depósito de todas las muestras quedó registrado el 16 de Febrero de 2006 y a cada uno de los genotipos virales correspondió el siguiente n° de registro:

AlPstM0935 CNCM I-3572

AlPstM1400 CNCM I-3573

AlPstM1033 CNCM I-3574

5 AlPstM1449 CNCM I-3575

AlPstM0923 CNCM I-3576

10 AlPstM0657 CNCM I-3577

Referencias bibliográficas

15 **Belda, J. et al.** 1994, *Phytoma* 57: 9-39.

Caballero, P. et al. 1992, *Biocontr. Sci. Technol.* 2: 35-38.

20 **Caballero, P. et al.** 2001, *Los baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas*. Phytoma S.A., Valencia.

Cuadrado Gómez I.M. y Viñuela Sandoval, E. 1998, *Resistencia a los pesticidas en los hortícolas*. FIAPA, La Cañada, Almería.

25 **Cherry, A. J. et al.** 1997, *J. Invertebr. Pathol.* 70: 50-58.

García-Maruniak et al., 1996, *Virus Research*, 41:123-132.

Gröner, A. 1986, Specificity and safety of baculoviruses. pp. 177-202. En: R. R. Granados y Federici, B. A. (eds.), *The biology of baculoviruses*, Vol. 1. Academic Press, San Diego.

30 **Hara K. et al.,** 1994, *Appl. Entomol. Zool.* 29: 395-402 .

Hara K. et al., 1995, *Acta Virol.* 39: 215-222.

35 **Hughes y Wood,** 1981, *J. Invertebr. Pathol.* 37:154-159.

Hunter-Fujita et al., 1998, *Insect viruses and pest management*. Wiley, Chichester, Reino Unido.

40 **Jaques, R. P.** 1985. Stability of insect viruses in the environment. pp. 285-360. En: K. Maramorosch y K. E. Sherman (eds.), *Viral insecticides for biological control*. Academic Press, Orlando, EE.UU.

Kolodny-Hirsch, D. M., et al. 1997, *Biocontr. Sci. Technol.* 7: 475-488.

45 **Li et al.,** 2005, *Journal of General Virology*, 86:91-105.

Moreno, R. et al. 1992, *Hortofruticultura* 1: 41-54;

Moscardi, F. 1999, *Annu. Rev. Entomol.* 44: 257-289.

50 **Muñoz, D. et al.,** 1998, *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 4372-4377.

Muñoz, D. et al., 1999, *Virus Res.*, 59:61-74.

55 **Muñoz, D. et al.,** 2000, *Entomol. Exp. Appl.* 97: 275-282.

Muñoz, D. et al., 2001. Técnicas básicas para la caracterización de baculovirus. pp. 479-518. En: *Los baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas*. Eds: P. Caballero, M. López-Ferber y T. Williams.

60 **Murillo, R. et al.** 2003, *J. Econ. Entomol.* 96: 1668-1674.

Richards y Christian, 1999, *J. Virol. Meth.* 82:63-75.

Smits, P. H. y Vlak, J. M. 1994, *Med. Fac. Landbouw. Univ. Gent* 59: 383-392.

65 **Wang, P. y Granados, R. R.** 2000, *Insect Biochem. Mol. Biol.* 30: 135-143

Descripción de las figuras

Figura 1: A) Mapa físico del genoma de SeMNPV (aislado de referencia) con la endonucleasa de restricción *Pst*I, destacando al posición del fragmento M que contiene la zona hipervariable correspondiente a la región homóloga *hr1*; B) ORFs más próximas a la zona hipervariable; C) localización de los cebadores y su posición en la secuencia de nucleótidos.

Figura 2: Electroforesis de los fragmentos de restricción obtenidos al tratar el ADN viral de los genotipos AIPstM0935, AIPstM1400, AIPstM1033, AIPstM1449, AIPstM0923, y AIPstM0657 con la enzima *Bgl*II. Para cada genotipo se indican los fragmentos polimórficos a la derecha del carril. A la izquierda de la figura se indican los tamaños de algunos fragmentos de restricción en kilobases.

Figura 3: Electroforesis de los fragmentos de restricción generados por la digestión con *Bgl*II de los productos de PCR obtenidos para cada uno de los genotipos AIPstM0935, AIPstM1400, AIPstM1033, AIPstM1449, AIPstM0923, y AIPstM0657. La última columna (M) muestra el marcador de tamaño de fragmento cuyos valores se señalan a la derecha de la figura en kilobases.

