

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 879 251**

51 Int. Cl.:

C07K 14/32 (2006.01)
C07K 14/325 (2006.01)
C12N 3/00 (2006.01)
C12N 15/75 (2006.01)
C12P 21/02 (2006.01)
A01N 63/00 (2010.01)
C12N 1/21 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.01.2018 PCT/EP2018/050288**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **12.07.2018 WO18127569**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.01.2018 E 18701107 (7)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.04.2021 EP 3565826**

54 Título: **Uso del gen regulador *cpcR* para obtener nuevas cepas recombinantes de *Bacillus Thuringiensis* con capacidad de esporulación reducida**

30 Prioridad:

05.01.2017 EP 17305011

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.11.2021

73 Titular/es:

**INSTITUT NATIONAL DE RECHERCHE POUR
L'AGRICULTURE, L'ALIMENTATION ET
L'ENVIRONNEMENT (50.0%)
147 rue de l'Université
75007 Paris, FR y
INSTITUTE OF PLANT PROTECTION, CHINESE
ACADEMY OF AGRICULTURAL SCIENCES
(50.0%)**

72 Inventor/es:

**LERECLUS, DIDIER;
SLAMTI, LEYLA;
SONG, FU PING;
DENG, CHAO y
ZHANG, JIE**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 879 251 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Uso del gen regulador *cpcR* para obtener nuevas cepas recombinantes de *Bacillus Thuringiensis* con capacidad de esporulación reducida

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere al uso de un gen regulador *cpcR* para reducir la esporulación de una cepa recombinante de *Bacillus thuringiensis*, una cepa recombinante de *Bacillus thuringiensis* que comprende el gen *cpcR* y usos del mismo en particular como biopesticidas.

Antecedentes de la invención

Bacterias y esporulación

- 10 Las especies de *Bacillus* son bacterias con forma de barra, aerobias o anaerobias, Gram positivas, que forman endosporas. Las numerosas especies del género son capaces de vivir en todos los entornos naturales. Se forma una única spora por célula. Las esporas son resistentes al calor, al frío, la radiación, la desecación, y los desinfectantes. Al inicio de la esporulación, se producen por *Bacillus sp.* metabolitos secundarios. Estos metabolitos secundarios pueden ser: enzimas, antibióticos e insecticidas.

- 15 *Bacillus larvae*, *Bacillus lentimorbus*, *Bacillus popilliae*, *Bacillus sphaericus*, y *Bacillus thuringiensis* son patógenos de grupos específicos de insectos (*Bacillus*, Medical Microbiology). Por tanto, algunos *bacillus* se emplean como los ingredientes activos de los insecticidas.

- 20 *Bacillus thuringiensis* (Bt) es una bacteria presente en el suelo, que produce esporas y sintetiza cristales que liberan proteínas que son tóxicas para los insectos y se clasifican como Cry1, -2, -3, -4, ..., según sus secuencias peptídicas (Crickmore *et al.*, 1998). Más en particular, las cepas Bt producen cristales insecticidas en la célula madre de la bacteria de esporulación que se emplean como biopesticidas para controlar insectos indeseados, tales como lepidópteros, coleópteros y mosquitos (Schnepf *et al.*, 1998). Al final de la esporulación, el cristal se encuentra a lo largo del interior de la spora. Los promotores de genes que codifican estas toxinas cristalinas son conocidos. Éstos son, por ejemplo, los promotores que controlan la expresión de genes *cry1*, *cry2*, *cry3*, *cry4* (Agaisse *et al.*, 1995; Deng *et al.*, 2014). Los promotores de los genes *cry1*, *cry2* y *cry4* son reconocidos por ARN polimerasas asociadas a los factores sigma específicos, Sigma E o Sigma K; los promotores de los genes *cry3* son reconocidos por la ARN polimerasa asociada al factor sigma vegetativo, Sigma A. Fan *et al.*, 2017 describe la regulación de la esporulación por el sistema YvcPQ de dos componentes en *Bacillus thuringiensis*. Wang *et al.*, 2010, describe la implicación de un regulador de respuesta, NprR, en la expresión del gen *cry* en *Bacillus thuringiensis*. Song *et al.*, 2017, describe mecanismos reguladores transcripcionales en múltiples genes *cry* en la cepa HD12 de *Bacillus thuringiensis*.

Toxinas cry

- 35 Las toxinas cry tienen actividades específicas frente a especies de insectos del Orden Lepidoptera, Diptera, Coleoptera, Hymenoptera y frente a nematodos. Cuando los insectos ingieren los cristales, sus tractos digestivos desnaturalizan los cristales, haciéndolos solubles y, por tanto, susceptibles de ser cortados por proteasas que se encuentran en el intestino del insecto, que libera la toxina del cristal (Schnepf *et al.*, 1998). La toxina Cry se inserta después en la membrana celular del intestino del insecto, que paraliza el tracto digestivo y forma una spora. Los insectos dejan de comer y mueren por inanición (Schnepf *et al.*, 1998).

Biopesticidas basados en Bt

- 40 El Bt se ha empleado con éxito como biopesticida durante más de 50 años (Bravo *et al.*, 2011 y Sanahuja *et al.*, 2011). Sin embargo, la eficacia de estos biopesticidas a base de Bt se han analizado sólo durante unos días en la superficie de las hojas. De hecho, la química de la superficie de la hoja, las proteasas y la luz solar contribuyen a la degradación de las proteínas Cry.

- 45 A día de hoy, todos los biopesticidas a base de Bt que se emplean a nivel mundial consisten en una mezcla de esporas y cristales. Sin embargo, las toxinas presentes en los cristales se destruyen rápidamente porque se liberan en el medio externo al final del proceso de esporulación. Además, la diseminación de las esporas bacterianas puede ser perjudicial para los seres humanos y para el medio ambiente.

Continúa la necesidad de proporcionar biopesticidas más seguros a base de Bt en donde se mejore la estabilidad de las toxinas Cry.

Descripción detallada de la invención

- 50 Para resolver estos problemas los inventores estudiaron una cepa Bt, denominada LM1212 que presenta la capacidad única de diferenciarse en productores de cristales o formadores de esporas. El análisis transcripcional sugiere que el fenotipo cristalino paraesporal es el resultado de un nuevo tipo de diferenciación celular asociado con un nuevo modo de regulación de la expresión del gen *cry* (Deng *et al.*, 2015). Como se especifica anteriormente,

5 todos los biopesticidas conocidos hasta ahora consisten en una mezcla de esporas y cristales. La caracterización inusual de la cepa LM1212, en la que el cristal no se produce en la célula madre de las células de esporulación, sino sólo en una subpoblación de células no esporulantes, amplían el conocimiento del inventor del fenotipo cristalino paraesporal en Bt. De este modo, los inventores han identificado de forma sorprendente e inesperada un único gen de secuencia reguladora presente en esta cepa LM1212 y denominado "cristal que produce reguladores celulares" (*cpcR*). Demostraron que la introducción de este gen *cpcR* en la cepa Bt habitual permite reducir drásticamente la tasa de esporulación.

Los inventores han caracterizado este gen regulador y su secuencia de nucleótidos, que comprende la secuencia SEQ ID NO: 1.

10 Por tanto, este CpcR regulador dirige la expresión de los promotores del gen *cry* en *Bacillus thuringiensis* LM1212.

Los inventores han demostrado también que el empleo de este regulador permite la expresión de genes *cry* heterólogos, como el gen *cry1Ab* que codifica una toxina activa de lepidópteros, y la producción de inclusiones cristalinas en células Bt no esporulantes.

15 Por otra parte, la introducción del gen *cpcR* en una cepa Bt típica reduce drásticamente su tasa de esporulación mientras que se mantiene o aumenta la expresión de genes *cry*. Los resultados obtenidos por los inventores indican que este sistema de expresión permite la producción de proteínas Cry insecticidas en un antecedente genético Spo⁺. Por tanto, la invención proporciona biopesticidas más seguros a base de Bt mediante la prevención de la diseminación de esporas bacterianas. Por otra parte, se mejora la producción y la estabilidad de las toxinas Cry en células bacterianas especializadas ya que las toxinas se protegen de la degradación medioambiental, tal como de la irradiación UV.

20 Por consiguiente, la presente invención se refiere al empleo del gen regulador *cpcR* de la secuencia SEQ ID NO: 1 para reducir la esporulación de una cepa recombinante de *Bacillus thuringiensis*.

La secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 1 es:

```

ATGAATCCTAATATACTTGTGATAAATGGTAATACGAAGAATCAAGAATTT
ATTCAAATCTCCTGATTATAAAGAAATTCATGATTGATACGGTAAATGATG
GTATAGAAGGAATTATTCGCTTTCAAAAGAAAGTGTACGATCTAGTTATACT
AGATGTTATGTCACCTAATTTAGATGGATTTAGTATATGTAAAATTATAAGA
TCACAATCTAAAGTGCCAATTATCATGTTATCTACAATAAAGGACGAAAGT
ATTGAGATTAAGGATTTCAATTTGGTATTGATGACTTTATTACTCTACCAT
GTTTCAGTTGAGCTATTTTATTATAGGATAGAAGCCATTCTACGAGGACGAAA
TTCAACTGATTCATTGTCATTAATACAGTTTCAAGAAATATCACTAAATCCT
GATTCGTATATAGTGTATCTTAATGGGCAGAAGAAAAGCTAACGACAAAA
GAATTTGATATGCTACATATATTTTTAAGAAATCCAGGGAAAGTATTATCTA
GAGAATTTTTGCTGAATCAAGTGTGGGGATATGATTATTATGGAGATCCACG
AGTCATAGATGCGTATATAAAAAAACTACGCAAAAAGTTAAGTATTCGGTA
TATAAAAACAATAACAGGCGTTGGTTATAAACTAGACACATAA
    
```

25 "Cepa recombinante" en la presente invención significa que uno o más fragmentos de genes o uno o más genes enteros se insertan mediante ingeniería genética, en una cepa parenteral.

30 "Reducción de la esporulación" en la presente invención significa que la tasa de esporulación de la cepa recombinante de Bt de la invención se reduce al menos dos veces, preferiblemente al menos 5 veces, más preferiblemente al menos 10 veces, aún más preferiblemente al menos 15 veces en comparación con la tasa de esporulación de la cepa Bt parental.

35 Para caracterizar el gen regulador *cpcR*, los inventores determinaron primero un fragmento de ADN de LM1212, responsable de la activación de un promotor de un gen que codifica una proteína Cry en el LM1212. Después, redujeron este fragmento de ADN hasta identificar el gen responsable de este efecto. Después de la identificación, los inventores validaron que *cpcR* es responsable de a) la activación de la expresión del gen *cry* en la cepa LM1212 y b) la reducción de la tasa de esporulación. Finalmente, los inventores ensayaron el empleo de *cpcR* en una cepa recombinante de Bt y obtuvieron una reducción de la tasa de esporulación y un incremento de la producción de Cry1Ab. Estos resultados confirman el interés del empleo del gen *cpcR* en una cepa recombinante de Bt y el empleo de esta cepa recombinante de Bt como nuevo biopesticida.

40 El regulador *cpcR* dirige la expresión de varios promotores de genes que codifican Cry y proteínas Cyt, dichos promotores tienen la secuencia de consenso SEQ ID NO:2. La secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 2 es:

X₁TGAA X₂AAA X₃X₄X₅X₆CAX₇X₈AX₉ATTTX₁₀CX₁₁TCX₁₂X₁₃X₁₄X₁₅X₁₆TX₁₇X₁₈AX₁₉ATGTX₂₀X₂₁TX₂₂GX₂₃TAX₂₄AX₂₅T
X₂₆X₂₇X₂₈X₂₉AX₃₀X₃₁TX₃₂X₃₃, con:

- 5 X₁=A o G; X₂=C o T; X₃=A o T; X₄=A, T o G; X₅=A, C o T; X₆=A o G; X₇=C o T; X₈=A o C; X₉=A, T o G; X₁₀=A o C, X₁₁=A o C, X₁₂=A, C o T; X₁₃=A, G o T; X₁₄=A o C; X₁₅=A, G o T; X₁₆=A o G; X₁₇=A o T; X₁₈=A, C o T; X₁₉=C o T; X₂₀=A o C; X₂₁=A, C o G; X₂₂=A o T; X₂₃=C o T; X₂₄=G o T; X₂₅=C o T; X₂₆=G o T; X₂₇=A o G; X₂₈=A o T; X₂₉=A, G o T; X₃₀=C, G o T; X₃₁=A o G; X₃₂=A o G; X₃₃=C o T.

Preferiblemente, el promotor activado por CpcR, se selecciona del grupo que consiste en; P₃₂ de la secuencia SEQ ID NO: 3, P₄₁ de la secuencia SEQ ID NO: 4, P₃₅ de la secuencia SEQ ID NO: 5, P₄₅ de la secuencia SEQ ID NO: 6.

Más preferiblemente, el promotor activado por CpcR es P₃₅.

- 10 Según la invención, los genes que codifican las proteínas activadas por CpcR en la cepa LM1212, son preferiblemente genes *cry*, más preferiblemente *cry32Va1*, *cry41Ca1*, *cry45Ba1*, *cry74Aa1*, *cry32Wa1* y similares a *cry35*, aún más preferiblemente *cry32Wa1* y similares a *cry35*.

Según la invención, los genes que codifican proteínas, en particular toxinas, producidas por la cepa recombinante de *Bacillus thuringiensis* son preferiblemente genes *cry* o genes *cyt*.

- 15 Preferiblemente, los genes *cry* y los genes *cyt* que codifican toxinas producidas por la cepa recombinante de la invención bajo el control de CpcR son:

1. genes *cry* que codifican toxinas activas frente a plagas de cultivo, específicamente de insectos lepidópteros y coleópteros. Estos genes *cry* pertenecen, por ejemplo, a las clases *cry1*, *cry2*, *cry3*, *cry8* o *cry9*.

- 20 2. genes *cry* que codifican toxinas activas frente a vectores de insectos de enfermedades humanas, específicamente insectos dípteros como mosquitos y mosca negra. Estos genes *cry* pertenecen, por ejemplo, a las clases *cry4* y *cry11*.

3. genes *cry* que codifican toxinas activas frente a nematodos. Estos genes *cry* pertenecen, por ejemplo, a las clases *cry5*, *cry6*, *cry14* y *cry21*.

- 25 4. genes *cyt* que codifican toxinas activas frente a vectores de insectos de enfermedades humanas, específicamente insectos dípteros como mosquitos y mosca negra. Estos genes *cyt* pertenecen, por ejemplo, a las clases *cyt1*, y *cyt2*.

Más preferiblemente, los genes que codifican toxinas producidas por la cepa recombinante de la invención bajo el control de CpcR son genes *cry1*, *cry2*, *cry3*, *cry4*, *cry5*, *cry6*, *cry8*, *cry9*, *cry11*, *cry14*, *cry21*, *cyt1* o *cyt2*.

- 30 El espectro de actividad de las toxinas Cry y Cyt frente a las plagas de insectos se describe en: Van Frankenhuisen, K., *et al.*, 2009. El espectro de actividad de las toxinas Cry frente a nematodos se describe en: Wei *et al.*, 2003.

Más preferiblemente, la toxina producida por la cepa recombinante de la invención es Cry1Ab, una toxina activa frente a lepidópteros, codificada por el gen *cry1Ab*.

- 35 Los inventores demostraron que la expresión del gen *cpcR* permite la expresión de genes *cry* heterólogos, tales como el gen *Cry1Ab*, y la producción de inclusiones cristalinas en células Bt no esporulantes.

La presente invención se refiere también a una cepa recombinante de *Bacillus thuringiensis*, que se caracteriza en que comprende:

A) Al menos un gen que codifica toxinas Cry y/o Cyt,

- 40 B) Al menos un promotor que tiene la secuencia SEQ ID NO: 2, que permite la expresión de dicho al menos único gen que codifica toxinas Cry y/o Cyt, y,

C) Un gen regulador de CpR de secuencia SEQ ID NO: 1, que dirige la expresión de dicho al menos único promotor.

La principal característica de esta cepa recombinante, en la presente invención, es su reducida tasa de esporulación en comparación con la cepa parenteral.

- 45 Según la invención, esta bacteria se puede emplear viva o muerta. De hecho, la viabilidad de la bacteria no se requiere para asegurar la actividad insecticida o nematocida de esta cepa recombinante de *Bacillus thuringiensis*. Ya que CpcR afecta negativamente a la esporulación, el número de esporas viables se reducirá o incluso suprimirá.

Preferiblemente, la cepa parenteral de *Bacillus thuringiensis kurstaki* HD73 (cepa tipo del serotipo 3a, 3b, 3c).

