

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 986 336**

51 Int. Cl.:

C12N 15/32 (2006.01)

A01H 5/10 (2008.01)

C07K 14/325 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.12.2015** **PCT/US2015/063610**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.06.2016** **WO16094159**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.12.2015** **E 15867122 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.05.2024** **EP 3230456**

54 Título: **Composiciones y métodos para controlar plagas en plantas**

30 Prioridad:

12.12.2014 US 201462090899 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.11.2024

73 Titular/es:

SYNGENTA CROP PROTECTION AG (100.0%)
Rosentalstrasse 67
4058 Basel, CH

72 Inventor/es:

BRAMLETT, MATTHEW RICHARD;
SEGUIN, KATHERINE;
KRAMER, VANCE CARY y
ROSE, MARK SCOTT

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 986 336 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

Composiciones y métodos para controlar plagas en plantas

5 REFERENCIA A UNA LISTA DE SECUENCIAS PRESENTADA EN FORMATO ELECTRÓNICO

La copia oficial de la lista de secuencias se presenta en formato electrónico a través del sistema EFS-Web como una lista de secuencia con formato ASCII y con el nombre de archivo "80668-US-L-ORG-NAT-1_SeqList.txt", el cual fue creado el 5 de diciembre de 2014 y tiene un tamaño de 135 kb y se presenta junto con la presente memoria

descriptiva. La lista de secuencias incluida en este documento con formato ASCII es parte de la memoria descriptiva.

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a proteínas plaguicidas y moléculas de ácido nucleico que las codifican, así como a composiciones y métodos para controlar plagas en plantas.

ANTECEDENTES

Bacillus thuringiensis (Bt) es una bacteria del suelo formadora de esporas grampositiva caracterizada por su capacidad para producir inclusiones cristalinas que son específicamente tóxicas para ciertos órdenes y especies de plagas de plantas, incluidos insectos, pero son inofensivas para plantas y otros organismos no diana. Es por ello, que se pueden utilizar las composiciones que comprenden las cepas de *Bacillus thuringiensis* o sus proteínas insecticidas como insecticidas compatibles con el medio ambiente para controlar las plagas de insectos agrícolas o vectores de insectos de diversas enfermedades humanas o de animales.

Las proteínas cristalinas (Cry) de *Bacillus thuringiensis* tienen una potente actividad insecticida frente a lepidópteros, dípteros, y coleópteros, predominantemente. Estas proteínas también han demostrado actividad frente a plagas en los Órdenes Hymenoptera, Homoptera, Phthiraptera, Mallophaga, y Acari así como otras órdenes de invertebrados tales como Nematelminthes, Platyhelminthes y Sarcostomastigophora (Feitelson, J. 1993. The *Bacillus thuringiensis* family tree. In: Advanced Engineered Pesticides. Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y.). Estas proteínas fueron originalmente clasificadas como CryI a CryVI en base, principalmente, a su actividad insecticida. Las clases principales fueron específicas de lepidópteros (I), específicas de lepidópteros y dípteros (II), específicas de coleópteros (III), específicas de dípteros (IV) y específicas de nematodos (V) y (VI). Las proteínas a su vez se clasificaron en subfamilias; las proteínas con una relación mayor dentro de cada familia recibieron letras de división tales como CryIA, CryIB, CryIC, etc. Proteínas con una relación aún mayor dentro de cada división recibieron nombres tales como CryIC(a), CryIC(b), etc. Los términos "toxina Cry" y "delta-endotoxina" se han utilizado indistintamente con el término "proteína Cry". La nomenclatura actual para las proteínas y los genes Cry se basa en la homología de secuencia de aminoácidos en lugar de la especificidad para la diana de tipo insecto (Crickmore *et al.* (1998) Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62:807-813). En esta clasificación más aceptada, cada toxina recibe un nombre único que incorpora un rango principal (un número arábigo), un rango secundario (una letra en mayúscula), un rango terciario (una letra en minúscula), y un rango cuaternario (otro número arábigo). En la clasificación actual, los números romanos se han cambiados por números arábigos en el rango principal. Por ejemplo, "CryIA(a)" en la nomenclatura anterior se denomina actualmente "Cry1Aa" en la nomenclatura actual.

Las proteínas Cry son moléculas proteicas globulares que se acumulan como protoxinas en forma cristalina durante la etapa de esporulación de Bt. Después de la ingesta por parte de una plaga, los cristales suelen solubilizarse para liberar protoxinas, que pueden oscilar en tamaño, por ejemplo, de 130 a 140 kDa para proteínas Cry activas en lepidóptero y de 60 a 80 kDa para proteínas Cry activas en coleóptero. Las protoxinas son convertidas en fragmentos tóxicos maduros (región del extremo N de aproximadamente 60-70 kDa) por proteasas intestinales en la plaga diana. Muchas de estas proteínas son bastante tóxicas para insectos diana específicos pero inofensivas para plantas y otros organismos no diana.

Las proteínas Cry suelen tener cinco dominios de secuencia conservados, y tres dominios estructurales conservados (véase, por ejemplo, de Maagd *et al.* (2001) Trends Genetics 17:193-199). El primer dominio estructural conservado, denominado Dominio I, consiste típicamente en siete hélices alfa y está involucrado en la inserción de membranas y formación de poros. El dominio II consiste típicamente en tres estructuras en hoja beta dispuestas en una configuración de llave griega, y el dominio III consiste típicamente en dos estructuras en hoja beta antiparalelas en formación enrollada (de Maagd *et al.*, 2001, *supra*). Los dominios II y III están involucrados en el reconocimiento y la unión del receptor y por ende se consideran determinantes de la especificidad de la toxina.

Muchas plantas con valor comercial, que incluyen cultivos agrícolas comunes, son susceptibles de ataque por parte de plagas de plantas incluidas plagas de insectos y nematodos, lo que causa reducciones sustanciales en el rendimiento y la calidad del cultivo. Por ejemplo, las plagas de plantas son un factor importante en la pérdida de los cultivos agrícolas más importantes del mundo. Solo en Estados Unidos se pierden cerca de 8 mil millones de dólares cada año debido a las infestaciones de plagas no mamíferas que incluyen insectos. Además de las pérdidas de los

cultivos de campo, las plagas de insectos también son un problema para los productores de frutas y verduras, para productores de plantas ornamentales y para jardineros.

Las plagas de insectos se controlan principalmente mediante la aplicación intensiva de plaguicidas químicos, que son activos por la inhibición del crecimiento de insectos, la prevención de la alimentación y reproducción de insectos, o por causar la muerte del insecto. Los agentes biológicos de control de plagas, tales como las cepas *Bacillus thuringiensis* que expresan toxinas plaguicidas como proteínas Cry, también han sido aplicados en plantas de cultivo con resultados satisfactorios, y ofrecen una alternativa o complemento a los plaguicidas químicos. Los genes que codifican algunas de estas proteínas Cry han sido aislados y su expresión en huéspedes heterólogos tales como plantas transgénicas ha demostrado que constituyen una nueva herramienta para el control de plagas de insectos importantes desde un punto de vista económico.

Se puede lograr un buen control del insecto, pero algunas veces los agentes químicos pueden afectar insectos beneficiosos no diana y algunos agentes biológicos tienen un espectro de actividad muy estrecho. Además, el uso continuado de algunos métodos de control químico y biológico refuerza la posibilidad de que las plagas de insectos se vuelvan resistentes a dichas medidas de control. Esto se ha reducido parcialmente mediante prácticas de gestión de la resistencia pero sigue siendo necesario descubrir agentes de control de plagas nuevos y efectivos que le brinden a los productores agrícolas un beneficio económico y sean aceptables para el medio ambiente. Se necesitan particularmente agentes de control que tengan como diana un espectro más amplio de plagas de insectos importancia económica y que controlen de manera eficiente las cepas de insectos que son o podrían ser resistentes a los agentes de control de insectos actuales.

SUMARIO

Ante estas necesidades, un objeto de la presente invención consiste en proporcionar agentes de control de plagas nuevos mediante genes y proteínas plaguicidas novedosos que puedan utilizarse para controlar diversas plagas de plantas.

La invención es como se define en las reivindicaciones adjuntas.

La invención se refiere a composiciones y métodos para conferir actividad plaguicida a bacterias, plantas, células vegetales, tejidos y semillas. En particular, se refiere a los genes quiméricos que comprenden nuevos polinucleótidos que codifican las proteínas Cry aisladas de *Bacillus thuringiensis* (Bt) y secuencias sustancialmente idénticas a estas, cuya expresión resulta en proteínas tóxicas para plagas de insectos importantes desde un punto de vista económico, particularmente plagas de insectos que pueden infestar plantas. La invención se refiere además a proteínas Cry novedosas que resultan de la expresión de las secuencias de ácido nucleico, y las composiciones y formulaciones que contienen las proteínas Cry, que son tóxicas para insectos debido a que inhiben la capacidad de supervivencia, crecimiento y reproducción de las plagas de insectos, o que limitan el daño relacionado con el insecto o la pérdida de las plantas de cultivo. Las proteínas Cry de la invención incluyen proteínas Cry nativas y proteínas Cry mutantes que tienen una o más sustituciones, adiciones o eliminaciones de aminoácidos. Los ejemplos de proteínas Cry mutantes incluyen, entre otros, aquellas que mutan para tener un espectro de actividad más amplio que sus homólogos de la proteína Cry nativa o aquellas que mutan para introducir un epítipo para generar anticuerpos que reconocen de manera diferente la proteína mutada y la proteína nativa. Las proteínas Cry nuevas de la invención son sumamente activas contra plagas de insectos. Por ejemplo, las proteínas Cry de la invención se pueden utilizar para controlar una o más plagas de insectos importantes desde un punto de vista económico tales como el gusano cortador grasiento (*Agrotis ipsilon*), el barrenador de maíz europeo (*Ostrinia nubilalis*), el cogollero del maíz (*Spodoptera frugiperda*), gusano elotero (*Helicoverpa zea*), barrenador de la caña de azúcar (*Diatraea saccharalis*), oruga de la leguminosa (*Anticarsia gemmatilis*), el falso medidor de la soja (*Chrysodeixis includens*), barrenador del maíz del sudoeste (*Diatraea grandiosella*), gusano cortador de frijoles (*Richia albicosta*), cogollero del tabaco (*Heliothis virescens*), barrenador de maíz asiático (*Ostrinia furnacalis*), gusano bellotero del algodón (*Helicoverpa armigera*), perforador rallado del tallo (*Chilo suppressalis*), perforador del tallo rosa (*Sesamia calamistis*), enrollador de las hojas de arroz (*Cnaphalocrocis medinalis*), y similares.

La invención también hace referencia a polinucleótidos sintéticos que codifican las proteínas Cry de la invención y tienen uno o más codones optimizados para la expresión en organismos transgénicos tales como bacterias y plantas.

La invención también se refiere a casetes de expresión y vectores recombinantes que comprenden un polinucleótido que codifica una proteína Cry de la invención. La invención también se refiere a bacterias, plantas, células vegetales, tejidos y semillas transformados que comprenden un gen quimérico, o un casete de expresión o un vector recombinante que comprenden un polinucleótido que codifica una proteína Cry de la invención.

La invención también se refiere a métodos para uso de los polinucleótidos, por ejemplo, en constructos de ADN o genes quiméricos o casetes de expresión o vectores recombinantes para la transformación y expresión en organismos, incluidos microorganismos y plantas. Las secuencias nucleotídicas o de aminoácidos pueden ser secuencias sintéticas que han sido diseñadas para la expresión en un organismo, que incluyen, entre otros, un

microorganismo o una planta o en la producción de toxinas híbridas con mejor actividad plaguicida. La invención también se refiere a métodos para producir las proteínas Cry y a métodos para utilizar las secuencias de ácido nucleico, por ejemplo, en microorganismos para controlar insectos o en plantas transgénicas para protegerlos del daño de insectos y a métodos para utilizar las proteínas Cry y las composiciones y formulaciones que comprenden las proteínas Cry, por ejemplo, la aplicación de las proteínas Cry o las composiciones o formulaciones en áreas infestadas con insectos, o para tratar las áreas o plantas susceptibles de insectos de manera profiláctica con el objeto de protegerlas contra las plagas de insectos. Las secuencias nucleotídicas o de aminoácidos pueden ser secuencias sintéticas que han sido diseñadas para la expresión en un organismo, que incluyen, entre otros, un microorganismo o una planta.

Las composiciones y los métodos de la invención son útiles para producir organismos que son tóxicos para los insectos, específicamente bacterias y plantas. Estos organismos y composiciones derivadas de ellos son deseables con fines agrícolas. Las composiciones de la invención también son útiles para generar proteínas Cry alteradas o mejoradas que tienen actividad plaguicida, o para detectar la presencia de proteína Cry o de ácidos nucleicos en productos u organismos.

Estas y otras características, aspectos, y ventajas de la invención se entenderán mejor haciendo referencia a la siguiente descripción detallada y a las reivindicaciones.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS SECUENCIAS EN LA LISTA DE SECUENCIAS

SEQ ID NO: 1 representa una secuencia nucleotídica que codifica una proteína BT-0044.
 SEQ ID NO: 2 representa una secuencia nucleotídica que codifica una proteína BT-0051.
 SEQ ID NO: 3 representa una secuencia nucleotídica que codifica una proteína BT-0068.
 SEQ ID NO: 4 representa una secuencia nucleotídica que codifica una proteína BT-0128.
 SEQ ID NO: 5 representa una secuencia con optimización de codones que codifica una proteína BT-0044.
 SEQ ID NO: 6 representa una secuencia con optimización de codones que codifica una proteína BT-0051.
 SEQ ID NO: 7 representa una secuencia con optimización de codones que codifica una proteína BT-0068.
 SEQ ID NO: 8 representa una secuencia con optimización de codones que codifica una proteína BT-0128.
 SEQ ID NO: 9 representa una secuencia nucleotídica que codifica una proteína BT-0044 mutante.
 SEQ ID NO: 10 representa una secuencia nucleotídica que codifica una proteína BT-0051 mutante.
 SEQ ID NO: 11 representa una secuencia nucleotídica que codifica una proteína BT-0068 mutante.
 SEQ ID NO: 12 representa una secuencia nucleotídica que codifica una proteína BT-0128 mutante.
 SEQ ID NO: 13 representa una secuencia de aminoácidos de una proteína BT-0044.
 SEQ ID NO: 14 representa una secuencia de aminoácidos de una proteína BT-0051.
 SEQ ID NO: 15 representa una secuencia de aminoácidos de una proteína BT-0068.
 SEQ ID NO: 16 representa una secuencia de aminoácidos de una proteína BT-0128.
 SEQ ID NO: 17 representa una secuencia de aminoácidos de una proteína BT-044 mutante.
 SEQ ID NO: 18 representa una secuencia de aminoácidos de una proteína BT-0051 mutante.
 SEQ ID NO: 19 representa una secuencia de aminoácidos de una proteína BT-0068 mutante.
 SEQ ID NO: 20 representa una secuencia de aminoácidos de una proteína BT-0128 mutante.
 SEQ ID NOS: 21-26 representan cebadores útiles en la invención.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Salvo que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente tienen el mismo significado que entiende habitualmente un experto en la técnica a la que pertenece la invención. La terminología utilizada en la descripción de la invención pretende describir las realizaciones particulares únicamente y no pretende limitar la invención. También debe entenderse que la terminología utilizada en la invención pretende únicamente describir las realizaciones particulares y no pretende limitar la invención.

Definiciones

Como se utiliza en la presente y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "uno/a" y "el/la" incluyen la referencia en plural salvo que el contexto claramente determine lo contrario. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a "una planta" es una referencia a una o más plantas e incluye equivalentes de esta conocidos por los expertos en la técnica y así sucesivamente. Como se utiliza en la presente, la palabra "o" significa cualquier miembro de una lista particular y también incluye cualquier combinación de miembros de dicha lista (es decir, incluye también "y").

El término "aproximadamente" se utiliza en la presente para hacer referencia a aproximadamente, más o menos, alrededor de o en la región de. Cuando se utiliza el término "aproximadamente" junto con un intervalo numérico, modifica el intervalo extendiendo los límites por encima y por debajo de los valores numéricos establecidos. En general, el término "aproximadamente" se utiliza en la presente para modificar un valor numérico por encima o por debajo del valor establecido mediante una varianza del 20 por ciento, preferentemente un 10 por ciento hacia arriba o hacia abajo (mayor o menor). Respecto de una temperatura, el término "aproximadamente" significa $\pm 1^\circ\text{C}$,

preferentemente $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Cuando el término "aproximadamente" se utiliza en el contexto de la invención (p. ej., en combinaciones con valores de temperatura o de peso molecular), se prefiere el valor exacto (es decir, sin "aproximadamente").

Por "actividad" de una proteína Cry tóxica de la invención se entiende que la proteína tóxica funciona como un agente de control de insectos activo por vía oral, tiene un efecto tóxico, o puede interrumpir o evitar la alimentación de insectos, lo que puede causar o no la muerte del insecto. Cuando se suministra una proteína tóxica de la invención al insecto, el resultado es normalmente la muerte del insecto, o el insecto no se alimenta de la fuente que produce la proteína tóxica disponible para el insecto.

Como se utiliza en la presente, el término "amplificado" significa la construcción de múltiples copias de una molécula de ácido nucleico o múltiples copias complementarias a la molécula de ácido nucleico utilizando al menos una de las moléculas de ácido nucleico como modelo. Los sistemas de amplificación incluyen el sistema de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), el sistema de reacción en cadena de la ligasa (LCR), la amplificación basada en la secuencia del ácido nucleico (NASBA; Cangene, Mississauga, Ontario), los sistemas Q-Beta replicasa, el sistema de amplificación basada en la transcripción (TAS) y la amplificación por desplazamiento del filamento (SDA). Véase p. ej., *Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications*, PERSING et al., Ed., American Society for Microbiology, Washington, D.C. (1993). El producido de la amplificación se denomina "amplión".