REIVINDICACIONES

1. Nucleopoliedrovirus múltiple de *Spodoptera exigua* que pertenece a un genotipo seleccionado entre: AIPstM0935, AIPstM1400, AIPstM1033, AIPstM1449, AIPstM0923 o AIPstM0657.
2. Nucleopoliedrovirus múltiple de *Spodoptera exigua* según la reivindicación 1, que pertenece al genotipo AIPstM0935, **caracterizado** por comprender la secuencia de ADN representada por SEQ ID NO:4.
3. Nucleopoliedrovirus múltiple de *Spodoptera exigua* según la reivindicación 1 que pertenece al genotipo AIPstM1400, **caracterizado** por comprender la secuencia de ADN representada por SEQ ID NO:5.
4. Nucleopoliedrovirus múltiple de *Spodoptera exigua* según la reivindicación 1 que pertenece al genotipo AIPstM1033, **caracterizado** por comprender la secuencia de ADN representada por SEQ ID NO:6.
5. Nucleopoliedrovirus múltiple de *Spodoptera exigua* según la reivindicación 1 que pertenece al genotipo AIPstM1449, **caracterizado** por comprender la secuencia de ADN representada por SEQ ID NO:7.
6. Nucleopoliedrovirus múltiple de *Spodoptera exigua* según la reivindicación 1 que pertenece al genotipo AIPstM0923, **caracterizado** por comprender la secuencia de ADN representada por SEQ ID NO:8.
7. Nucleopoliedrovirus múltiple de *Spodoptera exigua* según la reivindicación 1 que pertenece al genotipo AIPstM0657, **caracterizado** por comprender la secuencia representada por SEQ ID NO:9.
8. Nucleopoliedrovirus múltiple de *Spodoptera exigua* según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que está en forma de poliedro.
9. Una composición plaguicida que comprende poliedros según la reivindicación 8.
10. Una composición plaguicida según la reivindicación 9 que comprende nucleopoliedrovirus múltiples de *Spodoptera exigua* de un genotipo seleccionado entre AIPstM0935, AIPstM1400, AIPstM1033, AIPstM1449, AIPstM0923 o AIPstM0657.
11. Una composición plaguicida según la reivindicación 9 que comprende mezclas de nucleopoliedrovirus múltiples de *Spodoptera exigua* de al menos dos genotipos seleccionados entre AIPstM0935, AIPstM1400, AIPstM1033, AIPstM1449, AIPstM0923 o AIPstM0657.
12. Una composición plaguicida según la reivindicación 11, que comprende mezclas de nucleopoliedrovirus múltiples de *Spodoptera exigua* de los genotipos AIPstM1400 y AIPstM1033.
13. Una composición plaguicida según la reivindicación 11, que comprende mezclas de nucleopoliedrovirus múltiples de *Spodoptera exigua* de los genotipos AIPstM0935, AIPstM1400 y AIPstM1033.
14. Una composición plaguicida según la reivindicación 11, que comprende mezclas de nucleopoliedrovirus múltiples de *Spodoptera exigua* de los genotipos AIPstM0935 y AIPstM1033.
15. Una composición plaguicida según la reivindicación 14, en la que los poliedros se encuentran en un vehículo acuoso.
16. Una composición plaguicida según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 15 que comprende adicionalmente un abrillantador óptico.
17. Una composición plaguicida según la reivindicación 16, en la que el abrillantador óptico es un derivado del estilbeno.
18. Una composición plaguicida según la reivindicación 17, en la que el derivado del estilbeno es Leucophor AP.
19. Una composición plaguicida según la reivindicación 18, en la que el Leucophor AP está presente en un porcentaje que oscila entre el 0,1% y el 1%.
20. Una composición plaguicida según cualquiera de las reivindicaciones 18 ó 19, que comprende mezclas de nucleopoliedrovirus múltiples de *Spodoptera exigua* de al menos los genotipos AIPstM0935, AIPstM1400 y AIPstM1033.
21. Un procedimiento de obtención *in vivo* de poliedros de los genotipos AIPstM0935, AIPstM1400, AIPstM1033, AIPstM1449, AIPstM0923 y/o AIPstM0657 del nucleopoliedrovirus múltiple de *Spodoptera exigua*, que comprende las etapas de:

ES 2 301 352 A1

- a) alimentar larvas de *Spodoptera exigua* con dieta artificial contaminada con poliedros de virus de la reivindicación 8;
- b) mantener las larvas a 24°C-28°C hasta que se produce su muerte;
- c) purificar los poliedros generados en las larvas triturando los cadáveres de las larvas en agua bidestilada que contiene dodecilsulfato sódico, filtrando la suspensión resultante, precipitando los poliedros mediante centrifugación, lavando el precipitado con agua con cloruro sódico y precipitando de nuevo por centrifugación;
- d) resuspender el precipitado final en agua estéril;
- e) almacenar las muestras a temperatura ambiente o, preferentemente, en refrigeración u, opcionalmente, si se añade glicerol al agua, a temperatura igual o inferior a -70°C; u
- f) opcionalmente, liofilizar la muestra y conservar a temperatura ambiente.

22. Un procedimiento de obtención de poliedros según la reivindicación 21, en el que se suministran de 10^6 a 10^7 poliedros por larva.

23. Un procedimiento de obtención de poliedros según cualquiera de las reivindicaciones 21 ó 22, en el que la dieta artificial que recibe cada larva se suministra en forma de pastillas que contienen 7,2% de germen de trigo, 3,3% de caseína, 2,9% de azúcar comercial, 1,4% de levadura de cerveza, 0,94% de mezcla de sales de Wesson, 0,15% de ácido sórbico, 0,09% colesterol, 0,09% nipagina, 1,9% agar industrial y 82,8% agua destilada.

24. Un procedimiento de obtención de poliedros según cualquiera de las reivindicaciones 21 a 23, en el que las larvas de *Spodoptera exigua* se encuentran en el quinto estadio larvario en el momento de iniciar las etapas del procedimiento.

25. Un procedimiento de obtención de poliedros según cualquiera de las reivindicaciones 21 a 24 que comprende adicionalmente la adición de un análogo de la hormona juvenil de la larva a la dieta previamente a la adición de los virus a la misma.

26. Un procedimiento de obtención de poliedros según la reivindicación 25, en el que el análogo de la hormona juvenil es el Fenoxicarb.

27. Un procedimiento de obtención de poliedros según la reivindicación 26, en el que el Fenoxicarb se añade en la superficie de las pastillas de la dieta en forma de suspensión al 1% en agua destilada.

28. Uso de nucleopoliedrovirus múltiples de *Spodoptera exigua* de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o de composiciones plaguicidas según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 20 para controlar plagas producidas por *Spodoptera exigua*.