Preferiblemente, el promotor presente en la cepa recombinante de *Bacillus thuringiensis* se selecciona del grupo que consiste en: P₃₂ de la secuencia SEQ ID NO: 3, P₄₁ de la secuencia SEQ ID NO: 4, P₃₅ de la secuencia SEQ ID NO: 5, P₄₅ de la secuencia SEQ ID NO: 6.

Más preferiblemente, el promotor presente en la cepa recombinante de *Bacillus thuringiensis* es P₃₅.

- 5 Según la invención, el promotor se puede clonar en un plásmido, que es diferente al plásmido que porta el gen regulador *cpcR* o el promotor se puede clonar en el mismo plásmido que el gen regulador *cpcR*.

Más preferiblemente, el promotor se clona en el mismo plásmido que el gen regulador *cpcR*.

- 10 Según la invención, los genes que codifican las toxinas en la cepa recombinante de *Bacillus thuringiensis* son preferiblemente genes *cry* o *cyt*, más preferiblemente genes *cry1*, *cry2*, *cry3*, *cry4*, *cry5*, *cry6*, *cry8*, *cry9*, *cry11*, *cry14*, *cry21*, *cyt1* o *cyt2*, más preferiblemente genes *cry1*, *cry2*, *cry3*, *cry8* o *cry9*.

Preferiblemente, las toxinas producidas por la cepa recombinante de la invención son toxinas Cry1 y Cry2.

Más preferiblemente, la toxina producida por la cepa recombinante de la invención es Cry1Ab, una toxina activa de lepidópteros, codificada por el gen *cry1Ab*.

- 15 La presente invención se refiere también al empleo de la cepa recombinante de *Bacillus thuringiensis* como se describe anteriormente como biopesticida, en donde dicho uso no es un método para el tratamiento de un organismo humano o animal mediante terapia.

- 20 “Biopesticida” en la presente invención se refiere a pesticidas derivados de materiales naturales, tales como bacterias, por ejemplo, en la presente invención. Este término general “biopesticida” incluye el término “biocida” que se emplea más en un contexto de vectores de control, tales como los vectores que transmiten patógenos responsables de enfermedad des de mamíferos.

- 25 En una realización particular, la cepa recombinante de *Bacillus thuringiensis* se emplea para la protección de cultivos. El “biopesticida” que produce proteínas *Cry* reguladoras de *CpcR* se emplearán para controlar plagas de cultivos, específicamente de insectos lepidópteros, tales como los que pertenecen a las familias *Tortricidae*, *Noctuidae* y *Pyralidae*, que dañan a cultivos como los del algodón, repollo, maíz, soja, vid y otros cultivos de extensivo o de jardín.

Preferiblemente, las toxinas producidas por la cepa recombinante de la invención para la protección de cultivos son: toxinas Cry1, Cry2, Cry3, Cry8 y Cry9.

- 30 En otra realización particular, la cepa recombinante de *Bacillus thuringiensis* se emplean para controlar vectores, especialmente vectores que transmiten patógenos responsables de enfermedades humanas, tales como vectores de insectos, en particular mosquitos o mosca negra.

En tal realización particular, la cepa recombinante de *Bacillus thuringiensis* albergará genes *Cry* reguladores de *CpcR* que codifican toxinas específicamente activas frente a insectos dípteros.

Preferiblemente, las toxinas producidas por la cepa recombinante de la invención en el empleo de vectores de control son toxinas que pertenecen, por ejemplo, a las clases *Cyt1*, *Cry4* y *Cry11*.

- 35 En otra realización particular, la cepa recombinante de *Bacillus thuringiensis* se emplea para controlar nematodos, especialmente los responsables de enfermedades de mamíferos, preferiblemente enfermedades humanas. En dicha realización particular, la cepa recombinante de *Bacillus thuringiensis* albergará genes *Cry* regulados por *CpcR* que codifican toxinas específicamente activas frente a nematodos.

- 40 Preferiblemente, las toxinas producidas por la cepa recombinante de la invención en el empleo para controlar nematodos son toxinas que pertenecen, por ejemplo, a las clases *Cry5*, *Cry6*, *Cry14* y *Cry21*.

La presente invención se refiere también a un método para obtener una cepa recombinante de *Bacillus thuringiensis* como se describe anteriormente, que comprende las etapas de introducir en dicha cepa tanto:

- 45 1. una construcción genética que comprende al menos un gen que codifica una toxina bajo el control de un promotor que tiene la secuencia SEQ ID NO: 2, y
2. un sistema de expresión que comprende el gen regulador *cpcR* de la secuencia SEQ ID NO: 1.

Las dos etapas de este método se pueden realizar en el orden como se define anteriormente o en el orden contrario pero también de manera simultánea mediante la introducción de una construcción que porta los tres elementos citados.

Preferiblemente, la construcción genética como se define en la etapa 1 de dicho método y el sistema de expresión como se define en la etapa 2 de dicho método están en el mismo plásmido. En dicha realización, la etapa 1 y la etapa 2 se pueden realizar simultáneamente.

Preferiblemente, la cepa parenteral de *Bacillus thuringiensis* es el *Bacillus thuringiensis kurstaki* HD73.

- 5 Preferiblemente, el promotor que tiene la secuencia SEQ ID NO: 2 se selecciona del grupo que consiste en: P₃₂ de la secuencia SEQ ID NO: 3, P₄₁ de la secuencia SEQ ID NO: 4, P₃₅ de la secuencia SEQ ID NO: 5, P₄₅ de la secuencia SEQ ID NO: 6.

Más preferiblemente, dicho promotor es P₃₅ de secuencia SEQ ID NO: 2.

- 10 Preferiblemente, los genes que codifican una toxina son genes *cry1*, *cry2*, *cry3*, *cry4*, *cry5*, *cry6*, *cry8*, *cry9*, *cry11*, *cry14*, *cry21*, o *cyt*, más preferiblemente genes *cry1*, *cry2*, *cry3*, *cry8* o *cry9*.

Más preferiblemente, el gen que codifica una toxina es el gen *cry1Ab*.

- 15 El promotor que dirige la transcripción del gen *cpcR* es cualquier promotor funcional en Bt. La elección del promotor más apropiado puede depender en particular del tipo de expresión (*es decir*, constitutivo o inducible) que se desee obtener. Los promotores pueden ser promotores constitutivos, *es decir*, promotores que son activos en células y bajo la mayoría de las condiciones medioambientales, o promotores específicos de células que son activos sólo o principalmente en determinados tipos de células, y los promotores inducibles que se activan mediante estímulos físicos o químicos.

La construcción genética se realizará en plásmidos *Bacillus* en base a los replicones pBC16, pHT315 o pHT73 y que portan un gen *cry* descendente de un promotor regulado por CpcR.

- 20 La construcción genética se puede introducir en una cepa de *Bacillus thuringiensis* mediante electroporación (Lereclus *et al.*, 1989; Bone *et al.*, 1989; Koehler *et al.*, 1994; Mahillon *et al.*, 1999; Peng *et al.* 2009) mediante el empleo de un procedimiento de recombinación como el que se describe anteriormente (Lereclus *et al.*, 1992), o mediante conjugación heterogámica (Trieu-Cuot *et al.*, 1987).

- 25 Además de las características descritas anteriormente, la invención comprende además otras características que emergerán de la siguiente descripción, que se refiere a ejemplos que ilustran la presente invención, así como a las figuras adjuntas.

La Figura 1 muestra la construcción de una cepa de *Bacillus thuringiensis*.

La Figura 2 muestra la caracterización de un fragmento de ADN LM1212 que porta el gen *cpcR* que activa la transcripción del promotor P₃₅.

- 30 La Figura 3 muestra la expresión de *cry1Ab* bajo el control de CpcR y P₃₅ en una cepa *Kurstaki*. A) Plásmidos pHT16-18QP35'-*cry1Ab* y pHT-1c. B) Microscopio de contraste de fase de la cepa *Kurstaki* HD73 transformada con plásmidos pHT16-18QP35'-*cry1Ab* y pHT-1c. Las flechas indican algunas inclusiones de cristales.