El término "constructo quimérico" o "gen quimérico" o "polinucleótido quimérico" o "ácido nucleico quimérico" (o términos similares) como se utilizan en la presente se refieren a un constructo o una molécula que comprende dos o más polinucleótidos de origen diferentes ensamblados en una molécula única de ácido nucleico. El término "constructo quimérico", "gen quimérico", "polinucleótido quimérico" o "ácido nucleico quimérico" se refiere a cualquier constructo o molécula que contiene, sin limitación, (1) polinucleótidos (p. ej., ADN), que incluyen polinucleótidos reguladores y codificantes que no se observan juntos en la naturaleza (es decir, al menos uno de los polinucleótidos en el constructo es heterólogo respecto a al menos uno de sus otros polinucleótidos), o (2) polinucleótidos que codifican partes de proteínas no unidas de manera natural, o (3) partes de promotores no unidas de manera natural. Además, un constructo quimérico, un gen quimérico, un polinucleótido quimérico o un ácido nucleico quimérico puede comprender polinucleótidos reguladores y polinucleótidos codificantes que proceden de distintas fuentes, o comprenden polinucleótidos reguladores y polinucleótidos codificantes que proceden de la misma fuente, pero dispuestos de una manera diferente a la disposición natural. En algunas realizaciones de la invención, el constructo quimérico, gen quimérico, polinucleótido quimérico o ácido nucleico quimérico comprende un casete de expresión que comprende un polinucleótido de la invención bajo el control de polinucleótidos reguladores, particularmente bajo el control de polinucleótidos reguladores funcionales en plantas o bacterias.

Una "secuencia codificante" es una secuencia de ácido nucleico que se transcribe en ARN, tal como ARNm, ARNr, ARNt, ARNsn, ARN sentido o ARN antisentido. Preferentemente, el ARN se traduce en un organismo para producir una proteína.

Como se utiliza en la presente, una secuencia "con optimización de codones" significa una secuencia nucleotídica de un polinucleótido recombinante, transgénico o sintético donde los codones se seleccionan para reflejar el sesgo particular del codón que una célula u organismo huésped pueda tener. Esto se realiza típicamente de forma tal que preserve la secuencia de aminoácidos del polipéptido codificado por la secuencia nucleotídica con optimización de codones. En algunas realizaciones, la secuencia de ADN del constructo de ADN recombinante incluye una secuencia con codones optimizados para la célula (p. ej., un animal, una planta o célula fúngica) en donde se expresará el codón. Por ejemplo, un constructo que se expresará en una célula vegetal puede tener la totalidad o partes de su secuencia (p. ej., el primer elemento de supresión genética o el elemento de expresión genética) con optimización de codones para la expresión en una planta. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 6 121 014.

"Controlar" insectos significa inhibir, a través de un efecto tóxico, la capacidad de las plagas de insectos de sobrevivir, crecer, alimentarse y/o reproducirse, o limitar el daño relacionado con insectos o la pérdida del cultivo vegetal o proteger el potencial de rendimiento de un cultivo cuando crece en presencia de plagas de insectos. "Controlar" insectos puede significar o no matar los insectos, aunque significa, preferentemente, matar los insectos.

Los términos "comprende" y/o "que comprende", cuando se utilizan en la presente memoria descriptiva, especifican la presencia de características, números enteros, etapas, operaciones, elementos y/o componentes determinados pero no impide la presencia o adición de una o más características, números enteros, etapas, operaciones, elementos, componentes y/o grupos de estos.

Como se utiliza en la presente, la frase de transición "que consiste básicamente en" (y sus variantes gramaticales) se refiere a que el alcance de una reivindicación se interpretará para abarcar los materiales o etapas especificados en la reivindicación "y aquellas que no modifican significativamente las características novedosas y básicas" de la invención reivindicada. Por lo tanto, el término "que consiste básicamente en" cuando se utiliza en una reivindicación de la invención no pretende ser interpretado como equivalente de "que comprende".

En el contexto de la invención, "que corresponde a", o "corresponde a" significa que cuando las secuencias de aminoácidos de la variante de las proteínas Cry se alinean entre sí, los aminoácidos que "corresponden a" algunas posiciones enumeradas en la variante de proteína o proteína homóloga son aquellas que se alinean con estas posiciones en una proteína de referencia pero no están necesariamente en estas posiciones numéricas exactas en relación con la secuencia de aminoácidos de referencia particular de la invención. Por ejemplo, si SEQ ID NO:13 es la secuencia de referencia y se alinea con la SEQ ID NO:15, Asn4 de la SEQ ID NO:15 "corresponde a" Asn6 de la SEQ ID NO:13.

"Administrar" una composición o proteína tóxica significa que la composición o proteína tóxica entra en contacto con un insecto, lo que resulta en un efecto tóxico y el control del insecto. La composición o proteína tóxica puede administrarse de muchas formas conocidas, p. ej., por vía oral, mediante la ingesta por parte del insecto o por contacto con el insecto mediante una expresión de una planta transgénica, composiciones proteicas formuladas, composiciones proteicas pulverizables, una matriz de cebo, u otro sistema de administración de proteínas reconocido en la técnica.

El término "dominio" se refiere a un conjunto de aminoácidos conservados en posiciones específicas junto con una alineación de secuencias de proteínas relacionadas desde un punto de vista evolutivo. Aunque los aminoácidos en otras posiciones pueden variar entre homólogos, los aminoácidos que se conservan ampliamente en posiciones específicas indican aminoácidos que son esenciales en la estructura, estabilidad, o función de una proteína. Identificados con su alto grado de conservación en secuencias alineadas de una familia de homólogos de proteína, pueden utilizarse como identificadores para determinar si algún polipéptido en cuestión pertenece a una familia de polipéptidos identificada previamente.

"Cantidad efectiva de control de insectos" significa la concentración de una proteína tóxica que inhibe, mediante un efecto tóxico, la capacidad de los insectos de sobrevivir, crecer, alimentarse y/o reproducirse, o limita el daño relacionado con insectos o la pérdida del cultivo vegetal o protege el potencial de rendimiento de un cultivo cuando crece en presencia de plagas de insectos. "Cantidad efectiva de control de insectos" puede significar o no matar los insectos, aunque significa, preferentemente, matar los insectos.

"Casete de expresión" como se utiliza en la presente significa una molécula de ácido nucleico capaz de dirigir la expresión de al menos un polinucleótido de interés en una célula huésped adecuada, que comprende un promotor funcionalmente ligado al polinucleótido de interés que está unido operablemente a una señal de terminación. Un "casete de expresión" también comprende típicamente polinucleótidos adicionales requeridos para la traducción adecuada del polinucleótido de interés. El casete de expresión también puede comprender otros polinucleótidos no necesarios para la expresión directa de un polinucleótido de interés pero que están presentes debido a los sitios convenientes de restricción para la eliminación del casete de un vector de expresión. El casete de expresión que comprende los polinucleótidos de interés puede ser quimérico, lo que significa que al menos uno de sus componentes es heterólogo con respecto a al menos uno de sus otros componentes. El casete de expresión también puede ser uno que se produce de forma natural pero ha sido obtenido en una forma recombinante útil para la expresión heteróloga. Típicamente, sin embargo, el casete de expresión es heterólogo con respecto al huésped, es decir, el polinucleótido de interés en el casete de expresión no ocurre de manera natural en la célula huésped y debe ser introducido en la célula huésped o un ancestro de la célula huésped mediante un proceso de transformación o proceso de cultivo selectivo. La expresión de los polinucleótidos de interés en el casete de expresión se encuentra generalmente bajo control de un promotor. En el caso de un organismo multicelular, tal como una planta, el promotor puede ser específico o preferencial para un tejido particular, u órgano o etapa de desarrollo. Un casete de expresión o fragmento de este también puede denominarse "polinucleótido insertado" o "polinucleótido de inserción" cuando se utiliza para transformar una planta.

Un "gen" se define en la presente como una unidad hereditaria que consiste en un polinucleótido que ocupa una ubicación específica en un cromosoma o plásmido y que contiene la instrucción genética para una característica particular o rasgo en un organismo.

Una "proteasa intestinal" es una proteasa que se encuentra de manera natural en el tubo digestivo de un insecto. Esta proteasa participa generalmente en la digestión de las proteínas ingeridas.

El término "heterólogo" cuando se utiliza en referencia a un gen o ácido nucleico se refiere a un gen que codifica un factor que no se encuentra en su ámbito natural (es decir, ha sido alterado por acción del hombre). Por ejemplo, un gen heterólogo puede incluir un gen de una especie introducida en otras especies. Un gen heterólogo también puede incluir un gen nativo a un organismo que ha sido alterado de alguna manera (p. ej., mutado, incorporado en múltiples copias, unido a un promotor no nativo o un polinucleótido potenciador, etc.). Los genes heterólogos pueden comprender además polinucleótidos de un gen vegetal que comprenden formas de ADNc de un gen vegetal; los ADNc pueden expresarse en una orientación sentido (para producir ARNm) o en orientación antisentido (para producir un transcrito de ARN antisentido que es complementario al transcrito de ARNm). En un aspecto de la invención, los genes heterólogos se distinguen de genes de plantas endógenos en que el polinucleótido del gen heterólogo se une típicamente a polinucleótidos que comprenden elementos reguladores tales como promotores que no se encuentran asociados de manera natural con el gen para la proteína codificada por el gen heterólogo o con un

polinucleótido de un gen vegetal en un cromosoma, o están asociados con porciones del cromosoma no observadas en la naturaleza (p. ej., genes expresados en lugares donde el gen no se expresa normalmente). Además, un polinucleótido "heterólogo" se refiere a un polinucleótido que no está asociado de manera natural con una célula huésped en la que se introduce, que incluye copias múltiples de un polinucleótido natural que no ocurren de manera natural.

La "recombinación homóloga" es el intercambio ("cruce") de fragmentos de ADN entre dos moléculas de ADN o cromátidas de cromosomas apareados en una región de polinucleótidos idénticos. Un "evento de recombinación" se entiende en la presente como un cruce meiótico.

Una secuencia de ácido nucleico es "isocodificante" con una secuencia de ácido nucleico de referencia cuando la secuencia de ácido nucleico codifica un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos como el polipéptido codificado por la secuencia de ácido nucleico de referencia.

El término molécula de ácido nucleico, polinucleótido o toxina "aislados" es una molécula de ácido nucleico, polinucleótido o proteína tóxicos que ya no existe en su ámbito natural. Una molécula de ácido nucleico, polinucleótido o toxina aislados de la invención pueden existir en una forma purificada o pueden existir en un recombinante tal como en una célula bacteriana transgénica o una planta transgénica.

Una "molécula de ácido nucleico" es un ADN o ARN mono o bicatenario que puede aislarse de cualquier fuente. En el contexto de la presente invención, la molécula de ácido nucleico es preferentemente un segmento de ADN.

"Unido operablemente" se refiere a la asociación de polinucleótidos en un fragmento de ácido nucleico único de forma tal que la función de uno afecta la función del otro. Por ejemplo, un promotor está unido operablemente a un polinucleótido codificante o ARN funcional cuando es capaz de afectar la expresión de dicho polinucleótido codificante o ARN funcional (es decir, que el polinucleótido codificante o ARN funcional se encuentra bajo control transcripcional del promotor). Un polinucleótido codificante en orientación sentido o antisentido puede unirse operablemente a polinucleótidos reguladores.

Como se utiliza en la presente, "plaguicida", "insecticida" y similares, se refieren a la capacidad de una proteína Cry de la invención de controlar un organismo plaga o una cantidad de una proteína Cry que puede controlar un organismo plaguicida como se define en la presente. Por lo tanto, una proteína Cry plaguicida puede matar o inhibir la capacidad de un organismo plaga (p. ej., una plaga de insectos) de sobrevivir, crecer, alimentarse y/o reproducirse.

Una "planta" es cualquier planta en cualquier etapa de desarrollo, particularmente una semilla de una planta.

Una "célula vegetal" es una unidad estructural o fisiológica de una planta que comprende un protoplasto y una pared celular. La célula vegetal puede tener la forma de una célula única aislada o una célula cultivada o una parte de una unidad organizada mayor, como, por ejemplo, un tejido vegetal, un órgano vegetal o una planta entera.

"Cultivo de célula vegetal" se refiere a cultivos de unidades vegetales tales como, por ejemplo, protoplastos, células de cultivo vegetal, células en tejidos vegetales, polen, tubos polínicos, óvulos, sacos embrionarios, cigotos y embriones en distintas etapas de desarrollo.

"Material vegetal" se refiere a hojas, tallos, raíces, flores o partes de flores, frutas, polen, óvulos, cigotos, semillas, cortes, cultivos celulares o de tejidos, u otra parte o producto de una planta.

Un "órgano vegetal" es una parte diferenciada y visiblemente estructurada de una planta tal como una raíz, tallo, hoja, botón floral, o embrión.

"Tejido vegetal" como se utiliza en la presente significa un grupo de células vegetales organizadas en una unidad estructural y funcional. Se incluye todo tejido de una planta *in planta* o en cultivo. Este término incluye, entre otros, plantas enteras, órganos de plantas, semillas, cultivo de tejidos, y todo grupo de células vegetales organizadas en unidades estructurales y/o funcionales. El uso de este término junto con, o en ausencia de, cualquier tipo específico de tejido vegetal como se enumeró anteriormente u otro tejido incluido en esta definición no pretende excluir otro tipo de tejido vegetal.

Un "polinucleótido" se refiere a un polímero compuesto de muchos monómeros nucleotídicos unidos de manera covalente en una cadena. Dichos "polinucleótidos" incluyen ADN, ARN, oligonucleótidos modificados (p. ej., oligonucleótidos que comprenden bases que no son típicas para ARN o ADN biológico tales como oligonucleótidos 2'-O-metilados) y similares. En algunas realizaciones, un ácido nucleico o polinucleótido puede ser monocatenario, bicatenario, de múltiples hebras o combinaciones de estos. Salvo que se indique lo contrario, un ácido nucleico particular o polinucleótido de la presente invención comprende o codifica opcionalmente polinucleótidos complementarios, además de cualquier polinucleótido indicado explícitamente.

"Polinucleótido de interés" se refiere a cualquier polinucleótido que, cuando se transfiere a un organismo, p. ej., una planta, le otorga al organismo una característica deseada como resistencia a antibióticos, resistencia a virus, resistencia a insectos, resistencia a enfermedades o resistencia a otras plagas, tolerancia a herbicidas, mejor valor nutricional, mejor rendimiento en un proceso industrial, producción de enzimas o metabolitos de valor comercial o capacidad reproductiva alterada.

El término "promotor" se refiere a un polinucleótido, normalmente cadena arriba (5') de su polinucleótido codificante, que controla la expresión del polinucleótido codificante al proporcionar el reconocimiento para la ARN polimerasa y otros factores necesarios para la correcta transcripción.

Un "protoplasto" es una célula vegetal aislada sin una pared celular o solo con partes de la pared celular.

Como se utiliza en la presente, el término "recombinante" se refiere a una forma de ácido nucleico (p. ej., ADN o ARN) y/o proteína y/u organismo que no se encontraría normalmente en la naturaleza y como ha sido creado por intervención humana. Como se utiliza en la presente, una "molécula de ácido nucleico recombinante" es una molécula de ácido nucleico que comprende una combinación de polinucleótidos que no ocurrirían juntos de manera natural y es el resultado de la intervención humana, p. ej., una molécula de ácido nucleico que contiene una combinación de al menos dos polinucleótidos heterólogos entre sí, y/o una molécula de ácido nucleico que se sintetiza artificialmente y comprende un polinucleótido que se desvía del polinucleótido que existiría normalmente en la naturaleza, y/o una molécula de ácido nucleico que comprende un transgen incorporado artificialmente en un ADN genómico de una célula huésped y un ADN flanqueante asociado del genoma de la célula huésped. Un ejemplo de una molécula de ácido nucleico recombinante es una molécula de ADN que resulta de la inserción de un transgen en un ADN genómico de una planta, que puede finalmente resultar en la expresión de un ARN recombinante y/o una molécula proteica en dicho organismo. Como se utiliza en la presente, una "planta recombinante" es una planta que no existiría normalmente en la naturaleza, es el resultado de la intervención humana y contiene un transgen y/o una molécula de ácido nucleico heterólogos incorporados en su genoma. Como resultado de dicha alteración genómica, la planta recombinante se diferencia de la planta natural relacionada.

Los "elementos reguladores" se refieren a secuencias involucradas en el control de la expresión de una secuencia nucleotídica. Los elementos reguladores comprenden un promotor unido operablemente a la secuencia nucleotídica de interés y señales de terminación. También abarcan típicamente secuencias necesarias para la traducción adecuada de la secuencia nucleotídica.

El término "idéntico" o "sustancialmente idéntico" en el contexto de dos secuencias de ácido nucleico o de proteína, se refiere a dos o más secuencias o subsecuencias que tienen una identidad de residuos aminoácídicos o nucleotídicos de al menos un 60 % preferentemente de un 80 %, más preferentemente de un 90 %, aún más preferentemente de un 95 % y más preferentemente de al menos un 99 % cuando se comparan y alinean para una correspondencia máxima, según se mide utilizando uno de los algoritmos de comparación de secuencia o mediante inspección visual. Preferentemente, la identidad sustancial existe en una región de las secuencias que tiene al menos aproximadamente 50 residuos de longitud, más preferentemente en una región de al menos aproximadamente 100 residuos y más preferentemente las secuencias son sustancialmente idénticas en al menos aproximadamente 150 residuos. En una realización especialmente preferida, las secuencias son sustancialmente idénticas en la longitud entera de las regiones codificantes. Además, las secuencias de ácido nucleico o proteína sustancialmente idénticas tienen sustancialmente la misma función.

Para la comparación de secuencias, típicamente una secuencia actúa como una secuencia de referencia con las que se comparan las secuencias de prueba. Cuando se utiliza un algoritmo de comparación de secuencia, las secuencias de prueba y referencia se introducen en una computadora, se designan coordenadas de subsecuencia de ser necesario y se designan los parámetros del programa de algoritmo de secuencia. El algoritmo de comparación de secuencia posteriormente calcula la identidad de secuencia porcentual para las secuencias de prueba en relación con la secuencia de referencia, en base a los parámetros del programa designado.

Se puede realizar la alineación óptima de secuencias para la comparación, p. ej., mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, Adv. Appl. Math. 2: 482 (1981), mediante el algoritmo de alineación de homología de Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 443 (1970), mediante la búsqueda de un método de similitud de Pearson y Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85: 2444 (1988), mediante implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en el paquete de software Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.), o mediante inspección visual (véase generalmente, Ausubel et al., infra).