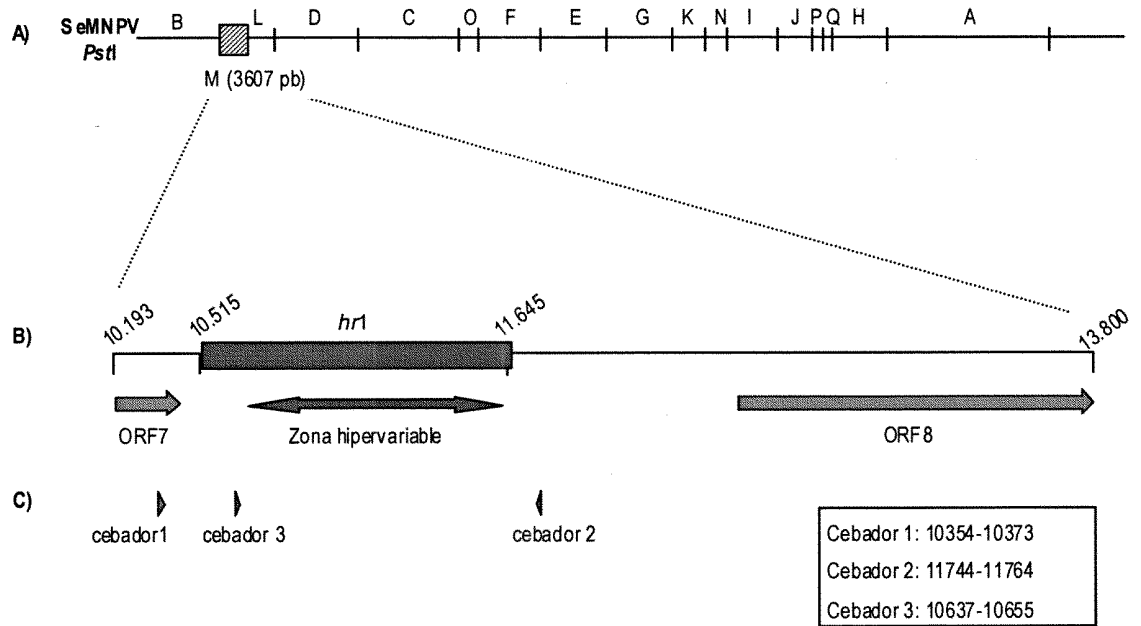


Figura 1

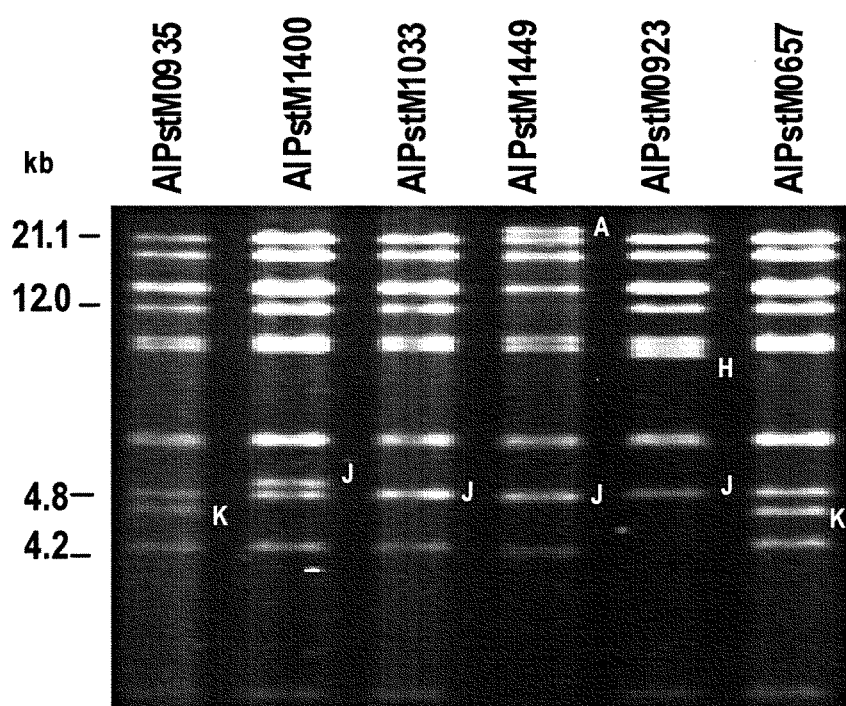


Figura 2

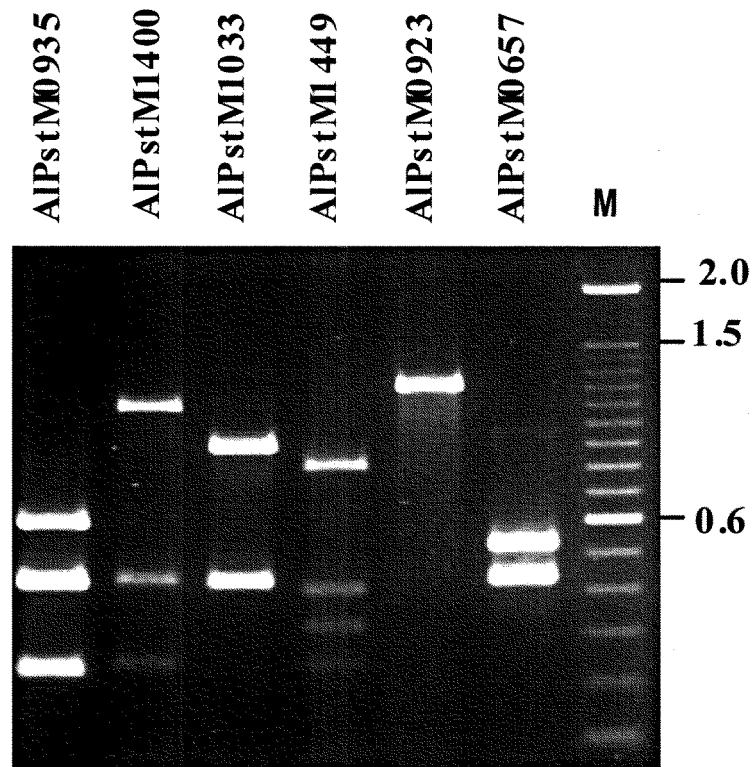


Figura 3

ES 2 301 352 A1

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> Universidad Pública de Navarra	
5	<120> Nuevos genotipos del nucleopoliedrovirus de <i>Spodoptera exigua</i> y su uso en el control de las plagas producidas por este insecto	
	<130> P-100278	
	<160> 9	
10	<210> 1	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<221> Cebador	
	<400> 1	
20	ctttgtcatc gtcacctacg	20
	<210> 2	
25	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
30	<221> Cebador	
	<400> 2	
35	gagatcatca tcgatgaaat c	21
	<210> 3	
40	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
45	<221> Cebador	
	<400> 3	
50	ccaatgacgg ttgatgcaaa	20
	<210> 4	
	<211> 964	
55	<212> ADN	
	<213> Nucleopoliedrovirus múltiple de <i>Spodoptera exigua</i>	
	<220>	
60	<223> Genotipo AlPstM0935	
65		

ES 2 301 352 A1

<400> 4

5	ccaatgaggt tgatgcaaaa tatggcgtga tattgatatc atcgctaaaa	50
	aatatggcgt gatattgata tcatcgctaa aaatagattt gacgcaatac	100