- 35 La Figura 4 muestra el análisis de una toxina Cry1Ab producida en cepa *Kurstaki* bajo el control de CpcR y P₃₅. A) SDS-Page. M corresponde al peso molecular de marcadores. 1. 20 µL de extracto bruto de colonias de la cepa *Kurstaki* HD73 (pHT16-18, pHT304). 2. 20 µL de extracto bruto de colonias de la cepa *Kurstaki* HD73 (pHT16-18QP35'-*cry1Ab*, pHT304). 3. 20 µL de extracto bruto de colonias de la cepa *Kurstaki* HD73 (pHT16-18QP35'-*cry1Ab*, pHT-1c). Los extractos brutos se preparan del mismo modo y el empleo de 20 µL de extracto bruto significa que se carga la misma cantidad de cada preparación en la SDS-Page. B) Western Blot de las líneas 1, 2 y 3 frente al antisuero Cry1Ab.

- 40 La Figura 5 muestra el análisis transcripcional de la fusión P35'lacZ. A. Detalles de las construcciones. El panel superior muestra el fragmento de ADN 5a que porta el gen *cpcR*. Las dos líneas debajo de la representación esquemática de los locus *cpcR* indican las regiones de ADN empleadas para crear el fragmento 5a. El panel central destacado en gris oscuro muestra la organización del plásmido (pHT-5a-P35'Z) y el panel inferior destacado en gris claro muestra la organización de los plásmidos (pHT1618-5a) y (pHT-P35'Z). B. Ensayo β-galactosidasa de cepas HD (pHT-5a-P35'Z) en rombos gris oscuro y HD (pHT1618-5a) (pHT-P35'Z) en cuadrados gris claro. El tiempo indicado es relativo a t₀ que indica el inicio de la transición entre la fase exponencial y la estacionaria.

- 45 Ejemplo 1: Construcción de una cepa de *Bacillus thuringiensis* para ensayar la regulación de la expresión del promotor P₃₅.

- 50 Los resultados previos obtenidos por los inventores sugieren que, en la cepa LM1212, un sistema de regulación limita la producción de toxinas para la subpoblación de células no esporulantes. Por tanto, para ensayar los genes LM1212 responsables de la regulación del promotor P₃₅, el promotor que dirige la expresión del gen *cry*, los inventores introducen un sistema de notificación en una cepa de *Bacillus thuringiensis*, como se describe a continuación.

1)Materiales y Métodos

La cepa de Bt *Kurstaki* HD73 Cry se elige para clonar los genes LM1212 responsables de la activación del promotor P₃₅ y para el efecto negativo en la esporulación.

5 Se construye primero el plásmido termosensible pRN5101-AmyE-HD73::tet siguiendo el mismo procedimiento que el descrito en Verplaetse *et al.*, 2015, excepto en que el casete de resistencia antibiótica confiere resistencia a tetraciclina en lugar de a espectinomicina y que las regiones flanqueantes de *amyE* empleadas para la recombinación homóloga se amplificaron empleando ADN genómico Bt HD73 en lugar de Bt 407. Después se clona una fusión transcripcional P₃₅-lacZ entre los fragmentos *amy* superior y *amy* inferior clonados a partir de la cepa *Kurstaki*. La fusión P₃₅-lacZ se introduce después en el locus *amyE* del cromosoma *Kurstaki* HD73 mediante recombinación homóloga (Figura 1).

2)Resultados

La cepa resultante se designa Cry HD73 [*amyE*::P₃₅-lacZ].

Ejemplo 2: Caracterización de los genes LM1212 que activan la transcripción del promotor P₃₅.

i. Localización de los genes responsables de la expresión del promotor P₃₅ en el ADN de la cepa LM1212

15 1) Materiales y Métodos

El fragmento de ADN ORF28-ORF32 del plásmido PLM248 de la cepa LM1212 se clonó en el plásmido pHT304 (Arantes, O. *et al.*, 1991) y el plásmido resultante se denomina pHT-1a y se introdujo después en la cepa Bt HD73 Cry [*amyE*::P₃₅-lacZ] y los clones recombinantes se aislaron en placas HCT (0,7% de hidrolizado de caseína, 0,5% de triptona, 0,68% KH₂ PO₄, 0,012% MgSO₄·7H₂O, 0,00022% MnSO₄·4H₂O, 0,0014% ZnSO₄·7H₂O, 0,008% de citrato férrico amónico, 0,018% CaCl₂·4H₂O, 0,3% glucosa, pH 7,2) (Lecadet *et al.*, 1980; Verplaetse *et al.*, 2016) que contiene extracto de levadura (0,05%), glucosa 0,3% y X-Gal (100 µg/mL).

2)Resultados

25 Las cepas parentales proporcionan colonias blancas. Por lo contrario, la cepa que alberga el plásmido pHT-1a proporciona colonias azules (Figura 2). Este resultado indica que los genes responsables de la expresión del promotor P₃₅ se localizan en el fragmento de ADN 1a que corresponde al LM1212 ORF28 a 32.

ii. Identificación de los genes implicados en la actividad transcripcional

1)Materiales y Métodos

30 Se sub-clonó la región de ADN ORF28 a 32 en el plásmido pHT304 y los plásmidos resultantes se transformaron en la cepa Bt HD73 Cry [*amyE*::P₃₅-lacZ] (Figura 2).

2)Resultados

35 Parece que el ORF28 que codifica un regulador transcripcional es suficiente para activar la transcripción dirigida por P₃₅. Sin embargo, esta actividad se obtiene si un fragmento de ADN corto localizado en la parte ascendente del ORF29 se fusiona en la parte ascendente de ORF28 (Fragmento 1e, Figura 2). ORF28 codifica un regulador transcripcional que pertenece a la familia de los reguladores de respuestas, lo que sugiere que debería actuar como un sistema de dos componentes en asociación con una histidina quinasa. Dicha quinasa puede estar codificada por ORF32.

40 Sin embargo, los resultados muestran que ORF28 en solitario es capaz de activar el promotor P₃₅. En el análisis *in silico* de estos genes (ORF28 a 32) indica que ORF28 es único y no se encuentra en las secuencias disponibles de las bacteria del grupo *B. cereus* (aproximadamente 100 genomas).

Por el contrario, ORF32 está muy conservado en todas las bacterias del grupo *B. cereus*, que incluyen la LM1212.

45 Por tanto, ORF28 puede funcionar como un regulador de la respuesta activado por histidina quinasa presente de manera natural en la cepa *Kurstaki* HD73.

iii. Efecto del plásmido pHT-1c en la esporulación de las bacterias.

1)Materiales y Métodos

Se introduce pHT-1c, que corresponde al plásmido pHT304 que porta el gen ORF28 y una región promotora, en la cepa Bt HD73 Cry [*amyE*::P₃₅-lacZ].

2)Resultados

La introducción de pHT-1c en la cepa Bt HD73 Cry [amyE::P₃₅-lacZ] afecta negativamente a la esporulación mediante un factor de 10 veces (Tabla 1).

Cepas	Esporas resistentes al calor (CFU/ml) ^a
HD73 amyE::P _{cry35} -lacZ (pHT304)	5,25E+08 (±5,25E+07)
HD73 amyE::P _{cry35} -lacZ (pHT304-1c)	4,99E+07 (±9,42E+06)

5 Tabla 1. Efecto del fragmento de ADN 1c que porta el gen *cpcR* en la esporulación de la tinción de la cepa HD37 de *B. thuringiensis*. Los resultados son la media de dos experimentos independientes. ^aLas bacterias se cultivaron en medio HCT líquido (que contiene Extracto de levadura al 0,05% y Glucosa al 0,3%) a 30°C. 48 horas después de la inoculación, las alícuotas se calentaron a 80°C durante 12 minutos. Las células se incubaron y a continuación se contaron las UFCs correspondientes a las esporas resistentes al calor.

10 iv. Conclusión

Estos datos indican que el gen correspondiente a ORF28 codifica el regulador (designado como CpcR) responsable de dos funciones: i) la activación de la expresión del gen *cry* en la cepa LM1212, y ii) la reducción de la tasa de esporulación.

15 Los resultados también sugieren que ORF28 funciona como un sistema de dos componentes asociado con una quinasa existente en todas las cepas de Bt. Este gen es responsable del fenotipo específico de la cepa LM1212, el cual se diferencia entre productores de cristales o productores de esporas.

Ejemplo 3: Uso del regulador de *cpcR* para producir Cry1Ab en células Bt no esporulantes

20 Para validar el empleo de CpcR en una cepa Bt para reducir su esporulación mientras se mantiene la producción de toxinas, los inventores produjeron cepas recombinantes de Bt y analizaron la tasa de esporulación de esta cepa recombinante y la producción de la toxina Cry1Ab.