Un ejemplo de un algoritmo que es adecuado para determinar la identidad de secuencia porcentual y la similitud de secuencias es el algoritmo de BLAST, que se describe en Altschul et al., J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1990). El software para realizar los análisis de BLAST se encuentran disponibles al público a través del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine, 8600 Rockville Pike, Bethesda, MD 20894 EE. UU.). Este algoritmo incluye la identificación, en primer lugar, de pares de secuencia de alta puntuación (HSP) mediante la detección de palabras cortas de longitud W en la secuencia

problema, que coinciden o cumplen con alguna puntuación mínima con valor positivo T cuando se alinean con una palabra de la misma longitud en una secuencia de base de datos. T se refiere al umbral de puntuación de la palabra cercana (Altschul et al., 1990). Estos aciertos de palabras cercanas iniciales actúan como base para iniciar búsquedas con el objetivo de encontrar HSP más largos que las contengan. Los aciertos de palabras se extienden posteriormente en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia en la medida en que la puntuación de alineación acumulada aumenta. Las puntuaciones acumuladas se calculan, para secuencias nucleotídicas, utilizando los parámetros M (puntuación de recompensa para un par de residuos coincidentes; siempre >0) y N (puntuación de penalización para residuos no coincidentes; siempre <0). Para las secuencias de aminoácidos, se utiliza una matriz de puntuación para calcular la puntuación acumulada. La extensión de los aciertos de palabras en cada dirección se interrumpe cuando la puntuación de alineación acumulada disminuye en la cantidad X desde el valor máximo alcanzado, la puntuación acumulada llega a cero o por debajo de cero debido a la acumulación de una o más alineaciones de residuos con puntuación negativa, o se alcanza el extremo de alguna de las secuencias. Los parámetros del algoritmo de BLAST, W, T y X determinan la sensibilidad y la velocidad de la alineación. El programa BLASTN (para secuencias nucleotídicas) utiliza por defecto una longitud de palabra (W) de 11, una expectativa (E) de 10, un corte de 100, M=5, N=-4, y una comparación de ambas hebras. Para las secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP utiliza por defecto una longitud de palabra (W) de 3, una expectativa (E) de 10 y la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff y Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915 (1989)).

Además de calcular la identidad de secuencia porcentual, el algoritmo de BLAST también realiza un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias (véase, p. ej., Karlin y Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-5877 (1993)). Una medida de similitud del algoritmo de BLAST es la probabilidad de suma menor ($P(N)$), que indica la probabilidad de que ocurra una coincidencia entre dos secuencias nucleotídicas o de aminoácidos. Por ejemplo, se considera que una secuencia de ácido nucleico de prueba es similar a una secuencia de referencia si la probabilidad de suma menor en una comparación entre la secuencia de ácido nucleico de prueba y una secuencia de ácido nucleico de referencia es menor de aproximadamente 0,1, más preferentemente, menor de aproximadamente 0,01 y más preferentemente menor de aproximadamente 0,001.

Otro indicio de que dos secuencias de ácido nucleico son sustancialmente idénticas es que las dos moléculas hibridan entre sí en condiciones rigurosas. La frase "que hibrida específicamente con" se refiere a la unión, duplicación, o hibridación de una molécula únicamente con una secuencia nucleotídica particular en condiciones rigurosas cuando la secuencia está presente en una mezcla compleja de ADN o ARN (p. ej., celular total). El término "se une sustancialmente" se refiere a la hibridación complementaria entre una sonda de ácido nucleico y un ácido nucleico diana y abarca disparidades menores que pueden acomodarse reduciendo la rigurosidad del medio de hibridación para alcanzar la detección deseada de la secuencia de ácido nucleico diana.

Las "condiciones rigurosas de hibridación" y las "condiciones rigurosas de lavado de hibridación" en el contexto de los experimentos de hibridación de ácido nucleico tales como las hibridaciones de Southern o Northern dependen de la secuencia y difieren en parámetros ambientales diferentes. Las secuencias más largas hibridan específicamente a temperaturas mayores. Se puede consultar una guía exhaustiva acerca de la hibridación de ácidos nucleicos en Tijssen (1993) Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid Probes parte I capítulo 2 "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays" Elsevier, Nueva York. En general, la hibridación y las condiciones de lavado sumamente rigurosas se seleccionan para que sean aproximadamente 5 °C menores que el punto de fusión térmica (T_m) para la secuencia específica en una resistencia iónica y un pH definidos. Generalmente, en "condiciones rigurosas" una sonda hibridará con su subsecuencia diana pero no con otras secuencias.

T_m es la temperatura (en una resistencia iónica y pH definidos) en donde un 50 % de la secuencia diana hibrida con una sonda perfectamente coincidente. Las condiciones muy rigurosas se seleccionan para ser iguales a T_m para una sonda particular. Un ejemplo de condiciones de hibridación rigurosas para la hibridación de ácidos nucleicos complementarios que tienen más de 100 residuos complementarios en un filtro en una transferencia de Southern o Northern es un 50 % de formamida con 1 mg de heparina a 42 °C y la hibridación se produce durante la noche. Un ejemplo de condiciones de lavado sumamente rigurosas es NaCl 0,15 M a 72 °C durante aproximadamente 15 minutos. Un ejemplo de condiciones de lavado rigurosas es un lavado de 0,2x SSC a 65 °C durante 15 minutos (véase, Sambrook, infra, para una descripción del tampón de SSC). Un lavado con rigurosidad alta suele estar precedido por un lavado de rigurosidad baja para eliminar la señal de sonda de fondo. Un ejemplo de un lavado de rigurosidad media para un dúplex de, p. ej., más de 100 nucleótidos es 1x SSC a 45 °C durante 15 minutos. Un ejemplo de un lavado de rigurosidad baja para un dúplex de, p. ej., más de 100 nucleótidos es 4-6x SSC a 40 °C durante 15 minutos. Para sondas cortas (p. ej., de aproximadamente 10 a 50 nucleótidos), las condiciones de rigurosidad suelen abarcar concentraciones de sal de menos de aproximadamente 1,0 M de un ión de Na, normalmente aproximadamente una concentración entre 0,01 y 1,0 M de ión de Na (u otras sales) a un pH entre 7,0 y 8,3 y la temperatura suele ser de al menos aproximadamente 30 °C. También se pueden alcanzar condiciones rigurosas con la incorporación de agentes desestabilizantes tales como formamida. En general, una relación señal ruido de 2x (o más) de la observada para una sonda no relacionada en el ensayo de hibridación particular indica la detección de una hibridación específica. Los ácidos nucleicos que no hibridan entre sí en condiciones rigurosas son sustancialmente idénticos si las proteínas que los codifican son sustancialmente idénticas. Esto ocurre, p. ej.,

cuando se crea una copia de un ácido nucleico utilizando la máxima degeneración de codones permitida por el código genético.

Los siguientes son ejemplos de conjuntos de condiciones de hibridación/lavado que pueden utilizarse para clonar las secuencias nucleotídicas homólogas que son sustancialmente idénticas a las secuencias nucleotídicas de referencia de la presente invención: una secuencia nucleotídica de referencia hibrida preferentemente con la secuencia nucleotídica de referencia en un 7 % de dodecilsulfato sódico (SDS), NaPO₄ 0,5 M, EDTA 1 mM a 50 °C con lavado en 2× SSC, un 0,1 % de SDS a 50°C, más deseablemente en un 7 % de dodecilsulfato sódico (SDS), NaPO₄ 0,5 M, EDTA 1 mM a 50 °C con lavado en 1× SSC, un 0,1 % de SDS a 50 °C, aún más deseablemente en un 7 % de dodecilsulfato sódico (SDS), NaPO₄ 0,5 M, EDTA 1 mM a 50 °C con lavado en 0,5× SSC, un 0,1 % de SDS a 50°C, preferentemente en un 7% de dodecilsulfato sódico (SDS), NaPO₄ 0,5 M , EDTA 1 mM a 50 °C con lavado en 0,1× SSC, 0,1% de SDS a 50 °C, más preferentemente en un 7 % de dodecilsulfato sódico (SDS), NaPO₄ 0,5 M , EDTA 1 mM a 50 °C con lavado en 0,1× SSC, 0,1 % de SDS a 65 °C.

Otro indicio de que las dos secuencias de ácido nucleico o proteínas son sustancialmente idénticas es que la proteína codificada por el primer ácido nucleico tiene inmunológicamente una reacción cruzada con, o se une específicamente a, la proteína codificada por el segundo ácido nucleico. Por lo tanto una proteína es sustancialmente idéntica a una segunda proteína, por ejemplo, cuando las dos proteínas difieren únicamente en sustituciones conservadoras.

"Sintético" se refiere a una secuencia nucleotídica que comprende bases y/o características estructurales que no están presentes en la secuencia natural. Por ejemplo, se dice que una secuencia artificial que codifica una proteína Cry de la invención que se asemeja más al contenido G+C y la distribución normal de codones de genes de plantas dicotiledóneas y/o monocotiledóneas es sintética.

"Transformación" es un proceso para introducir el ácido nucleico heterólogo en una célula u organismo huésped. En particular, "transformación" se refiere a la integración estable de una molécula de ADN en el genoma de un organismo de interés.

"Transformado / transgénico / recombinante" se refieren a un organismo huésped tal como una bacteria o una planta en donde se ha introducido una molécula de ácido nucleico heteróloga. La molécula de ácido nucleico puede integrarse de manera estable en el genoma del huésped o la molécula de ácido nucleico también puede estar presente como una molécula extracromosómica. Dicha molécula extracromosómica puede autorreplicarse. Las células, tejidos o plantas transformados abarcan no solo el producto final de un proceso de transformación sino también su progenie transgénica. Un huésped "no transformado", "no transgénico", o "no recombinante" se refiere a un organismo natural, p. ej., una bacteria o planta que no contiene una molécula de ácido nucleico heteróloga.

Los nucleótidos se indican por sus bases mediante las siguientes abreviaturas estándar: adenina (A), citosina (C), timina (T) y guanina (G). Los aminoácidos también se indican a través de las siguientes abreviaturas estándar: alanina (Ala; A), arginina (Arg; R), asparagina (Asn; N), ácido aspártico (Asp; D), cisteína (Cys; C), glutamina (Gln; Q), ácido glutámico (Glu; E), glicina (Gly; G), histidina (His; H), isoleucina (Ile; I), leucina (Leu; L), lisina (Lys; K), metionina (Met; M), fenilalanina (Phe; F), prolina (Pro; P), serina (Ser; S), treonina (Thr; T), triptófano (Trp; W), tirosina (Tyr; Y), y valina (Val; V).

Esta invención se refiere a composiciones y métodos para controlar las plagas dañinas en plantas. Particularmente, la invención se refiere a proteínas Cry que son tóxicas para las plagas de plantas y a polinucleótidos que comprenden secuencias nucleotídicas que codifican las proteínas Cry y a la producción y el uso de los polinucleótidos y las proteínas Cry para controlar las plagas en plantas.

Por lo tanto, en algunos aspectos, se menciona un gen quimérico que comprende un promotor heterólogo unido operablemente a un polinucleótido que comprende una secuencia nucleotídica que codifica una proteína tóxica para al menos un gusano cortador grasiento (*Agrotis ipsilon*), donde la secuencia nucleotídica (a) tiene una identidad de secuencia con cualquiera de las SEQ ID NO:1-4; o (b) codifica una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia con cualquiera de las SEQ ID NO:13-16; o (c) es una secuencia sintética de (a) o (b) con optimización de codones para la expresión en un organismo transgénico.

En otros aspectos, el promotor heterólogo es un promotor de expresión vegetal. Por ejemplo, de modo no limitante, el promotor de expresión vegetal puede seleccionarse del grupo que consiste en ubiquitina, cmp, TrpA de maíz, un gen bacteriófago T3 9 en 5' UTR, sacarosa sintasa de maíz 1, alcohol deshidrogenasa de maíz 1, complejo captador de luz en maíz, proteína de choque térmico del maíz, RuBP carboxilasa de subunidad pequeña de frijol, manopina sintasa del plásmido Ti, nopalina sintasa del plásmido Ti, chalcona isomerasa de petunia, proteína 1 rica en glicina de semilla, papatina de papa, lectina, CaMV 35S y el promotor de RuBP carboxilasa de subunidad pequeña S-E9.

En aspectos adicionales, la proteína codificada por el gen quimérico es adicionalmente tóxica a una o más especies de insectos seleccionadas del grupo que consiste en barrenador de maíz europeo (*Ostrinia nubilalis*), cogollero del maíz (*Spodoptera frugiperda*), gusano elotero (*Helicoverpa zea*), barrenador de la caña de azúcar (*Diatraea*

saccharalis), oruga de la leguminosa (*Anticarsia gemmatalis*), falso medidor de la soja (*Chrysodeixis includens*), barrenador del maíz del sudoeste (*Diatraea grandiosella*), gusano cortador de frijoles (*Richia albicosta*), cogollero del tabaco (*Heliothis virescens*), barrenador de maíz asiático (*Ostrinia furnacalis*), gusano bellotero del algodón (*Helicoverpa armigera*), perforador rallado del tallo (*Chilo suppressalis*), perforador del tallo rosa (*Sesamia calamistis*), enrollador de las hojas de arroz (*Cnaphalocrocis medinalis*).

En otros aspectos, el polinucleótido comprende una secuencia nucleotídica que tiene una identidad de secuencia con la SEQ ID NO:1, o tiene una identidad de secuencia con la SEQ ID NO:2 o tiene una identidad de secuencia con la SEQ ID NO:3, o tiene una identidad de secuencia con la SEQ ID NO:4.

En otros aspectos, el polinucleótido comprende una secuencia nucleotídica que codifica una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de entre al menos un 80 % y al menos un 99 % con cualquiera de las SEQ ID NO.: 13-16.

En otras realizaciones, el gen quimérico de la invención comprende un polinucleótido que comprende una secuencia sintética de una secuencia nucleotídica que es la SEQ ID NO:10, donde la secuencia sintética tiene codones optimizados para la expresión de un organismo transgénico. En otras realizaciones, el gen quimérico de la invención comprende una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia sintética de una secuencia nucleotídica que codifica una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que es la SEQ ID NO:18, donde la secuencia sintética tiene codones optimizados para la expresión en un organismo transgénico. En otras realizaciones, el organismo transgénico es una planta transgénica.

En algunas realizaciones, la invención se refiere a un polinucleótido sintético que comprende, que consiste esencialmente en o consiste en una secuencia nucleotídica que codifica una proteína que es activa contra al menos un gusano cortador grasiento (*Agrotis ipsilon*), donde la secuencia nucleotídica es la SEQ ID NO:10.

En otras realizaciones, la invención se refiere a un polinucleótido sintético que comprende, que consiste esencialmente en o consiste en una secuencia nucleotídica que codifica una proteína que es activa contra al menos un gusano cortador grasiento (*Agrotis ipsilon*), donde la secuencia nucleotídica codifica una secuencia de aminoácidos que es la SEQ ID NO:18.

De acuerdo con algunas realizaciones, la invención se refiere a una proteína aislada que es tóxica para al menos el gusano cortador grasiento (*Agrotis ipsilon*), donde la proteína comprende, consiste esencialmente en o consiste en (a) una secuencia de aminoácidos que es una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 18 o (b) una secuencia de aminoácidos que está codificada por una secuencia nucleotídica que tiene una secuencia nucleotídica representada por la SEQ ID NO:10.

En otros aspectos, la proteína aislada comprende, consiste esencialmente en o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 80 % a al menos un 99 % con cualquiera de las SEQ ID NOS: 13-16.

En otros aspectos, la secuencia de aminoácidos tiene una identidad de secuencia de al menos un 99 %, o al menos un 99,1 %, o al menos un 99,2 %, o al menos un 99,3 %, o al menos un 99,4 %, o al menos un 99,5 % o al menos un 99,6 %, o al menos un 99,7 %, o al menos un 99,8 %, o al menos un 99,9 % con la SEQ ID NO:14.

En algunos aspectos, la secuencia de aminoácidos comprende la SEQ ID NO:18.

Los anticuerpos generados como respuesta a la provocación inmunitaria con BT-0044, BT-0051, BT-0068 y BT-0128 nativo o mutante y proteínas similares o relacionadas de la presente invención pueden producirse utilizando técnicas inmunológicas estándar para la producción de antisueros policlonales y, si se desea, inmortalizar las células productoras de anticuerpos del huésped inmunizado para fuentes de producción de anticuerpos monoclonales. Las técnicas para producir anticuerpos en cualquier sustancia de interés se describen, p. ej., en Harlow y Lane (1988) y en Goding (1986). La presente invención abarca proteínas insecticidas que tienen una reacción cruzada con anticuerpos generados contra una o más proteínas Cry insecticidas de la presente invención.

Los anticuerpos producidos en la presente invención también son útiles en inmunoensayos para determinar la cantidad o la presencia de una proteína BT-0044, BT-0051, BT-0068 y BT-0128 nativa o mutante o proteína relacionada en una muestra biológica. Dichos ensayos también son útiles en la producción de calidad controlada de composiciones que contienen una o más proteínas tóxicas de la presente invención o proteínas tóxicas relacionadas. Asimismo, se pueden utilizar anticuerpos para evaluar la eficacia de la producción recombinante de una o más de las proteínas de la presente invención o una proteína relacionada, así como para examinar las colecciones de expresión para verificar la presencia de una secuencia nucleotídica que codifica una o más proteínas de la invención o secuencias codificantes de la proteína relacionadas. Los anticuerpos son útiles también como ligandos de afinidad para purificar y/o aislar una o más de las proteínas de la presente invención y proteínas relacionadas. Las proteínas de la presente invención y las proteínas que contienen epítopos antigénicos relacionados pueden obtenerse

mediante la sobreexpresión de longitudes completas o parciales de una secuencia que codifica toda o parte de una proteína de la presente invención o una proteína relacionada en una célula huésped preferida.

Se reconoce que las secuencias de ADN que codifican una proteína Cry nativa de la invención pueden ser alteradas mediante varios métodos, y que dichas alteraciones pueden resultar en secuencias de ADN que codifican proteínas con secuencias de aminoácidos diferentes a las codificadas por una proteína Cry nativa de la invención. Esta proteína puede ser alterada de diferentes formas, que incluyen sustituciones, eliminaciones, truncaciones e inserciones de aminoácido de uno o más aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs:13-16, que incluyen hasta aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7, aproximadamente 8, aproximadamente 9, aproximadamente 10, aproximadamente 15, aproximadamente 20, aproximadamente 25, aproximadamente 30, aproximadamente 35, aproximadamente 40, aproximadamente 45, aproximadamente 50, aproximadamente 55, aproximadamente 60, aproximadamente 65, aproximadamente 70, aproximadamente 75, aproximadamente 80, aproximadamente 85, aproximadamente 90, aproximadamente 100, aproximadamente 105, aproximadamente 110, aproximadamente 115, aproximadamente 120, aproximadamente 125, aproximadamente 130, aproximadamente 135, aproximadamente 140, aproximadamente 145, aproximadamente 150, aproximadamente 155, o más sustituciones, eliminaciones o inserciones de aminoácidos. Los métodos para dichas manipulaciones son generalmente conocidos en la técnica. Por ejemplo, las variantes de secuencia de aminoácidos de una proteína Cry nativa pueden prepararse mediante mutaciones en un polinucleótido que codifica la proteína. Esto se puede lograr también mediante varias formas de mutagénesis y/o evolución dirigida. En algunos aspectos, los cambios codificados en la secuencia de aminoácidos no afectarán sustancialmente la función de la proteína. Dichas variantes tendrán la actividad insecticida deseada. En un aspecto de la invención, se alteran las secuencias nucleotídicas representadas por las SEQ ID NO: 1-4 para introducir sustituciones de aminoácidos en la proteína codificada. En algunos aspectos, la proteína mutante resultante está codificada por un polinucleótido mutante sintético que comprende una secuencia nucleotídica representada por cualquiera de las SEQ ID NO: 9-12. En otros aspectos, las proteínas mutantes comprenden, consisten esencialmente en o consisten en una secuencia de aminoácidos representada por cualquiera de las SEQ ID NO:17-20.