	aaaactctag tacatgatgt ttgctttcgt ccaagatcct tgatgaaagc	150
	aaagatcatg tattaacat atcatcgcca aaaatagatt tgacgcaatc	200
10	aaaactctag tacacgatgt ttgctttcgt cgaggatcgt cgatgaaagc	250
	aaagatcatg tactaaacaa aaaaattgtg taatactgat atcatagcta	300
	aaaatagatt tgacgcaata caaacttttg tacacgatct ttgctttcgt	350
15	ccaagatcct tgatgaaagc aaagatcatg tattaacac atcatcgcta	400
	aaaatagatt tgacgcaatc aaaacttttag tacatgatct ttgctttcgt	450
	cgaggatcgt cgatgaaagc aaacatcgtg tactaaaatt tattaacac	500
20	atcatcgcca aaaatagatt tgacgcaact ctccatcttt gctttcgtcg	550
	aggatcgtgg atgaaagcaa agatcatgta ctaaaattta ttaaacacat	600
	catcgataaa aatagatttg acgcaatcaa aacttttagta catgatcttt	650
25	gctttcatcg aggatcttcg atgaaagcaa agatcatgta ctagagtttt	700
	aagtgggtgt caagatatac cccgttaatg tcaacggtaa aaataaatgg	750
	ttactaacc c atttgcagaa atacacgac tttgctttcg tccacgatcg	800
30	tcgatgaaag caaagatcgt gtattacatt gcacattatt tcatcatcct	850
	aatatttcat catctttacg acacatgact ttatcgatgt tgtttgacct	900
	cgttatattg tatcatattt ggttgatgat ctcatcttgag gatgatttca	950
35	tcgatgatga tctc	964