1)Materiales y Métodos

25 a)el gen *cry1Ab*, un gen *cry* dependiente de la esporulación, se amplificó por PCR a partir de la cepa *kurstaki* HD1 (el biopesticida *kurstaki* HD1 Dipel®) y se clonó en la zona descendente del promotor P₃₅ en el plásmido pHT16-18 (Lereclus *et al.*, 1992). El plásmido resultante, pHT16-18ΩP₃₅-*cry1Ab* (es decir, el plásmido pHT16-18 que porta el gen *cry1Ab* de la cepa *kurstaki* HD1 Dipel® bajo el control del promotor P₃₅) se transforma en la cepa Bt HD73 Cry. La cepa resultante se transformó después con el plásmido pHT-1c que porta el gen *cpcR*. Las bacterias se incubaron en placas de agar HCT durante 48 horas a 30°C y se examinaron en un microscopio de contraste de fases (Figura 3).

30 b)Las proteínas producidas por estas cepas recombinantes se analizaron mediante western blot con antisuero frente a la toxina Cry1Ab (Figura 4).

2)Resultados

35 a)Los resultados muestran la producción de la inclusión cristalina típica en células no esporulantes de la cepa *kurstaki* que alberga plásmidos pHT16-18ΩP₃₅-*cry1Ab* y pHT-1c. Por otra parte, la tasa de esporulación de la cepa recombinante que porta pHT16-18ΩP₃₅-*cry1Ab* y pHT-1c es significativamente más baja que la cepa de tipo salvaje.

b)La producción de Cry1Ab aumenta considerablemente en la cepa *kurstaki* que alberga el gen *cpcR* y la fusión P₃₅-Cry1Ab (Paneles A y B, Líneas 3).

La banda tenue de Cry1Ab observada en las líneas 2 resulta de la baja expresión independiente de CpcR de *Cry1Ab*.

40 Estos resultados muestran que la invención proporciona un nuevo rango de biopesticidas mediante el modo de producir toxinas Cry insecticidas en cepas Bt no esporulantes.

Ejemplo 4: La transcripción del promotor P₃₅ es mayor cuando se clona en el mismo plásmido que CpcR

1)Materiales y Métodos

45 El fragmento de ADN designado 5a y comprendido de ORF28, la región intergénica entre ORF28 y ORF29 y la región intergénica entre ORF29 y ORF30, se clonó en la zona ascendente de la fusión transcripcional entre P₃₅

y el gen marcador *lacZ* en el vector pHT304.18 (que tienen la misma estructura que el vector pHT304, pero el sitio de clonación está en la orientación opuesta al del vector pHT304), proporcionando un plásmido pHT-5a-P35'Z, o en solitario en el vector pHT1618, proporcionando el plásmido pHT1618-5a. El último se transformó en la cepa Bt HD73 Cry junto con pHT-P35'Z, que proporciona la cepa HD (pHT1618-5a) (pHT-P35'Z). El plásmido pHT-5a-P35'Z se transformó también en la cepa Bt HD73 Cry, proporcionando la cepa HD (pHT-5a-P35'Z). Las células se incubaron en HCT líquido que contiene extracto de levadura al 0,05% y glucosa al 0,3%. Las muestras se cultivaron y se ensayó la actividad β -galactosidasa (Perchat *et al.*, 2011).

2)Resultados

La Figura 5 muestra que aunque P35 es activo tanto en la cepa HD (pHT1618-5a) (pHT-P35'Z) (cuadros gris claro) y HD (pHT-5a-P35'Z) (rombos gris oscuro), su actividad es mayor en la cepa HD (pHT-5a-P35'Z), en particular es 14 veces superior después de 4 horas (1200 unidades frente a 17000 unidades, respectivamente).

Referencias

Agaisse, H. *et al.*, *J. Bacteriol.* 1995. 177: 6027-6032.

Arantes, O. *et al.*, *Gene* 1991. 108: 115-119.

Bone, E.J. *et al.*, *FEMS Microbiol Lett.* 1989. 49(2-3): 171-177.

Bravo A. *et al.*, *Insect Biochem Mol Biol.* 2011. 41: 423-431.

Crickmore, N. *et al.*, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 1998. 62: 807-813.

Deng C. *et al.*, *Toxins* 2014. 6: 2194-2209.

Deng C. *et al.*, *The ISME Journal.* 2015. 9: 286-296.

Fan Q. *et al.*, *Acta Microbiol. Sinica.* 2017. 57(1): 121-130.

Fromm *et al.*, *Nature* 1990. 319: 791-793.

Koehler TM, *et al.*, *J. Bacteriol.* 1994. 176(3): 586-595.

Lecadet M *et al.*, *Microbiology.* 1980. 121: 1: 203-212.

Lereclus, D. *et al.*, *FEMS Microbiol. Lett.* 1989. 60: 211-217.

Lereclus, D. *et al.*, *Nature Biotechnology.* 1992. 10: 418-421.

Lereclus, D. *et al.*, *Mol. Microbiol.* 1992. 7: 35-46.

Mahillon, J. *et al.*, Eynard y Teissie (Eds.) Springer Lab. Manual 1999. 242-252.

Peng, D. H., *et al.*, *J. Appl. Microbiol.* 2009. 106: 1849-1858.

Perchat S. *et al.*, *Molecular Microbiology.* 2011. 82: 619-633.

Sanahuja G. *et al.*, *Plant Biotechnol Journal.* 2011. 9: 283-300.

Schnepf, E. *et al.*, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 1998. 62: 775-806.

Song Z.-r *et al.*, *J. Integr. Agricult.* 2017. 16(1): 135-143.

Trieu-Cuot, P. *et al.*, *FEMS Microbiol Lett* 1987. 48: 289-294.

Van Frankenhuizen. K. *et al.*, *J. Invertebr. Pathol.* 2009. 101: 1-16.

Verplaetse. E. *et al.*, *MBio* 2015. 6: e136008-15.

Verplaetse E. *et al.*, *Res Microbiol.* 2016. doi: 10.1016/j.resmic.2016.03.006.

Wang *et al.*, *Acta Microbiol. Sinica.* 2010. 50(11): 1550-1555.

Wei J-Z. *et al.*, *PNAS* 2003. 100(5): 2760-2765.

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE
 INSTITUTE OF PLANT PROTECTION, CHINESE ACADEMY OF AGRICULTURAL SCIENCES
 5 LERECLUS, Didier
 SLAMTI, Leyla
 SONG, Fu Ping
 DENG, Chao
 ZHANG, Jie
- 10 <120> Uso del gen regulador *cpcR* para obtener nuevas cepas recombinantes de *Bacillus Thuringiensis* con capacidad de esporulación reducida
- 15 <130> F539/186
 <150> EP17305011.3
 <151> 05-01-2017
- 20 <160> 6
 <170> PatentIn versión 3.5
- 25 <210> 1
 <211> 663
 <212> ADN
 <213> *Bacillus thuringiensis*
- <400> 1
 atgaatccta atatacttgt gataaatggt aatacgaaga atcaagaatt tattcaaaat 60
 ctctctgatta taaagaaatt catgattgat acggtaaattg atggtataga aggaattatt 120
 cgctttcaaa agaaagtgta cgatctagtt atactagatg ttatgtcacc taatttagat 180
 ggatttagta tatgtaaaat tataagatca caatctaaag tgccaattat catgttatct 240
 acaataaaagg acgaaagtat tgagattaaa ggatttcaat ttggtattga tgactttatt 300
 actctaccat gttcagttga gctattttat tataggatag aagccattct acgaggacga 360
 aattcaactg attcattgtc attaatacag tttcaagaaa taccactaaa tcctgattcg 420
 tatatagtgt atcttaatgg gcagaagaaa aagctaacga caaaagaatt tgatatgcta 480
 catatatttt taagaaatcc agggaaagta ttatctagag aatttttgct gaatcaagtg 540
 tggggatatg attattatgg agatccacga gtcatagatg cgtatataaa aaaactacgc 600
 aaaaagttaa gtattccgta tataaaaaaca ataacaggcg ttggttataa actagacaca 660
 taa 663
- 30 <210> 2
 <211> 65
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
- 35 <220>
 <223> Promotor activado por secuencia de consenso de CpcR
- 40 <220>
 <221> Variante
 <222> (1)..(1)
 <223> Sustituir = a
- 45 <220>
 <221> Variante
 <222> (6).. (6)