Se entiende que la capacidad de una proteína insecticida de conferir actividad insecticida se puede mejorar mediante el uso de dichas técnicas sobre las composiciones de la invención. Por ejemplo, se puede expresar una proteína Cry en células huésped que exhiben altas tasas de incorporación defectuosa básica durante la replicación de ADN, tales como XL-1 Rojo (Stratagene, La Jolla, CA). Después de la propagación en dichas cepas, se puede aislar el ADN (por ejemplo, preparando ADN plásmido o mediante amplificación por PCR y clonando el fragmento de PCR resultante en un vector), cultivar las mutaciones de proteína Cry en una hebra no mutagénica e identificar los genes mutados con actividad insecticida, por ejemplo, mediante un ensayo para evaluar la actividad insecticida. Generalmente, la proteína se mezcla y utiliza en ensayos de alimentación. Véase, por ejemplo, Marrone et al. (1985) J. of Economic Entomology 78:290-293. Dichos ensayos pueden incluir poner en contacto plantas con una o más plagas y determinar la capacidad de la planta de sobrevivir y/u ocasionar la muerte de las plagas. Los ejemplos de mutaciones que pueden resultar en mayor toxicidad se encuentran en Schnepf et al. (1998) Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62:775-806.

Como alternativa, se pueden hacer alteraciones en una secuencia de aminoácidos de la invención en los extremos amino o carboxi sin afectar sustancialmente la actividad. Esto puede incluir inserciones, eliminaciones o alteraciones introducidas mediante métodos moleculares modernos, tales como PCR, que incluyen amplificaciones por PCR que alteran o prolongan la secuencia codificante de la proteína gracias a la inclusión de secuencias codificantes de aminoácidos en los oligonucleótidos utilizados en la amplificación por PCR. Como alternativa, las secuencias proteicas agregadas pueden incluir secuencias que codifican proteínas completas, como aquellas comúnmente utilizadas en la técnica para generar fusiones de proteínas. Dichas proteínas de fusión suelen utilizarse para (1) aumentar la expresión de una proteína de interés (2) introducir un dominio de unión, actividad enzimática, o epítipo para facilitar la purificación de la proteína, la detección de la proteína u otros usos experimentales conocidos en la técnica (3) secreción o traducción diana de una proteína en un orgánulo subcelular, tal como el espacio periplásmico de bacteria gramnegativa, o el retículo endoplásmico de células eucariotas. Esto último resulta generalmente en la glucosilación de la proteína.

Una proteína Cry también se puede mutar para introducir un epítipo para generar anticuerpos que reconocen la proteína mutada. Por lo tanto, en algunas realizaciones, la invención se refiere a una proteína Cry mutada, donde una sustitución de aminoácido en una proteína Cry nativa produce una proteína Cry mutante que tiene una región antigénica que permite que la proteína Cry mutante se distinga de la proteína Cry nativa en un ensayo de detección de proteínas. En un aspecto, la invención abarca una proteína Cry mutada de la invención donde la secuencia de aminoácidos produce una sustitución de aminoácido en una región que corresponde a los aminoácidos 342 a 354 de la SEQ ID NO:6. En otros aspectos, la secuencia de aminoácidos comprende una sustitución de aminoácido en posición 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353 o 354 de la SEQ ID NO:6. En otros aspectos, la secuencia de aminoácidos comprende una sustitución de aminoácido en una posición de aminoácido que corresponde a los aminoácidos 350, 351 y 354 de la SEQ ID NO:6. En otros aspectos, la secuencia de aminoácidos comprende una sustitución de aminoácido en posiciones de aminoácido 350, 351 y 354 de la SEQ ID NO:6. En otros aspectos, el aminoácido que corresponde a la posición 350 se sustituye con isoleucina (I), el aminoácido que

corresponde a la posición 351 se sustituye con una glutamina (Q) y el aminoácido que corresponde a la posición 354 se sustituye con una serina (S). En otros aspectos, la leucina (L) en posición 350 de la SEQ ID NO:6 se sustituye con una isoleucina (I), la asparagina (N) en posición 351 de la SEQ ID NO:6 se sustituye con una glutamina (Q), y la treonina (T) en posición 354 de la SEQ ID NO:6 se sustituye con una serina (S). En otros aspectos, la proteína Cry nativa comprende una secuencia de aminoácidos representada por cualquiera de las SEQ ID NO:13-16. En otros aspectos, la proteína Cry nativa comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO:6 y la proteína mutante comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO:18.

En algunos aspectos, la invención proporciona un anticuerpo que reconoce específicamente un epítipo de una proteína Cry mutante de la invención, donde el epítipo comprende una secuencia de aminoácidos con una o más sustituciones en los aminoácidos que corresponden a los aminoácidos 342-354 de la SEQ ID NO:6. En otros aspectos, el epítipo comprende una secuencia de aminoácidos con una o más sustituciones en los aminoácidos 342-354 de la SEQ ID NO:6. En otras realizaciones, el epítipo comprende aminoácidos 342-354 de la SEQ ID NO:18.

En algunos aspectos, la invención se refiere a un método para producir un anticuerpo que reconoce de manera diferente una proteína Cry mutada de la proteína Cry nativa de la cual procede la proteína Cry mutada, donde el método comprende las etapas de sustitución de aminoácidos en un bucle antigénico de una proteína Cry nativa y generación de anticuerpos que reconocen de manera específica el bucle antigénico mutado en la proteína Cry mutada y no reconocen la proteína Cry nativa. En un aspecto, el bucle antigénico se identifica en regiones no conservadas fuera del dominio I de la proteína Cry nativa. En otro aspecto, el bucle antigénico no es un bucle involucrado en el reconocimiento del receptor del insecto de la proteína Cry o involucrado en la activación de la proteasa de la proteína Cry. En otro aspecto, el bucle antigénico comprende una secuencia de aminoácidos que corresponde a los aminoácidos 341-354 de la SEQ ID NO:6.

Las secuencias nucleotídicas y de aminoácido variantes de la presente invención también abarcan secuencias obtenidas mediante procedimientos mutagénicos y recombinogénicos tales como reordenamiento de ADN. Con dicho procedimiento, se pueden utilizar una o más regiones codificantes de proteínas tóxicas diferentes para crear una nueva proteína tóxica con las propiedades deseadas. De esta manera, se generan las colecciones de polinucleótidos recombinantes de una población de polinucleótidos de secuencia relacionada que comprenden regiones de secuencia que tienen una identidad de secuencia sustancial y se recombinan homológamente *in vitro* o *in vivo*. Por ejemplo, utilizando este enfoque, los motivos de secuencia que codifican un dominio de interés pueden reordenarse entre un gen plaguicida de la invención y otros genes plaguicidas conocidos para obtener un nuevo gen que codifica una proteína con una propiedad de interés mejorada, como mayor actividad insecticida. Las estrategias para dicho reordenamiento del ADN son conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, Stemmer (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:10747-10751; Stemmer (1994) Nature 370:389-391; Crameri et al. (1997) Nature Biotech. 15:436-438; Moore et al. (1997) J. Mol. Biol. 272:336-347; Zhang et al. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:4504-4509; Crameri et al. (1998) Nature 391:288-291; y las patentes de Estados Unidos n.º 5 605 793 y 5 837 458.

El cambio o el reordenamiento del dominio es otro mecanismo para generar proteínas Cry alteradas de la invención. Los dominios pueden cambiar entre las proteínas Cry, lo que resulta en proteínas tóxicas híbridas o quiméricas con mejor actividad pesticida o espectro diana. En la técnica se conocen los métodos para generar proteínas recombinantes y estudiarlas para verificar la actividad plaguicida (véanse, por ejemplo, Naimov et al. (2001) Appl. Environ. Microbiol. 67:5328-5330; de Maagd et al. (1996) Appl. Environ. Microbiol. 62:1537-1543; Ge et al. (1991) J. Biol. Chem. 266:17954-17958; Schnepf et al. (1990) J. Biol. Chem. 265:20923-20930; Rang et al. 1999) Appl. Environ. Microbiol. 65:2918-2925).

En algunas realizaciones, la invención se refiere a un vector recombinante que comprende un polinucleótido, una molécula de ácido nucleico, un casete de expresión o un gen quimérico de la invención. En otras realizaciones, el vector se define como un plásmido, un cósmido, un fagémido, un cromosoma artificial, fago o vector vírico. En la técnica se conocen algunos vectores para uso en la transformación de plantas y otros organismos.

Por lo tanto, algunas realizaciones de la invención se refieren a a casetes de expresión diseñados para expresar polinucleótidos y moléculas de ácido nucleico de la invención. Como se utiliza en la presente, "casete de expresión" significa una molécula de ácido nucleico que tiene al menos una secuencia de control unida operablemente a una secuencia nucleotídica de interés. De esta manera, por ejemplo, se proporcionan los promotores vegetales unidos operablemente a las secuencias nucleotídicas que se expresarán en casetes de expresión para la expresión en una planta, parte de una planta y/o célula vegetal.

Un casete de expresión que comprende una secuencia nucleotídica de interés puede ser quimérico, lo que significa que al menos uno de sus componentes es heterólogo con respecto a al menos uno de sus otros componentes. Un casete de expresión también puede ser uno de origen natural pero que ha sido obtenido en una forma recombinante útil para la expresión heteróloga. Normalmente, sin embargo, el casete de expresión es heterólogo con respecto al huésped, es decir, la secuencia de ácido nucleico particular del casete de expresión no ocurre de manera natural en la célula huésped y debe ser introducida en la célula huésped o un ancestro de la célula huésped mediante un evento de transformación.

Además de los promotores unidos funcionalmente a las secuencias nucleotídicas de la invención, un casete de expresión de esta invención también puede incluir otras secuencias reguladoras. Como se utiliza en la presente, "secuencias reguladoras" significa secuencias nucleotídicas ubicadas cadena arriba (secuencias no codificantes en la región 5') dentro o cadena abajo (secuencias no codificantes en la región 3') de una secuencia codificante y que influyen en la transcripción, procesamiento o estabilidad del ARN o traducción de la secuencia codificante asociada. Las secuencias reguladoras incluyen, entre otros, potenciadores, intrones, secuencias de traducción líder, señales de terminación y secuencias de señales de poliadenilación.

En algunas realizaciones, un casete de expresión de la invención también puede incluir secuencias nucleotídicas que codifican otras características deseadas. Dichas secuencias nucleotídicas pueden acumularse con cualquier combinación de secuencias nucleotídicas para crear plantas, partes de plantas o células vegetales que tienen el fenotipo deseado. Las combinaciones acumuladas pueden crearse mediante cualquier método que incluye, por ejemplo, el cruce de plantas mediante una metodología convencional o transformación genética (es decir, acumulación molecular). Si existe acumulación mediante la transformación genética de las plantas, las secuencias nucleotídicas de interés pueden combinarse en todo momento y en cualquier orden. Por ejemplo, se puede utilizar una planta transgénica que comprende una o más características deseadas como diana para introducir otras características mediante transformación posterior. Las secuencias nucleotídicas adicionales pueden introducirse simultáneamente en un protocolo de cotransformación con una secuencia nucleotídica, una molécula de ácido nucleico, un constructo de ácido nucleico y/o una composición de la invención, proporcionados mediante cualquier combinación de casetes de expresión. Por ejemplo, si se introducen dos secuencias nucleotídicas, éstas pueden incorporarse en casetes independientes (*trans*) o en el mismo casete (*cis*). La expresión de polinucleótidos puede estar dirigida por el mismo promotor o por promotores diferentes. Se reconoce que los polinucleótidos pueden apilarse en una ubicación genómica deseada utilizando un sistema de recombinación específica del sitio. Véanse p. ej., las publicaciones de solicitudes internacionales de patente n.º WO 99/25821; WO 99/25854; WO 99/25840; WO 99/25855 y WO 99/25853.

El casete de expresión también puede incluir una secuencia que codifica uno o más polipéptidos para caracteres agronómicos que benefician principalmente a una empresa productora de semillas, un productor o procesador de granos. Un polipéptido de interés puede ser cualquier polipéptido codificado por una secuencia nucleotídica de interés. Los ejemplos no limitantes de polipéptidos de interés que son adecuados para la producción en plantas incluyen aquellos que resultan en caracteres agronómicamente importantes tales como resistencia a herbicidas (también denominada a veces "tolerancia a herbicidas"), resistencia a virus, resistencia a patógenos bacterianos, resistencia a insecticidas, resistencia a nematodos y/o resistencia fúngica. Véanse, p. ej., las patentes de Estados Unidos n.º 5 569 823; 5 304 730; 5 495 071; 6 329 504 y 6 337 431. El polipéptido también puede ser uno que aumenta el vigor o la resistencia de la planta (incluidas las características que permiten que una planta crezca a diferentes temperaturas, condiciones del suelo y niveles de luz y precipitación), o uno que permita la identificación de una planta que exhibe una característica de interés (p. ej., un marcador seleccionable, color de revestimiento de la semilla, etc.). En las patentes de Estados Unidos n.º 4 761 373; 4 769 061; 4 810 648; 4 940 835; 4 975 374; 5 013 659; 5 162 602; 5 276 268; 5 304 730; 5 495 071; 5 554 798; 5 561 236; 5 569 823; 5 767 366; 5 879 903; 5 928 937; 6 084 155; 6 329 504 y 6 337 431; así como en la publicación de patente de Estados Unidos n.º 2001/0016956 se describen varios polipéptidos de interés, al igual que métodos para introducir estos polipéptidos en una planta. Véase también, www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/.

Los polinucleótidos que confieren resistencia/tolerancia a un herbicida que inhibe el punto de crecimiento o meristemo, tal como una imidazalinona o una sulfonilurea también son adecuados en algunas realizaciones de la invención. Los polinucleótidos ejemplares en este código de categoría para enzimas ALS y AHAS mutantes se describen, p. ej. en las patentes de Estados Unidos n.º 5 767 366 y 5 928 937. Las patentes de Estados Unidos n.º 4 761 373 y 5 013 659 se refieren a plantas resistentes a diversos herbicidas de tipo imidazolinona o sulfonamida. La patente de Estados Unidos n.º 4 975 374 se refiere a células vegetales y plantas que contienen ácidos nucleicos que codifican una glutamina sintetasa (GS) resistente a la inhibición con herbicidas que se sabe que inhiben GS, p. ej., fosfinotricina y metionina sulfoximina. La patente de Estados Unidos n.º 5 162 602 divulga plantas resistentes a la inhibición por parte de herbicidas de ciclohexanodiona y ácido ariloxifenoxipropanoico. La resistencia se logra gracias a una acetil-CoA carboxilasa (ACCase).

Los polipéptidos codificados por secuencias nucleotídicas que confieren resistencia a glifosato también son adecuados para la invención. Véanse por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 4 940 835 y la patente de Estados Unidos n.º 4 769 061. La patente de Estados Unidos n.º 5 554 798 divulga plantas de maíz resistentes al glifosato transgénico y dicha resistencia se logra mediante un gen 5-enolpiruvil shikimato-3-fosfato (EPSP) sintasa.

Los polinucleótidos que codifican resistencia a compuestos de fósforo tales como glufosinato amonio o fosfinotricina, y ácidos piridinoxi o fenoxipropiónicos y ciclohexonas también son adecuados. Véase la solicitud de patente europea n.º 0 242 246. Véanse, también las patentes de Estados Unidos n.º 5 879 903; 5 276 268 y 5 561 236.

Otros polinucleótidos adecuados incluyen aquellos que codifican resistencia a herbicidas que inhiben la fotosíntesis, tales como una triazina y un benzonitrilo (nitrilasa) Véase la patente de Estados Unidos n.º 4 810 648. Los

polinucleótidos adecuados adicionales que codifican resistencia a herbicidas incluyen aquellos que codifican resistencia a herbicidas con ácido 2,2-dicloropropiónico, setoxidima, haloxifop, imidazolinona, herbicidas de tipo sulfonilurea, herbicidas de tipo triazolopirimidina, herbicidas de tipo s-triazina y bromoxinilo. Son adecuados los polinucleótidos que confieren resistencia a una enzima protox o que confieren una mejor resistencia a enfermedades de plantas; mayor tolerancia a condiciones ambientales adversas (tensiones abióticas) que incluyen, entre otros, sequía, frío excesivo, calor excesivo, salinidad del suelo excesiva o acidez o alcalinidad extremas; y alteraciones en la arquitectura o en el desarrollo de la planta, que incluyen cambios en el tiempo de desarrollo. Véanse por ejemplo, la publicación de patente de Estados Unidos n.º 2001/0016956 y la patente de Estados Unidos n.º 6 084 155.

Los polinucleótidos adecuados incluyen aquellos que codifican polipéptidos plaguicidas (p. ej. insecticidas). Estos polipéptidos pueden producirse en cantidades suficientes para controlar, por ejemplo, las plagas de insectos (es decir, cantidades de control de insectos). Se reconoce que la cantidad de producción de un polipéptido plaguicida en una planta necesaria para controlar insectos u otras plagas puede variar dependiendo del tipo de plaga, factores ambientales, entre otras condiciones. Los polinucleótidos útiles para la resistencia adicional a insectos o plagas incluyen, por ejemplo, aquellos que codifican toxinas identificadas en los organismos *Bacillus*. Se han clonado los polinucleótidos que comprenden secuencias nucleotídicas que codifican las proteínas insecticidas de *Bacillus thuringiensis* (Bt) de varias subespecies y se ha descubierto que los clones recombinantes son tóxicos para larvas de lepidópteros, dípteros y coleópteros. Los ejemplos de dichas proteínas insecticidas de Bt incluyen las proteínas Cry tales como, por ejemplo, *Cry1Aa*, *Cry1Ab*, *Cry1Ac*, *Cry1B*, *Cry1C*, *Cry1D*, *Cry1Ea*, *Cry1Fa*, *Cry3A*, *Cry9A*, *Cry9B*, *Cry9C*, y similares así como las proteínas insecticidas vegetativas tales como *Vip1*, *Vip2*, *Vip3*, y similares. Se puede encontrar una lista completa de las proteínas procedentes de Bt en la página web de la Base de Datos de la Nomenclatura de toxinas de *Bacillus thuringiensis* confeccionada por la Universidad de Sussex (véase también Crickmore *et al.* (1998) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:807-813).