<210> 5

40 <211> 1460

<212> ADN

<213> Nucleopoliedrovirus múltiple de *Spodoptera exigua*

45 <220>

<223> Genotipo AlPstM1400

50

55

60

65

ES 2 301 352 A1

<400> 5

5	ccaatgaggt tgatgcaaaa tatggcgtga tattgatatc atcgctaaaa	50
	aatatggcgt gatattgata tcatcgctaa aaatagattt gacgcaatac	100
	aaaactctag tacatgatgt ttgctttcgt ccaagatctt cgatgaaagc	150
10	aaagatcatg tactaaaatt tattaaacat atcatcgcca aaaatagatt	200
	tgacgcaatc aaaactctag tacacgatgt ttgctttcgt cgaggatcgt	250
	cgatgaaagc aaagatcatg tactaaacaa aaaaattgtg taatactgat	300
15	atcatagcta aaaatagatt tgacgcaata caaacttttg tacacgatct	350
	ttgctttcgt ccaagatctt tgatgaaagc aaagatcatg tattaaacac	400
	atcatcgcta aaaatagatt tgacgcaatc aaaacttttag tacatgatct	450
20	ttgctttcgt cgaggatcgt cgatgaaagc aaacatcgtg tactaaaatt	500
	tattaaacac atcatcgata aaaatagatt tgacgcaact ctccatcttt	550
	gctttcgtcg aggatcgtgg atgaaagcaa agatcatgta ctaaaattta	600
25	ttaaacacat catcgataaa aatagatttg acgcaatcaa aacttttagta	650
	catgatcttt gctttcatcg aggatcttcg atgaaagcaa agatcatgta	700
	ctagagtttt aagtgggtgt caagatatc cccgttaatg tcaacggtaa	750
30	aaataaatgg ttactaacc atttgcagaa atacacgatc tttgctttca	800
	tccacgatcg tcgatgaaag caaagatcat gtactacgat ttgcaattat	850
	gtcatcgcta aaaatagatt tgacgcaata caatattcta gtactcgatc	900
35	tttgctttcg tccaagatcg tcgatgaaag caaagatcgt gtattaaaat	950
	ttaaatacgac gcaattacga tttttgcaaa caaacatgat gactcaagat	1000
	ttaatacaca atctttgatt tcatcgacga tcttcgacga aagcaaagat	1050
40	cgtgtactat tgcgtcaatt ctatttttag cgatgattta atacacaatc	1100
	ttacaaactt cgacgaaagc aaagatgggtg tcaagtttcc gcaatagaat	1150
	agtacaccat ctttgctttc gtccacgatc gtcgatgaaa gcaaacatca	1200
45	tgtactagaa ttgacactat cgatgcagtc atcgctaaaa atagatttga	1250
	cgcaatacaa aactctagta ctcgatcttt gctttcatca aggatcgtcg	1300
	atgaaagcaa agatcgtgtg ttacattgca cattatttca tcatccta	1350
50	atttcatcat ctttacgaca catgacttta tcgatgttgt ttgacctcgt	1400
	tatattgtat catatttggt tatgatctca tttgaggatg atttcatcga	1450
	tgatgatctc	1460

55

<210> 6

<211> 1033

<212> ADN

60

<213> Nucleopoliedrovirus múltiple de *Spodoptera exigua*

<220>

<223> Genotipo AlPstM1033

65

ES 2 301 352 A1

<400> 6

	ccaatgaggt tgatgcaaaa tatggcgtga tattgatatc atcgctaaaa	50
5	aatatggcgt gatattgata tcatcgctaa aaatagattt gacgcaatac	100
	aaaactctag tacatgatgt ttgctttcgt ccaagatctt cgatgaaagc	150
	aaagatcatg tactaaaatt tattgaacat atcatcgcca aaaatagatt	200
10	tgacgcaatc aaaactctag tactcgatct ttgctttcgt cgaggatctt	250
	cgatgaaagc aaagatcatg tactagagtt ttttaagtgg gttcaagata	300
	taccccggtta atgtcaacgg taaaaataaa tggttactaa cccatttgca	350
15	gaaatacacg atctttgctt tcatccacga tcgtcgatga aagcaaagat	400
	catgtactac gatttgcaat tatgtcatcg ctaaaaatag atttgacgca	450
	atacaatatt ctagtactcg atctttgctt tcgtccaaga tcgtcgatga	500
20	aagcaaagat cgtgtattaa aatttaaatac gacgcaatta cgatttttgc	550
	aaacaaacat gatgactcaa gatttaatac acaatctttg atttcatcga	600
	cgatcttcga cgaaagcaaa gatcgtgtac tattgctgca atttctatctt	650
25	tagcgatgat ttaatacaca atcttacaaa cttcgacgaa agcaaagatg	700
	gtgtcaagtt tccgcaatag aatagtacac catctttgct ttcgtccacg	750
	atcgtcgatg aaagcaaaca tcatgtacta gaattgacac tatcgatgca	800
30	gtcatcgcta aaaatagatt tgacgcaata caaaactcta gtactcgatc	850
	tttgctttca tcaaggatcg tcgatgaaag caaagatcgt gtgttacatt	900
	gcacattatt tcatcatcct aatatttcat catctttacg acacatgact	950
35	ttatcgatgt tgtttgacct cgttatattg tatcatatctt ggttatgatc	1000
	tcatttgagg atgatttcat cgatgatgat ctc	1033