- <223> Sustituir = t
- <220>
<221> Variante
5 <222> (11)..(11)
<223> Sustituir = t
- <220>
<221> Variante
10 <222> (12)..(12)
<223> Sustituir = t o g
- <220>
<221> Variante
15 <222> (13)..(13)
<223> Sustituir = c o t
- <220>
<221> Variante
20 <222> (14)..(14)
<223> Sustituir = a
- <220>
<221> Variante
25 <222> (17)..(17)
<223> Sustituir = t
- <220>
<221> Variante
30 <222> (18)..(18)
<223> Sustituir = c
- <220>
<221> Variante
35 <222> (20)..(20)
<223> Sustituir = t o g
- <220>
<221> Variante
40 <222> (25)..(25)
<223> Sustituir = a
- <220>
<221> Variante
45 <222> (27)..(27)
<223> Sustituir = c
- <220>
<221> Variante
50 <222> (30)..(30)
<223> Sustituir = c o t
- <220>
<221> Variante
55 <222> (31)..(31)
<223> Sustituir = a o g
- <220>
<221> Variante
60 <222> (32)..(32)
<223> Sustituir = c
- <220>
<221> Variante
65 <222> (33)..(33)
<223> Sustituir = g o t

- 5 <220>
<221> Variante
<222> (34)..(34)
<223> Sustituir = g
- 10 <220>
<221> Variante
<222> (36)..(36)
<223> Sustituir = t
- 15 <220>
<221> Variante
<222> (37)..(37)
<223> Sustituir = c o t
- 20 <220>
<221> Variante
<222> (39)..(39)
<223> Sustituir = t
- 25 <220>
<221> Variante
<222> (44)..(44)
<223> Sustituir = c
- 30 <220>
<221> Variante
<222> (45)..(45)
<223> Sustituir = c o g
- 35 <220>
<221> Variante
<222> (47)..(47)
<223> Sustituir = a
- 40 <220>
<221> Variante
<222> (49)..(49)
<223> Sustituir = t
- 45 <220>
<221> Variante
<222> (52)..(52)
<223> Sustituir = t
- 50 <220>
<221> Variante
<222> (54)..(54)
<223> Sustituir = c
- 55 <220>
<221> Variante
<222> (56)..(56)
<223> Sustituir = t
- 60 <220>
<221> Variante
<222> (57)..(57)
<223> Sustituir = g
- 65 <220>
<221> Variante
<222> (58)..(58)
<223> Sustituir = t

ES 2 879 251 T3

<220>
 <221> Variante
 <222> (59)..(59)
 <223> Sustituir = g o t
 5
 <220>
 <221> Variante
 <222> (61)..(61)
 <223> Sustituir = g o t
 10
 <220>
 <221> Variante
 <222> (62)..(62)
 <223> Sustituir = a
 15
 <220>
 <221> Variante
 <222> (64)..(64)
 <223> Sustituir = g
 20
 <220>
 <221> Variante
 <222> (65)..(65)
 <223> Sustituir = t
 25
 <400> 2
gtgaataaaa aaagcacaaa atttccatca tcagttaaca tgtaattgct agattgaaaa 60
cgtac 65
 30
 <210> 3
 <211> 65
 <212> ADN
 <213> Bacillus thuringiensis
 <400> 3
gtgaacaaaa agtacaatcaa atttccatcc tcggtttaca tgtacttgct atattggaga 60
 35 **ggtac** 65
 <210> 4
 <211> 65
 <212> ADN
 40 <213> Bacillus thuringiensis
 <400> 4
gtgaacaaaa aacacatcag atttccatct gagatttaca tgtacttgct atattggtaa 60
ggtac 65
 45 <210> 5
 <211> 65
 <212> ADN
 <213> Bacillus thuringiensis
 50 <400> 5
gtgaataaaa taagcacaat atttccctca tcagttcata tgtcattgct agactgaaga 60
tgtat 65
 <210> 6
 <211> 65
 55 <212> ADN
 <213> Bacillus thuringiensis
 <400> 6

ES 2 879 251 T3

atgaataaaa ttgcacaag atttaccatca actataaaca tgtagtagtt atatttaata 60
catgt 65

REIVINDICACIONES

1. Uso del gen regulador *cpcR* de la secuencia SEQ ID NO: 1 para reducir la esporulación de una cepa recombinante de *Bacillus thuringiensis*.
- 5 2. El uso del gen *cpcR* como se reivindica en la reivindicación 1, en donde dicho regulador *cpcR* dirige la expresión de promotores de genes que codifican proteínas Cry y Cyt, dichos promotores tienen la secuencia SEQ ID NO: 2 como sigue:
 $X_1TGAAX_2AAAAX_3X_4X_5X_6CAX_7X_8AX_9ATTTX_{10}CX_{11}TCX_{12}X_{13}X_{14}X_{15}X_{16}TX_{17}X_{18}AX_{19}ATGTX_{20}X_{21}TX_{22}GX_{23}TAX_{24}AX_{25}T$
 $X_{26}X_{27}X_{28}X_{29}AX_{30}X_{31}TX_{32}X_{33}$, con: $X_1=A$ o G ; $X_2=C$ o T ; $X_3=A$ o T ; $X_4=A$, T o G ; $X_5=A$, C o T ; $X_6=A$ o G ; $X_7=C$ o T ; $X_8=A$ o C ; $X_9=A$, T o G ; $X_{10}=A$ o C , $X_{11}=A$ o C , $X_{12}=A$, C o T ; $X_{13}=A$, G o T ; $X_{14}=A$ o C ; $X_{15}=A$, G o T ; $X_{16}=A$ o G ; $X_{17}=A$ o T ; $X_{18}=A$, C o T ; $X_{19}=C$ o T ; $X_{20}=A$ o C ; $X_{21}=A$, C o G ; $X_{22}=A$ o T ; $X_{23}=C$ o T ; $X_{24}=G$ o T ; $X_{25}=C$ o T ; $X_{26}=G$ o T ; $X_{27}=A$ o G ; $X_{28}=A$ o T ; $X_{29}=A$, G o T ; $X_{30}=C$, G o T ; $X_{31}=A$ o G ; $X_{32}=A$ o G ; $X_{33}=C$ o T .
- 10 3. El uso del gen *cpcR* como se reivindica en la reivindicación 2, caracterizada en que el promotor se selecciona del grupo que consiste en: P₃₂ de la secuencia SEQ ID NO: 3, P₄₁ de la secuencia SEQ ID NO: 4, P₃₅ de la secuencia SEQ ID NO: 5, P₄₅ de la secuencia SEQ ID NO: 6.
- 15 4. El uso del gen *cpcR* como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado en que los genes que codifican toxinas son genes *cry* o genes *cyt*.
5. El uso del gen *cpcR* como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado en que la cepa de *Bacillus* comprende genes *cry1*, *cry2*, *cry3*, *cry4*, *cry5*, *cry6*, *cry8*, *cry9*, *cry11*, *cry14*, *cry21*, *cyt1* o *cyt2*.
6. Una cepa recombinante de *Bacillus thuringiensis* caracterizada en que comprende:
 - 20 a) Al menos un gen que codifica toxinas Cry y/o Cyt,
 - b) Al menos un promotor que tiene la secuencia SEQ ID NO: 2, que permite la expresión de dicho al menos único gen que codifica toxinas Cry y/o Cyt, y,
 - c) Un gen regulador *cpcR* de secuencia SEQ ID NO: 1, que dirige la expresión de dicho al menos único promotor.
- 25 7. La cepa recombinante de *Bacillus thuringiensis* como se reivindica en la reivindicación 6, caracterizada en que el promotor se selecciona del grupo que consiste en: P₃₂ de la secuencia SEQ ID NO: 3, P₄₁ de la secuencia SEQ ID NO: 4, P₃₅ de la secuencia SEQ ID NO: 5, P₄₅ de la secuencia SEQ ID NO: 6.
8. La cepa recombinante de *Bacillus thuringiensis* como se reivindica en la reivindicación 6 o en la reivindicación 7, caracterizada en que el promotor se clona en el mismo plásmido que el gen regulador *cpcR*.
- 30 9. La cepa recombinante de *Bacillus thuringiensis* como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, caracterizada en que los genes que codifican toxinas son genes *cry* o genes *cyt*.
10. La cepa recombinante de *Bacillus thuringiensis* como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, caracterizada en que la cepa de *Bacillus* comprende genes *cry1*, *cry2*, *cry3*, *cry4*, *cry5*, *cry6*, *cry8*, *cry9*, *cry11*, *cry14*, *cry21*, *cyt1* o *cyt2*.
- 35 11. Uso de una cepa recombinante de *Bacillus thuringiensis* como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10 como biopesticida, en donde dicho uso no es un método para el tratamiento del organismo humano u animal mediante terapia.
12. El uso de la cepa recombinante de *Bacillus thuringiensis* como se reivindica en la reivindicación 11 para proteger cultivos, en donde dicho uso no es un método para el tratamiento del organismo humano u animal mediante terapia.
- 40 13. El uso de la cepa recombinante de *Bacillus thuringiensis* como se reivindica en la reivindicación 11 para controlar vectores, especialmente vectores que transmiten patógenos responsables de enfermedades en mamíferos, tales como vectores de insectos, en particular mosquitos o mosca negra, en donde dicho uso no es un método para el tratamiento del organismo humano u animal mediante terapia.
- 45 14. El uso de la cepa recombinante de *Bacillus thuringiensis* como se reivindica en la reivindicación 11 para controlar nematodos, especialmente los responsables de enfermedades humanas, en donde dicho uso no es un método para el tratamiento del organismo humano u animal mediante terapia.
15. Un método para obtener una cepa recombinante de *Bacillus thuringiensis*, que comprende las etapas de introducir en dicha cepa tanto:
 - 50 1. una construcción genética que comprende al menos un gen que codifica una toxina bajo el control de un promotor que tiene la secuencia SEQ ID NO: 2, y