Los polipéptidos que son adecuados para la producción en plantas incluyen además aquellos que mejoran o facilitan la conversión de las plantas cosechadas y/o partes de plantas en un producto de utilidad comercial que incluyen, por ejemplo, un contenido y/o distribución de carbohidratos aumentado o alterado, mejores propiedades de fermentación, mayor contenido de aceite, mayor contenido proteico, mejor digestibilidad, y mayor contenido nutracéutico, p. ej., mayor contenido de fitosteroles, mayor contenido de tocoferoles, mayor contenido de estanoles y/o mayor contenido de vitaminas. Los polipéptidos de interés también incluyen, por ejemplo, aquellos que resultan en o contribuyen a un contenido reducido de un componente no deseado en una cosecha, p. ej., ácido fítico, o enzimas degradadoras de azúcares. Los términos "que resulta en" o "que contribuye con" pretenden indicar que el polipéptido de interés puede contribuir directa o indirectamente a la existencia de una característica de interés (p. ej., mayor degradación celulósica mediante el uso de una enzima de celulasa heteróloga).

En un aspecto, el polipéptido contribuye a una mejor digestibilidad para alimento o pienso. Las xilanasas son enzimas hemicelulóticas que mejoran la degradación de las paredes celulares de las plantas, lo que deriva en una mejor utilización por parte de un animal de los nutrientes vegetales. Esto resulta en una mejor tasa de crecimiento y una conversión alimenticia. Asimismo, se puede reducir la viscosidad de los alimentos que contienen xilano. La producción heteróloga de xilanasas en células vegetales también puede facilitar la conversión lignocelulósica en azúcares fermentables en procesos industriales.

Se han identificado y caracterizado las numerosas xilanasas de microorganismos fúngicos y bacterianos (véanse, p. ej., la patente de Estados Unidos n.º 5 437 992; Coughlin *et al.* (1993) "Proceedings of the Second TRICEL Symposium on *Trichoderma reesei* Cellulases and Other Hydrolases" Espoo; Souminen y Reinikainen, eds. (1993) *Foundation for Biotechnical and Industrial Fermentation Research* 8:125-135; la publicación de patente n.º 2005/0208178; y publicación PCT n.º WO 03/16654). En particular, se han identificado tres xilanasas específicas (XYL-I, XYL-II, y XYL-III) en *T. reesei* (Tenkanen *et al.* (1992) *Enzyme Microb. Technol.* 14:566; Torronen *et al.* (1992) *Bio/Technology* 10:1461; y Xu *et al.* (1998) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 49:718).

En otros aspectos, un polipéptido útil para la invención puede ser una enzima que degrada polisacáridos. Las plantas de esta invención que producen dicha enzima pueden ser útiles para generar, por ejemplo, materias primas de fermentación para el bioprocesado. En algunas realizaciones, las enzimas útiles para el proceso de fermentación incluyen alfa amilasas, proteasas, pululanases, isoamilasas, celulasas, hemicelulasas, xilanasas, ciclodextrina glucotransferasas, lipasas, fitasas, lacasas, oxidasas, esterases, cutinasas, enzimas que hidrolizan almidón granulado y otras glucoamilasas.

Las enzimas que degradan polisacáridos incluyen: enzimas que degradan almidón tales como α -amilasas (EC 3.2.1.1), glucuronidasas (E.C. 3.2.1.131); exo-1,4- α -D glucanasas tales como amiloglucosidasas y glucoamilasa (EC 3.2.1.3), β -amilasas (EC 3.2.1.2), α -glucosidasas (EC 3.2.1.20), y otras exo-amilasas; enzimas que desramifican almidón tales como, por ejemplo, a) isoamilasa (EC 3.2.1.68), pululanasa (EC 3.2.1.41), y similares; b) celulasas tales como, por ejemplo, exo-1,4-3-celobiohidrolasa (EC 3.2.1.91), exo-1,3- β -D-glucanasa (EC 3.2.1.39), β -glucosidasa (EC 3.2.1.21); c) L-arabinasas, tales como endo-1,5- α -L-arabinasa (EC 3.2.1.99), α -arabinosidasas (EC 3.2.1.55) y similares; d) galactanasas tales como endo-1,4- β -D-galactanasa (EC 3.2.1.89), endo-1,3- β -D-galactanasa (EC 3.2.1.90), α -galactosidasa (EC 3.2.1.22), β -galactosidasa (EC 3.2.1.23) y similares; e) mananasas,

tales como endo-1,4- β -D-mananasa (EC 3.2.1.78), β -manosidasa (EC 3.2.1.25), α -manosidasa (EC 3.2.1.24) y similares; f) xilanasas, tales como endo-1,4- β -xilanasas (EC 3.2.1.8), β -D-xilosidasa (EC 3.2.1.37), 1,3- β -D-xilanasas, y similares; y g) otras enzimas tales como α -L-fucosidasa (EC 3.2.1.51), α -L-ramnosidasa (EC 3.2.1.40), levanasa (EC 3.2.1.65), inulanasa (EC 3.2.1.7), y similares. En una realización, la α -amilasa es la α -amilasa sintética, Amy797E, descrita en la patente de Estados Unidos n.º 8 093 453.

Otras enzimas que pueden utilizarse con la invención incluyen proteasas, tales como proteasas fúngicas y bacterianas. Las proteasas fúngicas incluyen, entre otras, aquellas obtenidas de *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Mucor* y *Rhizopus*, tales como *A. niger*, *A. awamori*, *A. oryzae* y *M. miehei*. En algunos aspectos, los polipéptidos de esta invención pueden ser enzimas celobiohidrolasas (CBH) (EC 3.2.1.91). En una realización, la enzima celobiohidrolasa puede ser CBH1 o CBH2.

Otras enzimas útiles con la invención incluyen, entre otras, hemicelulasas, tales como manasas y arabinofuranosidasas (EC 3.2.1.55); ligninasas; lipasas (p. ej., E.C. 3.1.1.3), glucosa oxidasas, pectinasas, xilanasas, transglucosidasas, alfa 1,6 glucosidasas (p. ej., E.C. 3.2.1.20); esterases tales como ácido ferúlico esterasa (EC 3.1.1.73) y acetil xilano esterases (EC 3.1.1.72); y cutinasas (p. ej. E.C. 3.1.1.74).

En algunas realizaciones, la invención se refiere a una célula huésped no humana que comprende un polinucleótido, una molécula de ácido nucleico, un gen quimérico, un casete de expresión o un vector recombinante de la invención. La célula huésped no humana transgénica puede incluir, entre otras, una célula vegetal, una célula de levadura, una célula bacteriana o una célula de insecto. Por lo tanto, en algunos aspectos, la invención se refiere a una célula bacteriana seleccionada entre los géneros *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Clostridium*, *Xenorhabdus*, *Photorhabdus*, *Pasteuria*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Serratia*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Pasteurella*, *Xanthomonas*, *Streptomyces*, *Rhizobium*, *Rhodopseudomonas*, *Methylophilus*, *Agrobacterium*, *Acetobacter*, *Lactobacillus*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Leuconostoc*, o *Alcaligenes*. Por lo tanto, por ejemplo, como agentes biológicos de control de insectos, las proteínas Cry de la invención se pueden producir mediante expresión del gen quimérico que codifica las proteínas Cry de la invención en una célula bacteriana. Por ejemplo, en una realización, se proporciona una célula de *Bacillus thuringiensis* que comprende un gen quimérico de la invención.

En otras realizaciones la invención proporciona una célula vegetal que es una célula de una planta dicotiledónea o una célula de una planta monocotiledónea. En aspectos adicionales, la célula de la planta dicotiledónea se selecciona del grupo que consiste en una célula de soja, una célula de girasol, una célula de tomate, célula de cultivo de col, célula de algodón, célula de remolacha y célula de tabaco. En aspectos adicionales, la célula de la planta monocotiledónea se selecciona del grupo que consiste en una célula de centeno, célula de maíz célula de avena, célula de arroz, célula de sorgo, célula de caña de azúcar y célula de trigo. En algunos aspectos, la invención proporciona una pluralidad de células de plantas dicotiledóneas o monocotiledóneas que expresan una proteína tóxica de la invención codificada mediante un gen quimérico de la invención. En otros aspectos, la pluralidad de células se juxtapone para formar un apoplasto y se cultivan en luz solar natural.

En otra realización de la invención, se expresa una proteína tóxica de la invención en un organismo superior, por ejemplo, una planta. En este caso, las plantas transgénicas que expresan cantidades efectivas de la proteína tóxica se protegen a sí mismas de las plagas de plantas tales como plagas de insectos. Cuando el insecto comienza a alimentarse con dicha planta transgénica, también ingiere la toxina expresada. Esto puede evitar que el insecto muera el tejido vegetal o puede incluso dañar o matar al insecto. Se inserta un polinucleótido de la invención en un casete de expresión, que posteriormente se integra de manera estable en el genoma de la planta. En otra realización, se incluye el polinucleótido en un virus autorreplicante no patógeno. Las plantas transformadas de acuerdo con la invención pueden ser plantas mono o dicotiledóneas e incluyen, entre otras, maíz, soja, arroz, trigo, centeno, cebada, avenas, sorgo, mijo, girasol, cártamo, remolacha, algodón, caña de azúcar, colza oleaginosa, alfalfa, tabaco, cacahuetes, hortalizas tales como, por ejemplo, batata, frijol, garbanzo, achicoria, lechuga, repollo, coliflor, brócoli, nabo, zanahoria, berenjena, pepino, rábano, espinaca, patata, tomate, espárrago, cebolla, ajo, melones, pimiento, apio, calabaza, zapallo, calabacín, frutas tales como manzana, pera, membrillo, ciruela, cereza, melocotón, nectarina, albaricoque, fresa, uva, frambuesa, mora, piña, aguacate, papaya, mango, plátano y plantas especializadas tales como *Arabidopsis*, y plantas leñosas tales como coníferas y caducifolias. Preferentemente, las plantas de la invención son cultivos vegetales como maíz, sorgo, trigo, girasol, tomate, crucíferas, pimientos, patatas, algodón, arroz, soja, remolacha, caña de azúcar, tabaco, cebada, colza oleaginosa y similares.

Una vez que se ha transformado con el polinucleótido deseado una especie de planta particular, puede propagarse en dicha especie o cambiar a otras variedades de la misma especie, particularmente variedades comerciales, mediante el uso de técnicas de reproducción.

Un polinucleótido de la invención se expresa en plantas transgénicas, y propicia de esta manera la biosíntesis de la proteína Cry correspondiente en las plantas transgénicas. De esta manera, se generan plantas transgénicas con mejor protección del rendimiento en presencia de presión por parte del insecto. Para su expresión en plantas transgénicas, las secuencias nucleotídicas de la invención pueden necesitar una modificación y optimización. Aunque en muchos casos se pueden expresar genes a partir de organismos microbianos en plantas a niveles más altos sin modificación, puede producirse una expresión baja en plantas transgénicas a partir de secuencias

nucleotídicas microbianas que tienen codones que no son los preferidos en plantas. En la técnica se sabe que los organismos vivos tienen preferencias específicas para el uso de codones y los codones de las secuencias nucleotídicas descritas en la invención pueden modificarse para adaptarse a las preferencias de plantas a la vez que mantienen los aminoácidos codificados por ellas. Además, una expresión alta en plantas, por ejemplo, plantas de maíz, se logra con mayor eficacia a partir de secuencias codificantes que tienen un contenido de GC de al menos aproximadamente un 35 %, o al menos aproximadamente un 45 % o al menos aproximadamente un 50 %, o al menos aproximadamente un 60 %. Las secuencias nucleotídicas microbianas que tienen contenidos de GC bajos pueden tener una expresión deficiente en plantas debido a la existencia de motivos ATTTA que pueden desestabilizar mensajes, y motivos AATAAA que pueden ocasionar una poliadenilación inadecuada. Aunque algunas secuencias genéticas pueden expresarse de manera adecuada tanto en especies de plantas monocotiledóneas como dicotiledóneas, las secuencias pueden modificarse para tener en cuenta las preferencias de codones específicas y las preferencias del contenido de GC de monocotiledóneas o dicotiledóneas dado que se ha mostrado que dichas preferencias difieren (Murray et al. Nucl. Acids Res. 17:477-498 (1989)). Además, se han cribado las secuencias nucleotídicas para en función de la existencia de sitios de corte y empalme ilegítimos que pueden causar un truncamiento del mensaje. Todos los cambios que es necesario realizar en las secuencias nucleotídicas tales como aquellos descritos anteriormente se pueden llevar a cabo utilizando técnicas muy conocidas de mutagénesis dirigida al sitio, PCR, y construcción del gen sintético utilizando métodos descritos, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos n.º 5 625 136; 5 500 365 y 6 013 523.

En algunos aspectos, la invención hace referencia a genes sintéticos producidos de acuerdo con el procedimiento divulgado en la patente de Estados Unidos n.º 5 625 136. En este procedimiento, se utilizan los codones preferidos de maíz es decir, el codón único que codifica con mayor frecuencia dicho aminoácido en maíz. El codón preferido de maíz para un aminoácido particular puede proceder, por ejemplo, de secuencias genéticas conocidas del maíz. Por ejemplo, el uso del codón de maíz para 28 genes de plantas de maíz se puede encontrar en Murray *et al.*, Nucleic Acids Research 17:477-498 (1989). Las secuencias sintéticas ejemplificadas específicamente de la presente invención realizadas con codones optimizados de maíz están representadas en una de las SEQ ID NO: 13 a 20. De esta manera las secuencias nucleotídicas pueden optimizarse para la expresión en cualquier planta. Se reconoce que toda o una parte de una secuencia nucleotídica puede ser óptima o sintética. Es decir, un polinucleótido puede comprender una secuencia nucleotídica que es, en parte, una secuencia nativa y en parte, una secuencia óptima sintética.

Para la iniciación eficiente de la traducción, las secuencias adyacentes a la metionina de inicio pueden necesitar modificación. Por ejemplo, pueden modificarse mediante la inclusión de secuencias que son eficaces en plantas. Joshi ha sugerido un consenso adecuado para plantas (NAR 15:6643-6653 (1987)) y Clonetech sugiere otro consenso para iniciadores de la traducción (catálogo 1993/1994, página 210). Estos consensos son adecuados para uso con las secuencias nucleotídicas de esta invención. Las secuencias se incorporan en construcciones que comprenden las secuencias nucleotídicas, hasta e incluido ATG (mientras se deja el segundo aminoácido intacto), o como alternativa, hasta e incluido GTC posterior a ATG (con la posibilidad de modificar el segundo aminoácido del transgen).

Las nuevas secuencias codificantes de la proteína *Cry* de la invención, ya sea como sus secuencias nativas o sintéticas como se describieron anteriormente, pueden fusionarse funcionalmente con diversos promotores para la expresión en plantas que incluyen promotores preferidos de tejido y específicos de tejido constitutivos, inducibles, regulados temporalmente, regulados para el desarrollo, regulados químicamente, para preparar moléculas de ADN recombinante, es decir, genes quiméricos. La elección del promotor variará dependiendo de los requisitos temporales y espaciales para la expresión y dependiendo de las especies diana. Por lo tanto, se prefiere la expresión de secuencias nucleotídicas de esta invención en hojas, en tallos, en mazorcas, en inflorescencias (p. ej., puntas, panojas, choclos, etc.), en raíces y/o plántones. Sin embargo, en muchos casos, se busca la protección contra más de un tipo de plaga de insecto y por ende se desea la expresión en múltiples tejidos. Aunque se ha demostrado que muchos promotores de dicotiledóneas son funcionales en monocotiledóneas y viceversa, los promotores dicotiledóneos se seleccionan, idealmente, para la expresión en dicotiledóneas, y los promotores monocotiledóneos para la expresión en monocotiledóneas. Sin embargo, no existe restricción respecto al origen de los promotores seleccionados; es suficiente que sean funcionales en la dirección de la expresión de las secuencias nucleotídicas en la célula deseada.

Los ejemplos de promotores constitutivos útiles en la invención incluyen los promotores CaMV 35S y 19S (Fraley et al., patente de Estados Unidos n.º 5 352 605). Adicionalmente un promotor procede de cualquiera de los varios genes de la actina, que se expresan en la mayoría de los tipos celulares. Los casetes de expresión del promotor descritos por McElroy et al. (Mol. Gen. Genet. 231: 150-160 (1991)) pueden modificarse fácilmente para la expresión del gen de la toxina nuevo y son particularmente adecuados para uso en huésped monocotiledóneos. Otro promotor constitutivo deriva de ubiquitina, que es otro producto genético conocido por acumularse en muchos tipos celulares. Un promotor de la ubiquitina se ha clonado de varias especies para uso en plantas transgénicas, por ejemplo, girasol (Binet et al., 1991. Plant Science 79: 87-94), maíz (Christensen et al., 1989. Plant Molec. Biol. 12: 619-632), y *Arabidopsis* (Norris et al. 1993. Plant Molec. Biol. 21:895-906). Se ha desarrollado el promotor de la ubiquitina de maíz en sistemas de plantas monocotiledóneas transgénicas y su secuencia y vectores construidos para la transformación de monocotiledóneas se divulgan en la publicación de patente EP 0342 926. El promotor de la

ubiquitina es adecuado para la expresión del nuevo gen de toxina en plantas transgénicas, especialmente monocotiledóneas.

Los promotores específicos de tejido o preferenciales en tejido útiles para la expresión de las nuevas secuencias codificantes de la proteína *Cry* de la invención en plantas, particularmente maíz, son aquellas que dirigen la expresión en raíces, médulas, hojas o polen. Dichos promotores se divulgan en la patente de Estados Unidos n.º 5625136. Otros promotores específicos de tejido útiles en la presente invención incluyen el promotor de rubisco de algodón divulgado en la patente de Estados Unidos n.º 6 040 504; el promotor de la sacarosa sintasa del arroz divulgado en la patente de Estados Unidos n.º 5 604 121; y el promotor del virus del enrollamiento de la hoja amarilla del cestrum divulgado en la patente de Estados Unidos n.º 7 166 770. Los promotores químicamente inducibles útiles para dirigir la expresión del gen de toxina nuevo en plantas se divulgan en la patente de Estados Unidos n.º 5 614 395.