40 <210> 7

<211> 1449

<212> ADN

<213> Nucleopoliedrovirus múltiple de *Spodoptera exigua*

45 <220>

<223> Genotipo AlPstM1449

50

55

60

65

ES 2 301 352 A1

<400> 7

	ccaatgaggt tgatgcaaaa tatggcgtga ttataacatc gtgatatcat	50
5	cgctaaaaat agatttgacg caatacaaaa ctctagtact cgatctttgc	100
	tttcgtccaa gatcttcgac gaaagcaaag atcatgtact aaaatttatt	150
	aaacatcatc gccaaaaata gatttgacac aatcaaaact ctagtacacg	200
10	atgtttgctt tcgtcgagga tcgtcgatga aagcaaagat catgtactaa	250
	acaaaaaaat tgtgtaatac taatatcata gctaaaaata gatttgacgc	300
	aatacaaaac tttggtacac gatctttgct ttcgtccaag atcttcgacg	350
15	aaagcaaaga tcatgtatta aacacatcat cgctaaaaat agatttgacg	400
	caatcaaaac tttagtacat gatctttgct ttcgtcgagg atcgtggata	450
	aaagcaaaga tcatgtacta aaatttatta aacacatcat cgataaaaaat	500
20	agatttgacg caactctcca tctttgcttt cgtcgaggat cgtcgatgaa	550
	agcaaagatc atgtactaaa atttattaaa cacatcatcg ataaaaatag	600
	atttgacgca atcaaaactc tagtactcga tctttgcttt cgtccaagat	650
25	cttcgacgaa agcaaagatc atgtactaga gtttttaagt ggtgttcaag	700
	atataccccg ttaatgtcaa cggtaaaaaat aaatggttac taaccattt	750
	gcagaaatac acgatctttg ctttcgtcca cgatcgtcga tgaaagcaaa	800
30	gatcatgtac tacgatttgc aattatgtca tcgctaaaaa tagatttgac	850
	gcaatacaat attctagtac acgatctttg ctttcgtcga cgattttgga	900
	cgaaagcaaa gatcatgtat taaaatttaa atcgacgcaa ttacgatattt	950
35	tgcaaacaaa catgatgact caagatttaa tacacaatct ttgctttcat	1000
	cgacgatctt cgacgaaagc aaagatcgta tactattgcg tcaattctat	1050
	ttttagcgat gatttaatac acaatcttac aaacttcgac gaaagcaaag	1100
40	atggtgtcaa gtttccgcaa tagaatagta caccatcttt gctttcgtcc	1150
	acgatcgtcg atgaaagcaa acatcatgta ctagaattga cactatcgat	1200
	gcagtcacgc atgcagtcac cgctaaaaat agatttgaca caatacaaaa	1250
45	ctctagtact cgatctttgc tttcgtccaa gatcgtcgat gaaagcaaag	1300
	atcgtgtatt acattgcaca ttatttcac atcctaatat ttcacatctt	1350
	ttacgacaca tgactttatc gatgttggtt gacctcgta tattgtatca	1400
50	tatttggttg atgatctcat ttgaggatga tttcatcgat gatgatctc	1449

<210> 8

55 <211> 923

<212> ADN

<213> Nucleopoliedrovirus múltiple de *Spodoptera exigua*

<220>

60 <223> Genotipo AlPstM0923

65

ES 2 301 352 A1

<400> 8

	ccaatgaggt tgatgcaaaa tatggcgtga tattgatatc atcgctaaaa	50
5	aatatggcgc gatattgata tcatcgctaa aaatagattt gacgcaatca	100
	aaactctagt actcgatctt tgctttcgtc gaggatcttc gatgaaagca	150
	aagatcatgt actagagttt ttaagtgggtg ttcaagatat accccggttaa	200
10	tgtcaacggt aaaaaataaat ggttactaac ccatttgcag aaatacacga	250
	tctttgcttt catccacgat cgtcgatgaa agcaaagatc atgtactacg	300
	at ttgcaatt atgtcatcgc taaaaataga ttgacgcaa tacaatattc	350
15	tagtactcga tctttgcttt cgtccaagat cgtcgatgaa agcaaagatc	400
	gtgtattaaa atttaaatcg acgcaattac gatttttgca aacaaacatg	450
	atgactcaag atttaataca caatctttga tttcatcgac gatcttcgac	500
20	gaaagcaaag atcgtgtact attgcgtcaa ttctattttt agcgatgatt	550
	taatacacaa tcttacaaac ttcgacgaaa gcaaagatgg tgtcaagttt	600
	ccgcaataga atagtacacc atctttgctt tcgtccacga tcgtcgatga	650
	aagcaaacat catgtactag aattgacact atcgatgcag tcatcgctaa	700
25	aaatagattt gacgcaatac aaaactctag tactcgatct ttgctttcat	750
	caaggatcgt cgatgaaagc aaagatcgtg tggtacattg cacattattt	800
	catcatccta atatttcac atctttacga cacatgactt tcatcgatgtt	850
30	gtttgacctc gttatattgt atcatatttg gttgatgatc tcatttgagg	900
	atgatttcat cgatgatgat ctc	923