2. un sistema de expresión que comprende el gen regulador *cpcR* de la secuencia SEQ ID NO: 1.

16. El método para obtener una cepa recombinante de *Bacillus thuringiensis* como se reivindica en la reivindicación 15, en donde la construcción genética como se define en la etapa 1 de la reivindicación 15 y el sistema de expresión como se define en la etapa 2 de la reivindicación 15 están en el mismo plásmido.

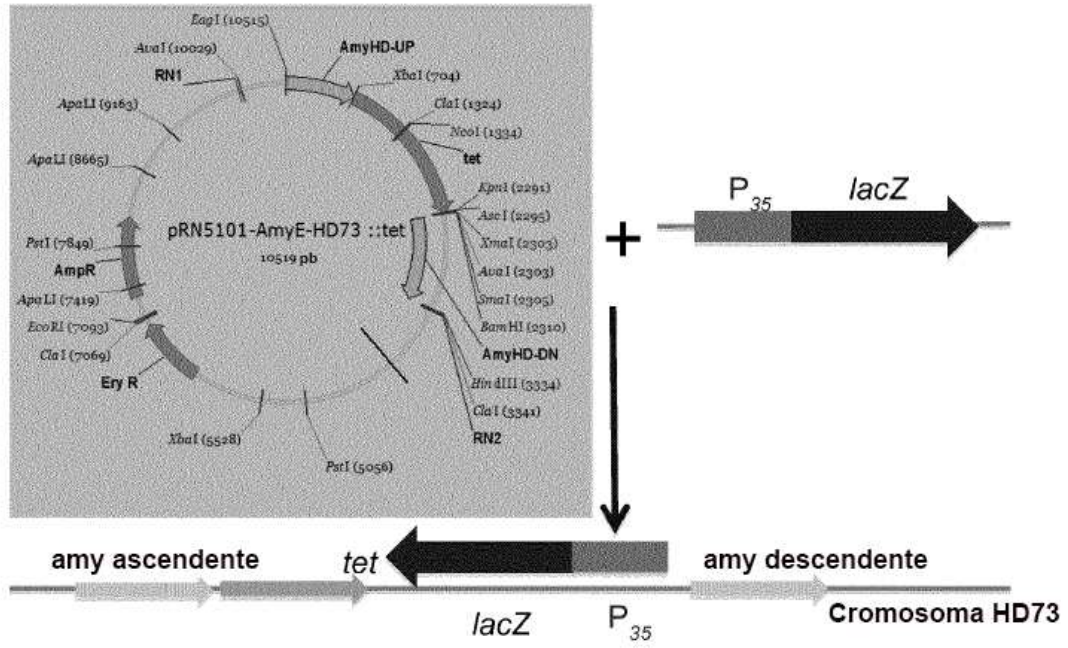