Las secuencias nucleotídicas de esta invención también pueden expresarse en la regulación de promotores que se regulan químicamente. Esto permite que las proteínas *Cry* de la invención se sinteticen únicamente cuando los cultivos son tratados con los agentes químicos de inducción. Los ejemplos de dicha tecnología para la inducción química de la expresión del gen se detalla en la solicitud publicada EP 0 332 104 y la patente de Estados Unidos n.º 5 614 395. En un aspecto, el promotor regulado químicamente es el promotor del tabaco PR-1a.

Otra categoría de promotores útiles en la invención es aquella inducible por daño. Se han descrito numerosos promotores que se expresan en los sitios de daño y también en los sitios de la infección fitopatógena. Idealmente, dicho promotor debería ser activo únicamente a nivel local en los sitios de invasión del insecto, y de esta forma las proteínas insecticidas solo se acumulan en las células que necesitan sintetizar las proteínas insecticidas para matar la plaga de insectos invasora. Los ejemplos de promotores de este tipo incluyen aquellos descritos por Stanford et al. *Mol. Gen. Genet.* 215:200-208 (1989), Xu et al. *Plant Molec. Biol.* 22:573-588 (1993), Logemann et al. *Plant Cell* 1:151-158 (1989), Rohrmeier & Lehle, *Plant Molec. Biol.* 22:783-792 (1993), Firek et al. *Plant Molec. Biol.* 22:129-142 (1993), y Warner et al. *Plant J.* 3:191-201 (1993).

Los ejemplos no limitantes de promotores que causan patrones de expresión específicos del tejido que son útiles en la invención incluyen los específicos del tejido verde, específicos de la raíz, específicos del tallo y/o específicos de la flor. Los promotores adecuados para la expresión en el tejido verde incluyen muchos que regulan los genes involucrados en la fotosíntesis y muchos de estos se han clonado de monocotiledóneas y dicotiledóneas. Uno de dichos promotores es el promotor PEPC del maíz del gen de la fosfoenol carboxilasa (Hudspeth & Grula, *Plant Molec. Biol.* 12:579-589 (1989)). Otro promotor para la expresión específica de la raíz es aquel descrito por de Framond (FEBS 290:103-106 (1991) o la patente de Estados Unidos n.º 5 466 785). Otro promotor útil en la invención es el promotor específico del tallo descrito en la patente de Estados Unidos n.º 5 625 136 que dirige de manera natural la expresión de un gen *trpA* del maíz.

Además de la selección de un promotor adecuado, los constructos para la expresión de una toxina insecticida en plantas requieren un terminador de la transcripción adecuado para unirse operablemente cadena abajo a la secuencia nucleotídica heteróloga. Se encuentran disponibles varios de dichos terminadores y estos son conocidos en la técnica (p. ej., tml de CaMV, E9 de rbcS). En el contexto de esta invención se puede utilizar cualquier terminador disponible que se sabe que funciona en plantas.

Se pueden incorporar varias secuencias diferentes en los casetes de expresión descritos en esta invención. Estas incluyen secuencias que han demostrado que mejoran la expresión como las secuencias intrónicas (p. ej., de Adh1 y bronzel) y las secuencias líder víricas (p. ej., de TMV, MCMV y AMV).

Puede resultar preferible dirigir la expresión de las secuencias nucleotídicas de la presente invención a diferentes ubicaciones celulares en la planta. En algunos casos, puede resultar deseable la localización en el citosol, mientras que en otros casos, se puede preferir la ubicación en el orgánulo subcelular. Se puede utilizar cualquier mecanismo para dirigir los productos génicos, p. ej., en plantas, para poner en práctica la invención y se sabe que dichos mecanismos existen en plantas y se han caracterizado las secuencias que controlan el funcionamiento de estos mecanismos con cierto detalle. Se han caracterizado secuencias que provocan el direccionamiento de los productos génicos a otros compartimientos celulares. Las secuencias del extremo amino pueden ser responsables de dirigir una proteína de interés a un compartimiento celular, tal como una vacuola, mitocondria, peroxisoma, cuerpos proteicos, retículo endoplásmico, cloroplastos, gránulos de almidón, amiloplastos, apoplastos, o pared celular de una planta (p. ej., Unger et al. *Plant Molec. Biol.* 13: 411-418 (1989); Rogers et al. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 6512-651; patentes de Estados Unidos n.º 7.102.057; WO 2005/096704. Opcionalmente, la secuencia señal puede ser una secuencia señal N-terminal de cera, una secuencia señal N-terminal de gamma-zeína, un dominio de unión de almidón, un dominio de unión de almidón C-terminal, una secuencia de direccionamiento al cloroplasto, que importa la proteína madura al cloroplasto (Comai et al. (1988) *J. Biol. Chem.* 263: 15104-15109; van den Broeck, et al. (1985) *Nature* 313: 358-363; patente de Estados Unidos n.º 5 639 949) o una secuencia señal de secreción de células de aleurona (Koehler & Ho, *Plant Cell* 2: 769-783 (1990)). Asimismo, las secuencias amino-terminales junto con las secuencias carboxi-terminales son responsables del direccionamiento vacuolar de los productos génicos (Shinshi et al. (1990) *Plant Molec. Biol.* 14: 357-368). En un aspecto, la secuencia señal seleccionada incluye el

sitio de escisión conocido, y la fusión construida tiene en cuenta cualquier aminoácido después de los sitios de escisión, que son necesarios para la escisión. En algunos casos, este requisito puede lograrse mediante la incorporación de un pequeño número de aminoácidos entre el sitio de escisión y el transgen ATG o como alternativa, mediante el reemplazo de algunos aminoácidos con la secuencia del transgen. Estas técnicas de construcción son conocidas en la técnica y se aplican de manera igual a cualquier compartimiento celular.

Se reconocerá que los mecanismos descritos anteriormente para el direccionamiento celular pueden utilizarse no solo junto con sus promotores afines, sino también junto con promotores heterólogos para cumplir con un objetivo de direccionamiento celular específico en la regulación transcripcional de un promotor que tiene un patrón de expresión diferente al del promotor de cual procede la señal de direccionamiento.

Transformación vegetal

Los procedimientos para la transformación de plantas son conocidos y habituales en la técnica y se describen en toda la bibliografía. Los ejemplos no limitantes de métodos para la transformación de plantas incluyen la transformación mediante la administración de ácido nucleico mediado por bacterias (p. ej., mediante *Agrobacterium*), la administración de ácido nucleico mediado por virus, la administración de ácido nucleico mediado por bigotes (*whisker*) de ácido nucleico o carburo de silicio, administración de ácido nucleico mediado por liposomas, microinyección, bombardeo de micropartículas, transformación mediada por calcio y fosfato, transformación mediada por ciclodextrina, electroporación, transformación mediada por nanopartículas, sonicación, infiltración, absorción de ácido nucleico mediada por PEG, así como otro mecanismo eléctrico, químico, físico (mecánico) y/o biológico que resulta en la introducción de ácido nucleico en la célula vegetal, incluso cualquier combinación de estos. Las guías generales de métodos de transformación vegetal conocidas en la técnica incluyen Miki et. al. ("Procedures for Introducing Foreign DNA into Plants" en *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*, Glick, B. R. y Thompson, J. E., Eds. (CRC Press, Inc., Boca Raton, 1993), páginas 67-88) y Rakowoczy-Trojanowska (*Cell. Mol. Biol. Lett.* 7:849-858 (2002)).

Para la transformación mediada por *Agrobacterium*, son adecuados los vectores binarios o vectores que tienen al menos una secuencia límite de ADN-T, mientras que para la transferencia de gen directa (p. ej., bombardeo de partículas y similar) se puede utilizar cualquier vector y se puede utilizar un ADN lineal que contiene únicamente la construcción de interés. En el caso de la transferencia directa del gen, se puede utilizar la transformación con una especie única de ADN o la cotransformación (Schocher et al., *Biotechnology* 4:1093-1096 (1986)). Para la transferencia directa del gen y la transferencia mediada por *Agrobacterium*, la transformación suele realizarse (pero no necesariamente) con un marcador seleccionable que puede ser una selección positiva (fosfomanosa isomerasa), brindar resistencia a un antibiótico (kanamicina, higromicina o metotrexato) o un herbicida (glifosato o glufosinato). Sin embargo, la elección de un marcador seleccionable no es fundamental para la invención.

La transformación mediada por *Agrobacterium* es un método utilizado comúnmente para transformar plantas, en particular, plantas dicotiledóneas, dada su alta eficacia en la transformación y por su amplia utilización con muchas especies diferentes. La transformación mediada por *Agrobacterium* incluye normalmente la transferencia del vector binario que transporta el ADN exógeno de interés a una cepa de *Agrobacterium* adecuada que puede depender del complemento de genes *vir* transportado por la cepa de *Agrobacterium* huésped en un plásmido Ti corresponsante o cromosómicamente (Uknes et al. (1993) *Plant Cell* 5:159-169). La transferencia del vector binario recombinante a *Agrobacterium* puede lograrse mediante un procedimiento de acoplamiento triparental utilizando *Escherichia coli* que transporta el vector binario recombinante, una cepa auxiliar de *E.coli* que transporta un plásmido que puede movilizar el vector binario recombinante a la cepa *Agrobacterium* diana. Como alternativa, el vector binario recombinante puede ser transferido a *Agrobacterium* mediante transformación con el ácido nucleico (Höfgen y Willmitzer (1988) *Nucleic Acids Res.* 16:9877).

La transformación de una planta mediante *Agrobacterium* recombinante implica generalmente el cocultivo de *Agrobacterium* con explantes de la planta y sigue métodos muy conocidos en la técnica. El tejido transformado se regenera en el medio de selección que tiene un marcador con resistencia a antibiótico o herbicida entre los límites del ADN-T plasmídico binario.

Como se indicó anteriormente, otro método para transformar plantas, partes de plantas y células vegetales incluye impulsar partículas inertes o con actividad biológica en tejidos vegetales y células. Véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos n.º 4 945 050; 5 036 006 y 5 100 792. En general este método incluye propulsar partículas inertes o con actividad biológica en las células vegetales en condiciones eficaces para penetrar la superficie exterior de la célula y lograr la incorporación en su interior. Cuando se utilizan partículas inertes, se puede introducir el vector en la célula mediante el revestimiento de las partículas con el vector que contiene el ácido nucleico de interés. Como alternativa una o más células pueden ser rodeadas por el vector de forma tal que el vector sea transportado por la célula a través de la partícula. Las partículas con actividad biológica (p. ej., una célula de levadura seca, una bacteria seca o un bacteriófago, donde cada uno contiene uno o más ácidos nucleicos que se pretenden insertar) también pueden ser impulsadas al interior del tejido vegetal.

En otro aspecto, un polinucleótido de la invención puede transformarse directamente en el genoma del plástido. Una ventaja importante de la transformación del plástido es que los plástidos son capaces de expresar los genes bacterianos sin una modificación sustancial y son capaces de expresar múltiples marcos de lectura abierta controlados por un único promotor. La tecnología de transformación de plástidos se describe con mayor detalle en las patentes de Estados Unidos n.º 5 451 513, 5 545 817, y 5 545 818, en la solicitud PCT no. WO 95/16783, y en McBride et al. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 7301-7305. La técnica básica para la transformación de cloroplastos conlleva introducir regiones del ADN del plástido clonado que flanquea un marcador seleccionable junto con el gen de interés en un tejido diana adecuado, p. ej., utilizando biolística o transformación de protoplastos (p. ej., cloruro de calcio o transformación mediada por PEG). Las regiones adyacentes de 1 a 1,5 kb y las secuencias de direccionamiento denominadas facilitan la recombinación homóloga con el genoma del plástido y permiten el reemplazo o la modificación de regiones específicas del plastoma. Inicialmente, las mutaciones puntuales en el ARNr del cloroplasto 16S y los genes *rps12* que confieren resistencia a la espectinomicina y/o estreptomomicina pueden utilizarse como marcadores seleccionables para la transformación (Svab, Z., Hajdukiewicz, P., y Maliga, P. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 8526-8530; Staub, J. M., y Maliga, P. (1992) *Plant Cell* 4, 39-45). La presencia de los sitios de clonación entre estos marcadores permite la creación de un vector de direccionamiento plástido para la introducción de genes extraños (Staub, J.M., y Maliga, P. (1993) *EMBO J.* 12, 601-606). Se pueden lograr aumentos sustanciales en la frecuencia de transformación mediante el reemplazo del ARNr recesivo o genes de la proteína-r de resistencia a antibiótico por un marcador seleccionable dominante, el gen bacteriano *aadA* que codifica la enzima de destoxicación de espectinomicina aminoglicosidasa-3'-adeniltransferasa (Svab, Z., and Maliga, P. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 913-917). Este marcador ha sido utilizado previamente con éxito en la transformación a alta frecuencia del genoma del plástido de la alga verde *Chlamydomonas reinhardtii* (Goldschmidt-Clermont, M. (1991) *Nucl. Acids Res.* 19:4083-4089). En la técnica se conocen otros marcadores seleccionables útiles para la transformación de plástido y que se engloban en el alcance de la invención. Generalmente, se requieren aproximadamente de 15 a 20 ciclos de división celular después de la transformación para alcanzar un estado homoplástico. La expresión de los plástidos, en los que los genes se insertan por recombinación homóloga en las miles de copias del genoma circular del plástido presentes en cada célula de la planta, aprovecha la ventaja del enorme número de copias sobre los genes expresados en el núcleo para permitir niveles de expresión que pueden superar fácilmente el 10 % de la proteína soluble total de la planta. En un aspecto, se puede insertar un polinucleótido de la invención en un vector de direccionamiento plástido y transformar el genoma del plástido de una planta huésped deseada. Por lo tanto, se pueden obtener las plantas homoplásticas para los genomas de plástido que contienen una secuencia nucleotídica de la invención, las cuales son capaces de lograr una expresión alta del polinucleótido.

Los métodos de selección de plantas transgénicas, transformadas, células vegetales y/o cultivo de tejido vegetal son de uso común en la técnica y pueden emplearse en los métodos de la invención proporcionados en la presente. Por ejemplo, un vector recombinante de la invención también puede incluir un casete de expresión que comprende una secuencia nucleotídica para un marcador seleccionable que puede utilizarse para seleccionar una planta transformada, parte de una planta y/o una célula vegetal. Como se utiliza en la presente, "marcador seleccionable" significa una secuencia nucleotídica que cuando se expresa transmite un fenotipo distinto a la planta, parte de la planta y/o célula vegetal que expresa el marcador y por ende, permite que dichas plantas transformadas, partes de planta y/o células vegetales se distingan de aquellas que no cuentan con el marcador. Dicha secuencia nucleotídica puede codificar un marcador seleccionable o cribable dependiendo de si el marcador transmite una característica que puede ser seleccionada a través de un medio químico, como, por ejemplo, utilizando un agente selectivo (p. ej., un antibiótico, herbicida o similar) o dependiendo de si el marcador es simplemente una característica que se puede identificar a través de la observación o prueba como mediante cribado (p.e.j., la característica de lugar R). En la técnica se conocen muchos ejemplos de marcadores seleccionables adecuados y pueden utilizarse en los casetes de expresión descritos en la presente.

Los ejemplos de marcadores seleccionables incluyen, a modo no limitante, una secuencia nucleotídica que codifica *neo* o *nptII*, que confiere resistencia a la kanamicina, G418, y similares (Potrykus et al. (1985) *Mol. Gen. Genet.* 199:183-188); una secuencia nucleotídica que codifica *bar*, el cual confiere resistencia a la fosfinotricina; una secuencia nucleotídica que codifica una 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato (EPSP) sintasa, la cual confiere resistencia al glifosato (Hinchee et al. (1988) *Biotech.* 6:915-922); una secuencia nucleotídica que codifica una nitrilasa como *bxn* de *Klebsiella ozaenae* que confiere resistencia a bromoxinilo (Stalker et al. (1988) *Science* 242:419-423); una secuencia nucleotídica que codifica una acetolactato sintasa (ALS) alterada que confiere resistencia a imidazolinona, sulfonilurea u otros agentes químicos inhibidores de ALS (solicitud de patente EP n.º 154204); una secuencia nucleotídica que codifica una dihidrofolato reductasa (DHFR) resistente a metotrexato (Thillet et al. (1988) *J. Biol. Chem.* 263:12500-12508); una secuencia nucleotídica que codifica una dalapón deshalogenasa que confiere resistencia a dalapon; una secuencia nucleotídica que codifica una manosa-6-fosfato isomerasa (también denominada fosofmanosa isomerasa (PMI)) que confiere la capacidad de metabolizar manosa (patentes de Estados Unidos n.º 5 767 378 y 5 994 629); una secuencia nucleotídica que codifica una antranilato sintasa alterada que confiere resistencia a 5-metilriptófano; y/o una secuencia nucleotídica que codifica *hph* que confiere resistencia a higromicina. Un experto en la técnica es capaz de elegir un marcador seleccionable adecuado para uso en un casete de expresión de la invención.

Los marcadores seleccionables adicionales incluyen, a modo no taxativo, una secuencia nucleotídica que codifica β -glucuronidasa o *uidA* (GUS) que codifica una enzima para la cual se conocen varios sustratos cromogénicos; una secuencia nucleotídica R-lugar que codifica un producto que regula la producción de pigmentos de antoxianina (color rojo) en tejidos vegetales (Dellaporta *et al.*, "Molecular cloning of the maize R-nj allele by transposon-tagging with Ac" 263-282 In: *Chromosome Structure and Function: Impact of New Concepts*, 18th Stadler Genetics Symposium (Gustafson y Appels eds., Plenum Press 1988)); una secuencia nucleotídica que codifica β -lactamasa, una enzima para la que se conocen varios sustratos cromogénicos (p. ej., PADAC, una cefalosporina cromogénica) (Sutcliffe (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:3737-3741); una secuencia nucleotídica que codifica *xylE* que codifica una catecol dioxigenasa (Zukowsky *et al.* (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:1101-1105); una secuencia nucleotídica que codifica tirosinasa, una enzima capaz de oxidar la tirosina en DOPA y dopaquinona, la cual a su vez se condensa para formar melanina (Katz *et al.* (1983) *J. Gen. Microbiol.* 129:2703-2714); una secuencia nucleotídica que codifica β -galactosidasa, una enzima para la cual existen sustratos cromogénicos; una secuencia nucleotídica que codifica luciferasa (*lux*) la cual permite la detección de bioluminiscencia (Ow *et al.* (1986) *Science* 234:856-859); una secuencia nucleotídica que codifica aequorina, la cual puede emplearse en la detección de bioluminiscencia sensible al calcio (Prasher *et al.* (1985) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 126:1259-1268); o una secuencia nucleotídica que codifica una proteína fluorescente verde (Niedz *et al.* (1995) *Plant Cell Reports* 14:403-406). Un experto en la técnica es capaz de elegir un marcador seleccionable adecuado para uso en un casete de expresión de la invención.