<210> 9

35 <211> 657

<212> ADN

<213> Nucleopoliedrovirus múltiple de *Spodoptera exigua*

40 <220>

<223> Genotipo AIPstM0657

<400> 9

45	ccaatgaggt tgatgcaaaa tatggcgtga tattgatatc atcgctaaaa	50
	aatatggcgt gatattgata tcatcgctaa aaatagattt gacgcaatac	100
	aaaactctag tacatgatgt ttgctttcgt ccaagatctt cgatgaaagc	150
50	aaagatcatg tactaaaatt tattgaacat atcatcgcca aaaatagatt	200
	tgacgcaatc aaaactctag tactcgatct ttgctttcgt cgaggatctt	250
	cgatgaaagc aaagatcatg tactagagtt tttaagtgggt gttcaagata	300
	taccccggtta atgtcaacgg taaaaataaa tggttactaa cccatttgca	350
55	gaaatacacg atctttgctt tcatccacga tcgtcgatga aagcaaagat	400
	catgtactac gatttgcaat tatgtcatcg ctaaaaatag atttgacgca	450
	atacaatatt ctagtactcg atctttgctt tcgtccaaga tcgtcgatga	500
60	aagcaaagat cgtgtgttac attgcacatt atttcatcat cctaattattt	550
	catcatcttt acgacacatg actttatcga tggtgtttga cctcgttata	600
	ttgtatcata tttgggttgat gatctcattt gaggatgatt tcatcgatga	650
65	tgatctc	657



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ ES 2 301 352

⑫ Nº de solicitud: 200601065

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 26.04.2006

⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ Int. Cl.: C12N 7/01 (2006.01)
A01N 63/00 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	MURILLO, R. et al., "Application of the PCR-RFLP method for the rapid differentiation of Spodoptera exigua nucleopolyhedrovirus genotypes.", J. VIROL. METHODS, Jul. 2006, Vol. 135, No. 1, páginas 1-8. [Artículo publicado 'on line' el 21.02.2006]. Materiales y Métodos; Resultados; Figuras 1-3; Tabla 1.	1-8,22-28
X	MURILLO, R. et al., "Genetic and phenotypic variability in Spodoptera exigua nucleopolyhedrovirus isolates from greenhouse soils in southern Spain.", BIOLOGICAL CONTROL, Ago. 2006, Vol. 38, No. 2, páginas 157-165. [Artículo publicado 'on line' el 19.01.2006]. Materiales y Métodos; Resultados.	9-10, 22-28
A	MUÑOZ, D. et al., "Four genotypic variants of a Spodoptera exigua Nucleopolyhedrovirus (Se-SP2) are distinguishable by a hypervariable genomic region.", VIRUS RESEARCH, 1999, Vol. 59, No. 1, páginas 61-74. Todo el documento.	1-28
A	MURILLO, R. et al., "Effect of tinopal LPW on the insecticidal properties and genetic stability of the nucleopolyhedrovirus of Spodoptera exigua (Lepidoptera: Noctuidae).", J. ECON. ENTOMOL., 2003, Vol. 96, No. 6, páginas 1668-1674. Todo el documento.	1-28
A	MUÑOZ, D. et al., "In vivo recombination between two strains of the genus Nucleopolyhedrovirus in its natural host, Spodoptera exigua.", APPL. ENVIRON. MICROBIOL., 1997, Vol. 63, No. 8, páginas 3025-3031. Todo el documento.	1-28
A	IJKEL, W.F., et al., "Sequence and organization of the spodoptera exigua multicapsid nucleopolyhedrovirus genome.", J. GEN. VIROL., 1999, Vol. 80, No. 12, páginas 3289-3304. Todo el documento.	1-28

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
21.05.2008

Examinador
J.L. Vizán Arroyo

Página
1/1