Figura 1

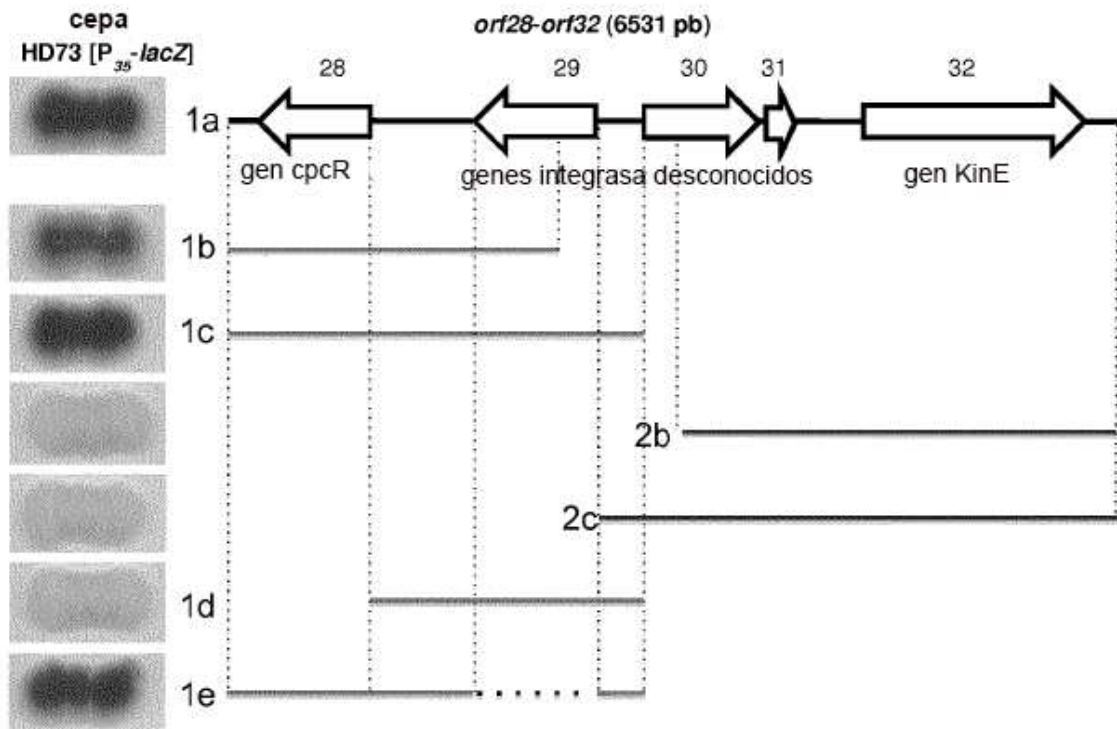


Figura 2

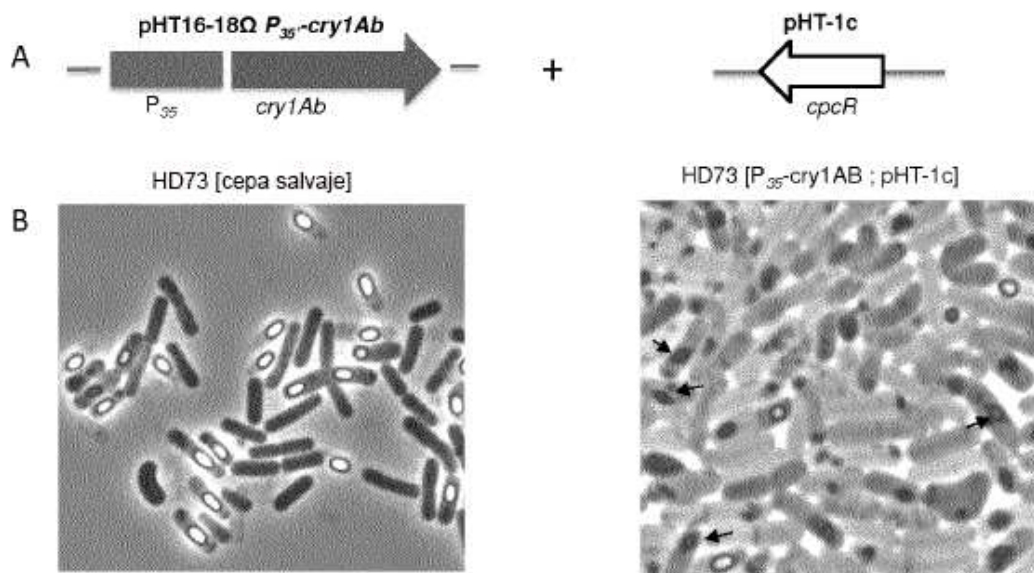


Figura 3

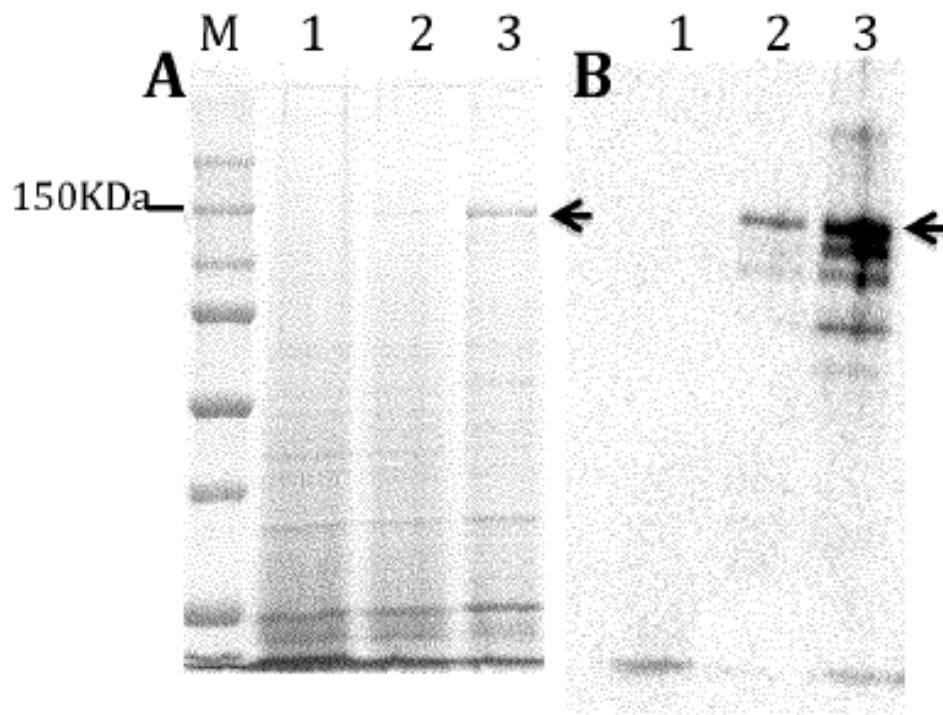


Figura 4

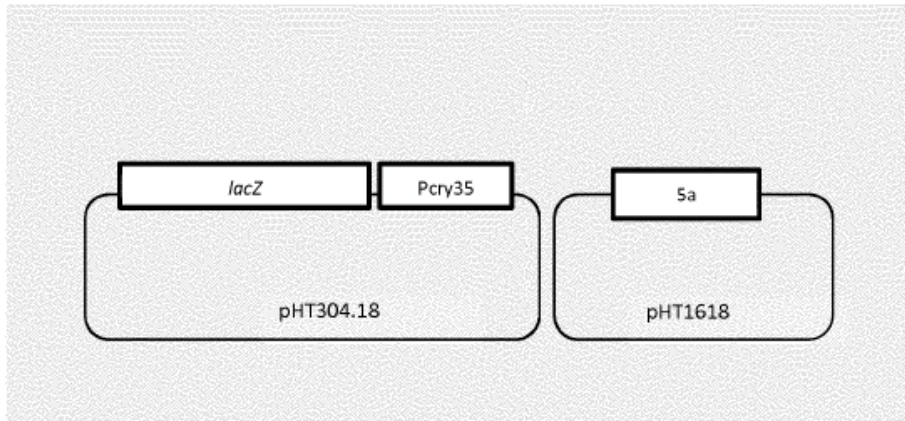
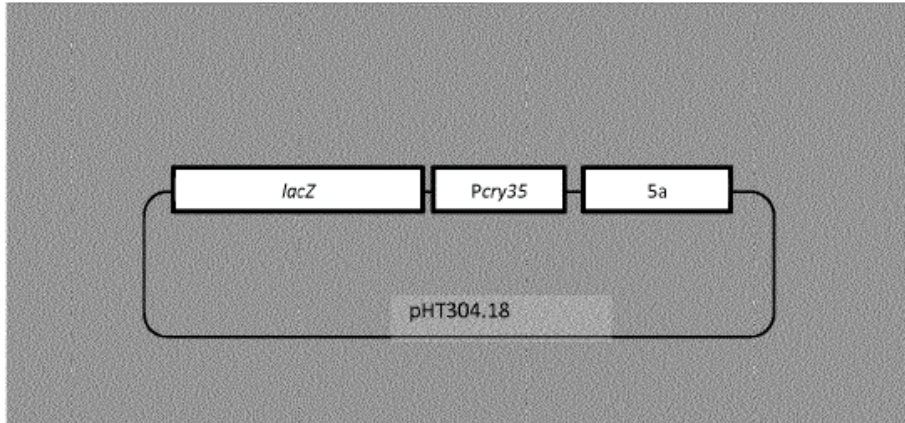
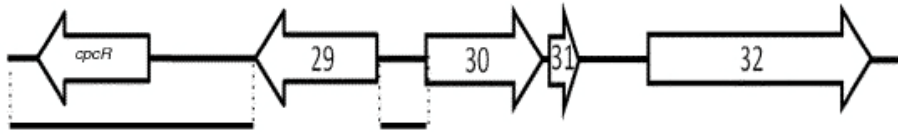
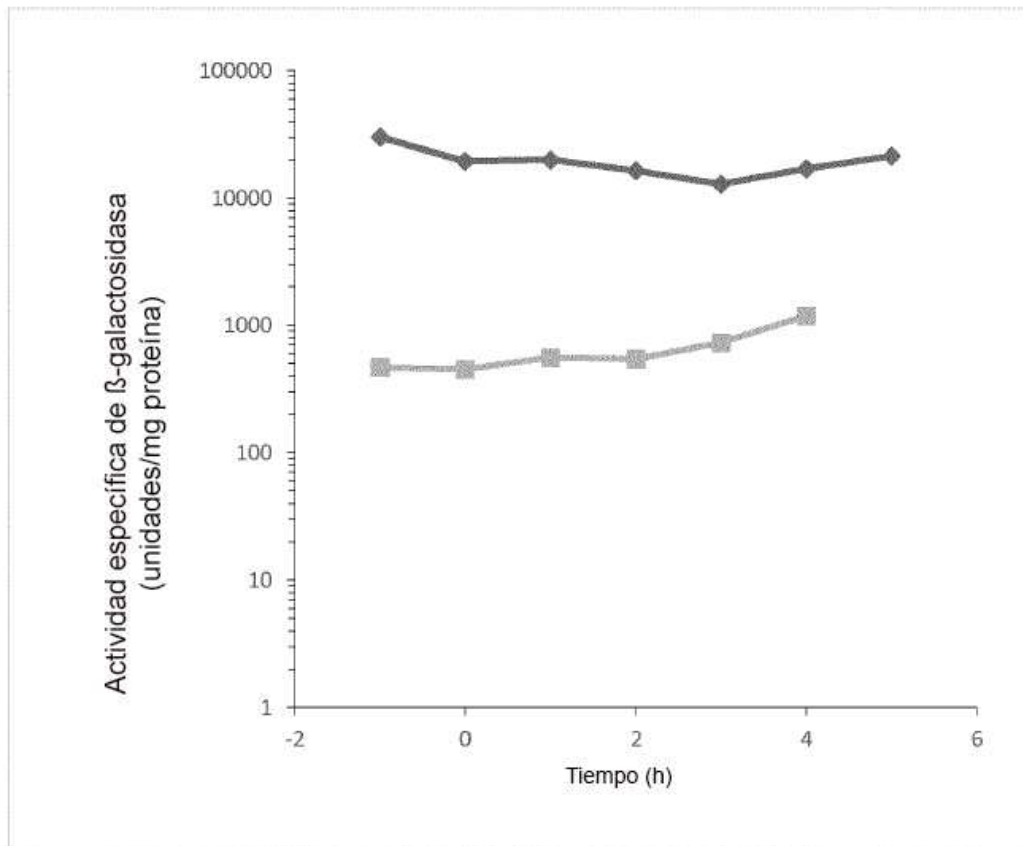


Figura 5A



- ◆ Cepa HD (pHT-5a-P35'Z)
- Cepa HD (pHT1618-5a) (pHT-P35'Z)

Figura 5B