Además como se conoce en la técnica, las plantas transgénicas intactas pueden regenerarse a partir de células vegetales transformadas, cultivo de tejido vegetal y/o protoplastos cultivados utilizando cualquier variedad de técnicas conocidas. La regeneración vegetal a partir de células vegetales, cultivo de tejido vegetal y/o protoplastos cultivados se describe, por ejemplo, en Evans *et al.* (*Handbook of Plant Cell Cultures*, Vol. 1, MacMilan Publishing Co. New York (1983)); y Vasil I. R. (ed.) (*Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*, Acad. Press, Orlando, Vol. I (1984), y Vol. II (1986)).

Asimismo, las propiedades genéticas logradas en las semillas transgénicas y plantas, partes de plantas y/o células vegetales de la invención descritas anteriormente pueden transmitirse mediante reproducción sexual o crecimiento vegetativo y por ende mantenerse y propagarse en plantas de la progenie. En general, el mantenimiento y la propagación utilizan métodos agrícolas conocidos desarrollados para cumplir con los objetivos específicos como la cosecha, la siembra o el cultivo.

Por lo tanto, se puede introducir un polipéptido en la planta, parte de una planta y/o célula vegetal de distintas maneras conocidas en la técnica, como se describió anteriormente. Por lo tanto, no existe dependencia en un método particular para introducir uno o más polinucleótidos en una planta, sino que se puede utilizar cualquier método que permite la integración estable de uno o más polinucleótidos en el genoma de la planta. En los casos en que se deben introducir más de un polinucleótido, los polinucleótidos respectivos pueden unirse como parte de una molécula de ácido nucleico única, o como moléculas de ácido nucleico independientes, y pueden ubicarse en las mismas moléculas de ácido nucleico o en moléculas diferentes. Por lo tanto, se pueden introducir polinucleótidos en la célula de interés en una única transformación, en procesos de transformación diferentes, o, por ejemplo, en plantas, como parte de un protocolo de cultivo.

Las realizaciones adicionales de la invención incluyen productos cosechados producidos a partir de plantas transgénicas y/o partes de estas de la invención, así como un producto procesado fabricado a partir de los productos cosechados. Un producto cosechado puede ser una planta completa o parte de una planta, como se describe en la presente. Por lo tanto, en algunas realizaciones, los ejemplos no limitantes de un producto cosechado incluyen una semilla, una fruta, una flor o una parte de estos (p. ej. una antera, estigma y similares), una hoja, un tallo y similares. En otros aspectos, un producto procesado incluye, a modo no limitante, harina, sémola, aceite, almidón, cereal y producto similar producido a partir de una semilla cosechada u otra parte de la planta de la invención, donde dicha semilla u otra parte de la planta comprende una secuencia de molécula de ácido nucleico/polinucleotídica/nucleotídica de esta invención.

En otros aspectos, la invención se refiere a un extracto de una semilla transgénica y/o planta transgénica de la invención, donde el extracto comprende una molécula de ácido nucleico, un polinucleótido, una secuencia nucleotídica o una proteína tóxica de la invención. Los extractos de plantas o partes de plantas pueden producirse de conformidad con los procedimientos conocidos en la técnica (Véase, de la Torre *et al.*, *Food, Agric. Environ.* 2(1):84-89 (2004); Guidet, *Nucleic Acids Res.* 22(9): 1772-1773 (1994); Lipton *et al.*, *Food Agric. Immun.* 12:153-164 (2000)).

Composiciones insecticidas

En algunas realizaciones, la invención se refiere a una composición insecticida que comprende una proteína Cry de la invención en un portador aceptable en agricultura. Como se utiliza en la presente "un portador aceptable en agricultura" puede incluir material natural o sintético, orgánico o inorgánico, que se combina con el componente activo para facilitar su aplicación en la planta, o parte de esta. Los ejemplos de portadores aceptables en agricultura incluyen, sin limitación, polvos, polvos finos, pellets, gránulos, pulverizaciones, emulsiones, coloides, y soluciones.

Los portadores aceptables en agricultura incluyen de modo no limitante componentes inertes, dispersantes, tensioactivos, adyuvantes, taquificantes, adhesivos, aglutinantes o combinaciones de estos, que pueden utilizarse en formulaciones agrícolas. Dichas composiciones pueden aplicarse de cualquier manera que haga que los agentes de control de las proteínas plaguicidas o de otras plagas entren en contacto con las plagas. Por lo tanto, se pueden aplicar las composiciones en las superficies de las plantas o partes de la planta que incluyen semillas, hojas, flores, tallos, tubérculos, raíces y similares. Otro portador aceptable en agricultura puede ser una planta transgénica o parte de la planta.

En otras realizaciones, la composición insecticida comprende una célula bacteriana transgénica de la invención, donde la célula bacteriana comprende un gen quimérico de la invención. Por ejemplo, dicha composición insecticida puede prepararse mediante desecación, liofilización, homogeneización, extracción, filtración, centrifugación, sedimentación o concentración de un cultivo de células de *Bacillus thuringiensis* que comprenden un polinucleótido de la invención. En realizaciones adicionales, la composición comprende entre aproximadamente un 1 % y un 99 % en peso de la proteína Cry de la invención.

Las proteínas Cry de la invención pueden utilizarse en combinación con otros agentes de control de plagas para aumentar el rango objetivo de plagas o para prevenir y/o manejar la resistencia a insectos. Por lo tanto, en algunas realizaciones, la invención proporciona una composición que controla una o más plagas en plantas, donde la composición comprende una primera proteína Cry de la invención y un segundo agente de control de plagas diferente de la primera proteína Cry. En otras realizaciones, la composición es una formulación para la aplicación tópica a una planta. En otras realizaciones, la composición es una planta transgénica. En otras realizaciones, la composición es una combinación de una formulación que se aplica por vía tópica a una planta transgénica. En una realización, la formulación comprende la primera proteína Cry de la invención cuando la planta transgénica comprende el segundo agente de control de plagas. En otra realización, la formulación comprende el segundo agente de control de plagas cuando la planta transgénica comprende la primera proteína Cry de la invención.

En algunas realizaciones, el segundo agente de control de plagas puede ser un agente seleccionado del grupo que consiste en un plaguicida químico, una proteína insecticida de *Bacillus thuringiensis* (Bt), una proteína insecticida de *Xenorhabdus*, una proteína insecticida de *Photorhabdus*, una proteína insecticida de *Brevibacillus laterosporus*, una proteína insecticida de *Bacillus sphaericus*, inhibidores de la proteasa (tipo serina y cisteína), lectinas, alfa-amilasas, peroxidasa y colesterol oxidasa.

En otras realizaciones, el segundo agente de control de plagas es un plaguicida químico seleccionado del grupo que consiste en piretroides, carbamatos, neonicotinoides, bloqueadores del canal de sodio neuronal, lactonas macrocíclicas insecticidas, antagonistas del ácido gama-aminobutírico (GABA), ureas insecticidas y miméticos de la hormona juvenil. En otra realización, el plaguicida químico se selecciona del grupo que consiste en abamectina, acefato, acetamiprida, amidoflumet (S-1995), avermectina, azadiractina, azinfos-metilo, bifentrina, bifenazato, buprofezina, carbofurano, clorfenapiro, clorfluazurón, clorpirifos, clorpirifos-metilo, cromafenozida, clotianidina, ciflutrina, beta-ciflutrina, cihalotrina, lambda-cihalotrina, cipermetrina, ciromazina, deltametrina, diafenthiurón, diazinona, diflubenzurona, dimetoato, diofenolano, emamectina, endosulfano, esfenvalerato, etiprol, fenotiocarb, fenoxicarb, fenpropatrina, fenproximato, fenvalerato, fipronil, flonicamida, flucitrinato, tau-fluvalinato, flufenexurón, fonofos, halofenozida, hexaflumurón, imidacloprida, indoxacarb, isofenfos, lufenurón, malatión, metaldehído, metamidofos, metidatión, metomilo, metopreno, metoxicloro, monocrotofos, metoxifenoazida, nitiazina, novalurón, noviflumurón (XDE-007), oxamilo, paratión, paratión-metilo, permetrina, forate, fosadona, fosmet, fosfamidona, pirimicarb, profenofos, pometozina, piridatión, piriproxifeno, rotenona, espinosad, espiromesifina (BSN 2060), sulprofos, tebufenozida, teflubenzurón, teflutrina, terbufos, tetracloprifos, tiacloprida, tiametoxam, tiodicarb, tiosultap-sodio, tralometrina, triclorfón y triflumurón, aldicarb, oxamilo, fenamifos, amitraz, quinometionato, clorobenzilato, cihexatina, dicofol, dienocloro, etoxazol, fenazaquina, óxido de fenbutatina, fenpropatrina, fenproximato, hexitiazox, propargita, piridabeno y tebufenpirad. En otra realización, el plaguicida químico se selecciona del grupo que consiste en cipermetrina, cihalotrina, ciflutrina y beta-ciflutrina, esfenvalerato, fenvalerato, tralometrina, fenotiocarb, metomilo, oxamilo, tiodicarb, clotianidina, imidacloprid, tiacloprid, indoxacarb, espinosad, abamectina, avermectina, emamectina, endosulfano, etiprol, fipronil, flufenexurón, triflumurón, diofenolano, piriproxifeno, pimetozina y amitraz.

En realizaciones adicionales, el segundo agente de control de plagas puede ser uno o más de cualquier número de proteínas insecticidas de *Bacillus thuringiensis* que incluyen de modo no limitante, una proteína Cry, una proteína insecticida vegetativa (VIP) y quimeras insecticidas de cualquiera de las proteínas insecticidas anteriores. En otras realizaciones, el segundo agente de control de plagas es una proteína Cry seleccionada del grupo que consiste en Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ad, Cry1Ae, Cry1Af, Cry1Ag, Cry1Ah, Cry1Ai, Cry1Aj, Cry1Ba, Cry1Bb, Cry1Bc, Cry1Bd, Cry1Be, Cry1Bf, Cry1Bg, Cry1Bh, Cry1Bi, Cry1Ca, Cry1Cb, Cry1Da, Cry1Db, Cry1Dc, Cry1Dd, Cry1Ea, Cry1Eb, Cry1Fa, Cry1Fb, Cry1Ga, Cry1Gb, Cry1Gc, Cry1Ha, Cry1Hb, Cry1Hc, Cry1Ia, Cry1Ib, Cry1Ic, Cry1Id, Cry1Ie, Cry1If, Cry1Ig, Cry1Ja, Cry1Jb, Cry1Jc, Cry1Jd, Cry1Ka, Cry1La, Cry1Ma, Cry1Na, Cry1Nb, Cry2Aa, Cry2Ab, Cry2Ac, Cry2Ad, Cry2Ae, Cry2Af, Cry2Ag, Cry2Ah, Cry2Ai, Cry2Aj, Cry2Ak, Cry2Al, Cry2Ba, Cry3Aa, Cry3Ab, Cry3Bb, Cry3Ca, Cry4Aa, Cry4Ba, Cry4Ca, Cry4Cb, Cry4Cc, Cry5Aa, Cry5Ab, Cry5Ac, Cry5Ad, Cry5Ba, Cry5Ca, Cry5Da, Cry5Ea, Cry6Aa, Cry6Ba, Cry7Aa, Cry7Ab, Cry7Ac, Cry7Ba, Cry7Bb, Cry7Ca, Cry7Cb, Cry7Da, Cry7Ea, Cry7Fa, Cry7Fb, Cry7Ga, Cry7Gb, Cry7Gc, Cry7Gd, Cry7Ha, Cry7Ia, Cry7Ja, Cry7Ka, Cry7Kb, Cry7La,

Cry8Aa, Cry8Ab, Cry8Ac, Cry8Ad, Cry8Ba, Cry8Bb, Cry8Bc, Cry8Ca, Cry8Da, Cry8Db, Cry8Ea, Cry8Fa, Cry8Ga, Cry8Ha, Cry8Ia, Cry8Ib, Cry8Ja, Cry8Ka, Cry8Kb, Cry8La, Cry8Ma, Cry8Na, Cry8Pa, Cry8Qa, Cry8Ra, Cry8Sa, Cry8Ta, Cry9Aa, Cry9Ba, Cry9Bb, Cry9Ca, Cry9Da, Cry9Db, Cry9Dc, Cry9Ea, Cry9Eb, Cry9Ec, Cry9Ed, Cry9Ee, Cry9Fa, Cry9Ga, Cry10Aa, Cry11Aa, Cry11Ba, Cry11Bb, Cry12Aa, Cry13Aa, Cry14Aa, Cry14Ab, Cry15Aa, Cry16Aa, Cry17Aa, Cry18Aa, Cry18Ba, Cry18Ca, Cry19Aa, Cry19Ba, Cry19Ca, Cry20Aa, Cry20Ba, Cry21Aa, Cry21Ba, Cry21Ca, Cry21Da, Cry21Ea, Cry21Fa, Cry21Ga, Cry21Ha, Cry22Aa, Cry22Ab, Cry22Ba, Cry22Bb, Cry23Aa, Cry24Aa, Cry24Ba, Cry24Ca, Cry25Aa, Cry26Aa, Cry27Aa, Cry28Aa, Cry29Aa, Cry29Ba, Cry30Aa, Cry30Ba, Cry30Ca, Cry30Da, Cry30Db, Cry30Ea, Cry30Fa, Cry30Ga, Cry31Aa, Cry31Ab, Cry31Ac, Cry31Ad, Cry32Aa, Cry32Ab, Cry32Ba, Cry32Ca, Cry32Cb, Cry32Da, Cry32Ea, Cry32Eb, Cry32Fa, Cry32Ga, Cry32Ha, Cry32Hb, Cry32Ia, Cry32Ja, Cry32Ka, Cry32La, Cry32Ma, Cry32Mb, Cry32Na, Cry32Oa, Cry32Pa, Cry32Qa, Cry32Ra, Cry32Sa, Cry32Ta, Cry32Ua, Cry33Aa, Cry34Aa, Cry34Ab, Cry34Ac, Cry34Ba, Cry35Aa, Cry35Ab, Cry35Ac, Cry35Ba, Cry36Aa, Cry37Aa, Cry38Aa, Cry39Aa, Cry40Aa, Cry40Ba, Cry40Ca, Cry40Da, Cry41Aa, Cry41Ab, Cry41Ba, Cry42Aa, Cry43Aa, Cry43Ba, Cry43Ca, Cry43Cb, Cry43Cc, Cry44Aa, Cry45Aa, Cry46Aa, Cry46Ab, Cry47Aa, Cry48Aa, Cry48Ab, Cry49Aa, Cry49Ab, Cry50Aa, Cry50Ba, Cry51Aa, Cry52Aa, Cry52Ba, Cry53Aa, Cry53Ab, Cry54Aa, Cry54Ab, Cry54Ba, Cry55Aa, Cry56Aa, Cry57Aa, Cry57Ab, Cry58Aa, Cry59Aa, Cry59Ba, Cry60Aa, Cry60Ba, Cry61Aa, Cry62Aa, Cry63Aa, Cry64Aa, Cry65Aa, Cry66Aa, Cry67Aa, Cry68Aa, Cry69Aa, Cry69Ab, Cry70Aa, Cry70Ba, Cry70Bb, Cry71Aa, Cry72Aa y Cry73Aa.

En otras realizaciones, el segundo agente de control de plagas es una proteína insecticida vegetativa Vip3 seleccionada del grupo que consiste en Vip3Aa1, Vip3Aa2, Vip3Aa3, Vip3Aa4, Vip3Aa5, Vip3Aa6, Vip3Aa7, Vip3Aa8, Vip3Aa9, Vip3Aa10, Vip3Aa11, Vip3Aa12, Vip3Aa13, Vip3Aa14, Vip3Aa15, Vip3Aa16, Vip3Aa17, Vip3Aa18, Vip3Aa19, Vip3Aa20, Vip3Aa21, Vip3Aa22, Vip3Aa23, Vip3Aa24, Vip3Aa25, Vip3Aa26, Vip3Aa27, Vip3Aa28, Vip3Aa29, Vip3Aa30, Vip3Aa31, Vip3Aa32, Vip3Aa33, Vip3Aa34, Vip3Aa35, Vip3Aa36, Vip3Aa37, Vip3Aa38, Vip3Aa39, Vip3Aa40, Vip3Aa41, Vip3Aa42, Vip3Aa43, Vip3Aa44, Vip3Ab1, Vip3Ab2, Vip3Ac1, Vip3Ad1, Vip3Ad2, Vip3Ae1, Vip3Af1, Vip3Af2, Vip3Af3, Vip3Ag1, Vip3Ag2, Vip3Ag3 HM117633, Vip3Ag4, Vip3Ag5, Vip3Ah1, Vip3Ba1, Vip3Ba2, Vip3Bb1, Vip3Bb2 y Vip3Bb3.

En otras realizaciones, la primera proteína Cry de la invención y el segundo agente de control de plagas se coexpresan en una planta transgénica. Esta coexpresión de más de un principio plaguicida en la misma planta transgénica puede lograrse mediante manipulación genética de una planta para contener y expresar todos los genes necesarios. Como alternativa, una planta, Progenitor 1, puede modificarse genéticamente para la expresión de la proteína Cry de la invención. Una segunda planta, Progenitor 2, puede modificarse genéticamente para la expresión del segundo agente de control de plagas. Al cruzar el Progenitor 1 con el Progenitor 2, se obtienen las plantas de la progenie que expresan todos los genes introducidos en los Progenitores 1 y 2.

En realizaciones adicionales, se proporciona un método para producir una proteína tóxica para al menos un gusano cortador grasiento (*Agrotis ipsilon*), donde el método comprende: cultivar una célula huésped no humana transgénica que comprende un polinucleótido o un gen quimérico o una molécula de ácido nucleico o un vector recombinante de la invención en condiciones en las cuales el huésped produce una proteína tóxica para al menos un gusano cortador grasiento (*Agrotis ipsilon*). En algunas realizaciones, la célula huésped no humana transgénica es una célula vegetal. En una realización, la célula vegetal es una célula de maíz. En otras realizaciones, las condiciones en las que la célula vegetal o la célula de maíz crecen incluyen luz solar natural. En algunas realizaciones, la célula huésped no humana transgénica es una célula bacteriana. En algunas realizaciones, la célula huésped no humana transgénica es una célula de levadura.

En otras realizaciones, la proteína producida tiene actividad insecticida contra al menos un insecto adicional, donde el insecto adicional se selecciona del grupo que consiste en barrenador de maíz europeo (*Ostrinia nubilalis*), el cogollero del maíz (*Spodoptera frugiperda*), gusano elotero (*Helicoverpa zea*), barrenador de la caña de azúcar (*Diatraea saccharalis*), oruga de la leguminosa (*Anticarsia gemmatilis*), falso medidor de la soja (*Chrysodeixis includens*), barrenador del maíz del sudoeste (*Diatraea grandiosella*), gusano cortador de frijoles (*Richia albicosta*), cogollero del tabaco (*Heliothis virescens*), barrenador de maíz asiático (*Ostrinia furnacalis*), gusano bellotero del algodón (*Helicoverpa armigera*), perforador rallado del tallo (*Chilo suppressalis*), perforador del tallo rosa (*Sesamia calamistis*), enrollador de las hojas de arroz (*Cnaphalocrocis medinalis*) y cualquier combinación de estos.

En otros aspectos, el gen quimérico comprende cualquiera de las SEQ ID NO. 1-4. En otras realizaciones, la proteína producida comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO.: 10.

En algunas realizaciones, el gen quimérico comprende una secuencia nucleotídica con codones optimizados para la expresión en una planta. En otras realizaciones, el gen quimérico comprende la SEQ ID NO.: 10. En otras realizaciones, la proteína producida comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO.: 18.

En otras realizaciones, la invención se refiere a un método para producir una planta transgénica resistente a las plagas (p. ej., resistente a insectos), que comprende: introducir, en una planta, un polinucleótido, un gen quimérico, un vector recombinante, un casete de expresión o una molécula de ácido nucleico de la invención que comprende una secuencia nucleotídica que codifica una proteína Cry de la invención donde la secuencia nucleotídica se expresa en la planta, confiriendo a la planta resistencia a al menos un barrenador de maíz europeo, y produciendo

una planta transgénica resistente a las plagas (p. ej., resistente a insectos). En algunas realizaciones, una planta transgénica resistente a las plagas es resistente a al menos un gusano cortador grasiento (*Agrotis ipsilon*) en comparación con una planta de control que carece del polinucleótido, del gen quimérico, del vector recombinante, del casete de expresión o de la molécula de ácido nucleico de la invención. En algunas realizaciones, la introducción se logra mediante la transformación de la planta. En otras realizaciones, la introducción se logra cruzando una primera planta que comprende el gen quimérico, el vector recombinante, el casete de expresión o la molécula de ácido nucleico de la invención con una segunda planta diferente.

En algunas realizaciones, la planta transgénica de la invención que es resistente a al menos el gusano cortador grasiento (*Agrotis ipsilon*) es resistente también a un insecto adicional, donde el insecto adicional incluye, a modo no taxativo, barrenador de maíz europeo (*Ostrinia nubilalis*) el cogollero del maíz (*Spodoptera frugiperda*), gusano elotero (*Helicoverpa zea*), barrenador de la caña de azúcar (*Diatraea saccharalis*), oruga de la leguminosa (*Anticarsia gemmatilis*), falso medidor de la soja (*Chrysodeixis includens*), barrenador del maíz del sudoeste (*Diatraea grandiosella*), gusano cortador de frijoles (*Richia albicosta*), cogollero del tabaco (*Heliothis virescens*), barrenador de maíz asiático (*Ostrinia furnacalis*), gusano bellotero del algodón (*Helicoverpa armigera*), perforador rallado del tallo (*Chilo suppressalis*), perforador del tallo rosa (*Sesamia calamistis*), enrollador de las hojas de arroz (*Cnaphalocrocis medinalis*) y cualquier combinación de estos.

En otras realizaciones, se proporciona un método para controlar al menos insectos del gusano cortador grasiento (*Agrotis ipsilon*), donde el método comprende administrar a los insectos una cantidad eficaz de una proteína Cry de la invención. Para ser eficaz, el insecto ingiere la proteína Cry en primer lugar por vía oral. Sin embargo, se puede administrar la proteína Cry al insecto de muchas maneras reconocidas. Las formas en que se administra una proteína por vía oral a un insecto incluyen, de modo no limitante, administrar la proteína (1) en una planta transgénica, donde el insecto come (ingiere) una o más partes de la planta transgénica, e ingiere así el polipéptido que se expresa en la planta transgénica; (2) en una composición o composiciones proteicas formuladas que pueden aplicarse en o incorporarse al, por ejemplo, el medio de crecimiento del insecto; (3) en una composición o composiciones proteicas que pueden aplicarse a la superficie, por ejemplo, pulverizarse sobre la superficie de una parte de la planta, que es ingerida posteriormente por el insecto a medida que el insecto come una o más de las partes de la planta que ha recibido el pulverizado; (4) una matriz del cepo; (5) mediante inyección al insecto; o (6) cualquier otro sistema de administración de proteínas reconocido en la técnica. Por lo tanto, se puede utilizar cualquier método de administración oral para administrar las proteínas Cry tóxicas de la invención. En algunas realizaciones particulares, la proteína Cry de la invención se administra por vía oral al insecto, donde el insecto ingiere una o más partes de una planta transgénica.

En otras realizaciones, la proteína Cry de la invención se administra por vía oral a un insecto, donde el insecto ingiere una o más partes de una planta sobre la que se ha pulverizado una composición que comprende las proteínas Cry de la invención. La administración de las composiciones de la invención a una superficie de la planta se puede lograr utilizando cualquier método conocido por los expertos en la técnica para aplicar compuestos, composiciones, formulaciones y similares a superficies de plantas. Algunos ejemplos no limitantes de administración a o contacto con una planta o parte de esta incluyen pulverización, espolvoreo, aspersión, dispersión, vaporización, atomización, difusión, remojo, inyección al suelo, incorporación al suelo, empapado (p. ej., raíz, tratamiento del suelo), inmersión, derramamiento, revestimiento, infiltración de la hoja o del tallo, abonado lateral o tratamiento de la semilla y similares, y combinaciones de estos. Estos y otros procedimientos para contactar una planta o parte de esta con compuestos, composiciones o formulaciones son bien conocidos para los entendidos en la técnica.

En algunas realizaciones, la invención abarca un método para proporcionar a un productor un medio para controlar una plaga de insectos lepidópteros, donde el método comprende suministrar o vender al productor un material vegetal como una semilla, el cual comprende un polinucleótido, un gen quimérico, un casete de expresión, o un vector recombinante capaz de expresar una proteína Cry de la invención, como se describió anteriormente.

Las realizaciones de esta invención pueden entenderse mejor mediante referencia a los siguientes ejemplos. La siguiente descripción de las realizaciones de la invención y otras realizaciones no pretenden limitar las reivindicaciones y son meramente ilustrativas. Por lo tanto, se entenderá que las reivindicaciones no se limitan a detalles específicos de estos ejemplos.

Ejemplos

Ejemplo 1. Identificación de cepas activas de Bt

Se cultivaron cepas aisladas de *Bacillus thuringiensis* de las esporas presentes en las colecciones actuales y se mantuvieron en placas de agar de penicilina y T3. Cada cepa se cultivó aeróbicamente en bloques de 24 pocillos profundos durante aproximadamente 10 días a 28°C hasta su esporulación, la cual se verificó mediante la tinción con un ácido acético/ azul de Coomassie y se visualizó con un microscopio. Después de la esporulación, tanto las fracciones solubles como insolubles se sometieron a ensayo para verificar la actividad frente a las especies lepidópteras de interés. Las fracciones se probaron en un bioensayo de contaminación de la superficie, donde se superpusieron en una dieta artificial multiespecífica. Cada cepa se cribó contra al menos cuatro especies

lepidópteras, que incluyen *Helicoverpa zea* (cogollero de maíz), *Agrotis ipsilon* (gusano cortador grasiento), *Ostrinia nubilalis* (barrenador de maíz europeo), y *Spodoptera frugiperda* (cogollero del maíz) con un tamaño de muestra de 12 larvas neonatas. La duración de cada ensayo fue de aproximadamente 7 días a temperatura ambiente; se puntuó la mortalidad y la inhibición del crecimiento de larvas de las placas. La mortalidad observada a un aumento del 30% sobre el control negativo se consideró activa. En base a la prueba inicial de insectos, se seleccionaron las cepas C0633, C2080, M0262 y M1455 para mayor análisis.

Ejemplo 2: Aislamiento y secuenciación de los genes Bt

Construcción de la colección genómica del fásmid: Para algunas cepas de Bt que se identificaron en el Ejemplo 1, se aislaron los genes que codifican las proteínas putativamente activas utilizando un método de colección del fásmid descrito en Park et al. (FEMS Microbiol. Lett. 284:28-34 (2008)). La colección del fásmid se construyó utilizando un Kit de producción de colección del fásmid de CopyControl™ (Epicentre, Madison, WI) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Resumiendo, el ADN purificado de cada cepa de Bt (aproximadamente 0,5 µg) se trató enzimáticamente para realizar la reparación terminal de los extremos romos, y posteriormente se ligó al vector del fásmid pCC1FOS (Epicentre). Después del envasado *in vitro* en los fagos lambda y la infección de *Escherichia coli* (*E. coli*) EPI1300-T1®, las células bacterianas se colocaron en placas en caldo de Luria-Bertani (LB) que contenía 12,5 µg/ml de cloramfenicol. Las placas se incubaron a aproximadamente 37 °C durante 24 horas antes de la selección de colonias. Las colonias de *E. coli* transfectadas se transfirieron a placas de 96 pocillos que contenían 150 µl de un medio de LB que contenía cloramfenicol y se incubaron a 37 °C durante 24 h.

Cribado de hibridación de colonias: Una colección de fásmidos se colocó en placas a una densidad de 300 cfu por 100x15 mm de L-agar más 15 µg/ml de placa de cloramfenicol. Se colocó un total de 3000 fásmidos en placa. Las hibridaciones en filtro se realizaron utilizando círculos de filtro Immobilon-Ny+ de 87 mm (EMD Millipore, Billerica, MA). Las recogidas de colonias se completaron de la siguiente manera: se colocaron filtros en placas durante aproximadamente 5 minutos, posteriormente, utilizando fórceps, se elevaron los filtros de la superficie de agar y la colonia se colocó hacia arriba en el papel de filtro Whatman con 0,5 M de NaOH durante 5 minutos. Los filtros de la colonia se colocaron posteriormente en papel de filtro Whatman remojado en 2X SSC durante 5 min. El ADN se inmovilizó en la membrana con un conjunto UV de Stratalinker® a 2000x100 µJ (Stratagene, Inc., La Jolla, CA). Los filtros se secaron al aire en un papel de filtro Whatman. Los filtros se prehibridaron e hibridaron en 250 mM de NaPO₄, pH 7,0, 7 % SDS, 1 % BSA a 65 °C como describió el proveedor. Los filtros de hibridación se lavaron en 2X SSC, 0,5% de SDS durante 30 minutos a 65 °C, seguido por 0,2X SSC, 0,2 % SDS durante 30 min. a 65 °C. Los filtros se expusieron a una película de rayos X (Kodak® BIOMAX® XAR, Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) durante la noche con una pantalla intensificadora a -80 °C. Las colonias positivas agruparon en L agar con más 15 µg/ml de cloramfenicol.

Sondas de hibridación: Se diseñaron los cebadores PCR para ampliar un fragmento de 720 bp de un gen tipo cry9B del ADN genómico de una cepa de Bt denominada C0633. El par de cebadores incluyó un cebador directo denominado OAR2613a que tiene una secuencia AAACATGAACCGAAATAATCAAAATG (SEQ ID NO:21) y un cebador indirecto denominado OAR2615a que tiene una secuencia ATCCGTCCCTTGTGCGTGTAAG (SEQ ID NO:22). La reacción por PCR se ejecutó en las siguientes condiciones cíclicas: [94 °C, 5 min], 12x [94 °C, 30 s., de 57 °C a 51 °C, con un descenso de 0,5 °C por ciclo, 30 s., 72 °C 2,5 min], y 35x [94 °C, 30 s., 52 °C, 30 s., 72 °C, 2,5 min]. La reacción contenía un tampón 1X One Taq® (New England Biolabs, Beverly, MA), 200 µM dNTP, 80 ng DNA, 2,5U de ADN polimerasa One Taq®, 50 ng de cada cebador y agua destilada estéril hasta 50 µl de la reacción total.

El amplicón resultante se separó en un 1 % de gel de agarosa y TAE que contenía bromuro de etidio. El amplicón se analizó con luz UV y se separó del gel. El ADN se aisló utilizando un kit de extracción de gel como describe el proveedor (Qiagen, Valencia, CA). Las sondas fueron etiquetadas con EasyTide (α-32P) dCTP 3000 Ci/mmol (Perkin Elmer, Waltham, MA) utilizando un sistema de etiquetado de cebadores aleatorio Rediprime II (GE Healthcare, Pittsburgh, PA). Los nucleótidos no incorporados fueron eliminados utilizando columnas de Cromatografía Micro Bio-Spin 30 (Biorad, Hercules, CA). Las sondas se calentaron a 95 °C durante 5 minutos antes de la incorporación a la solución de hibridación.

Secuenciación del gen Bt: Las preparaciones de ADN para 2 a 4 clones independientes se preparan siguiendo las instrucciones del fabricante (Qiagen). Las reacciones de secuenciación con los cebadores diseñados para ambas hebras de la secuencia nucleotídica de interés se produjeron utilizando un kit terminador de BigDye™ (Applied Biosystems, Foster City, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los productos de reacción se sometieron a electroforesis en instrumentos de secuenciación ABI373 o ABI377. Todos los datos de secuenciación se analizaron utilizando un paquete de software Phred/Phrap/Consed (Universidad de Washington) a una relación de error igual o menor a 10⁻⁴ a nivel de la secuencia de consenso. La secuencia se ensambló con el programa Sequencher™ (Versión 4.7, Gene Codes Corp., Ann Arbor, MI). Cada gen se secuenció para una cobertura 4X.

Ejemplo 3. Síntesis y clonación del gen Bt:

Se diseñaron pares de cebadores específicos de Cry9 para facilitar la identificación y la clonación de genes del tipo cry9. Se diseñaron pares de cebadores para hibridarse con un extremo 5' de un gen del tipo cry9 con la adición del

sitio de restricción *PmeI* y con un extremo 3' con la adición del sitio de restricción *AscI*. El par de cebadores utilizado para ampliar el extremo 5' incluyó un cebador directo que tiene una secuencia GTTTAAACATGAATCGAAATAATCAAAATG (SEQ ID NO:23) y un cebador indirecto que tiene una secuencia GGCGCGCCCTACTCTTGTGTTTCAATAAA (SEQ ID NO:24). El par de cebadores utilizado para ampliar el extremo 3' incluyó un cebador directo que tiene una secuencia GTTTAAACATGAATCAAAATAAACACGGA (SEQ ID NO:25) y un cebador indirecto que tiene una secuencia GGCGCGCCCTACTGTTGGGTTTCCATGAACT (SEQ ID NO:26). Los sitios de restricción insertados se delinean en los cebadores respectivos. Las reacciones por PCR se ejecutaron en las siguientes condiciones cíclicas: [94 °C, 5 min] y 30x [94 °C, 30 s., 45 °C, 30 s., 72 °C, 3,5 min]. La reacción contenía un tampón 1X One Taq, 200 µM dNTP, 80 ng de ADN, 2,5U de ADN polimerasa One Taq (New England Biolabs), 50 ng de cada cebador y agua destilada estéril hasta 50 µl de la reacción total.

El amplicón resultante se clonó en el vector 4.0 pCR TOPO como describe el proveedor (Life Technologies). El ADN plásmido aislado se digirió con *PmeI* y *AscI* como describe el proveedor (New England Biolabs).

El fragmento *PmeI/AscI* se clonó en un vector transportador denominado pCIB5634' diseñado para la expresión en *E. coli* y *B. thuringiensis*. El vector pCIB5634' se digirió con *PmeI* y *AscI*. El vector digerido y el fragmento de gen se purificaron haciéndolos migrar en un gel de agarosa 1 % con tampón Tris Acetato EDTA. Los fragmentos se cortaron del gel y se lavaron utilizando el kit de extracción de gel QIAGEN como describe el proveedor. Los fragmentos se unieron utilizando un kit de unión de New England Biolabs como describe el proveedor. Con la reacción de unión se transformaron células TOP10 (Life Technologies) como describe el proveedor y estas se colocaron en placas de L-agar que contenían 100 mg/ml de ampicilina. El ADN plasmídico se aisló de una colonia única y el clon identificado se secuenció nuevamente para una cobertura de 2X para confirmar la secuencia correcta.

Algunos genes Bt que se seleccionaron para la producción recombinante pero no se clonaron directamente de ADN genómico se enviaron a proveedores terceros para la síntesis completa del gen. Estos genes Bt sintetizados se subclonaron en los vectores transportadores descritos anteriormente para la posterior expresión y prueba para verificar su actividad biológica.

Ejemplo 4. Ensamblaje y análisis genómico

Algunos genes Bt de la invención se identificaron utilizando un enfoque de secuenciación del genoma completo. Resumiendo, el ADN de *Bacillus* se cizalló utilizando un dispositivo ultrasónico Covaris S2 (Covaris, Inc., Woburn, MA) con el programa DNA_400bp configurado en ciclo de trabajo: 10 %; intensidad; 4; ciclos/arranque: 200. El ADN se trató con el módulo de reparación de extremos/prolongación dA Ultra™ de NEBNext® (New England Biolabs, Inc., Ipswich, MA). Los adaptadores 1-57 de los índices de Bioscience (1-27 Brasil, 28-57 EE. UU, Reino Unido y Suiza) se ligaron utilizando NEB Quick Ligation™ como describe el proveedor (New England Biolabs, Inc. Ipswich, MA). Las uniones se lavaron utilizando microesferas Agencourt AMPure XP como describe el proveedor (Beckman Coulter, Inc., Indianápolis, IN).

La colección se fraccionó por tamaño de la siguiente manera: Se mezcló una muestra de 50 µL con 45 µL de una mezcla de microesferas al 75 % (25 % de microesferas AMPure más un 75 % de solución de NaCl/PEG TekNova n.º cat P4136). La mezcla se agitó y colocó en un rack magnético. El sobrenadante resultante se transfirió a un nuevo pocillo y se agregaron 45 µL de mezcla de microesferas al 50 % (50 % de microesferas AMPure más un 50 % de solución de NaCl/PEG TekNova n.º cat P4136). La mezcla se agitó y colocó en un rack magnético. El sobrenadante resultante se retiró y las microesferas se lavaron con etanol al 80 %. Se agregaron 25 µL de tampón de elución (EB) y la mezcla se colocó en un rack magnético. El sobrenadante resultante final se eliminó y colocó en un tubo de 1,5 mL. Este método produjo colecciones en el rango de tamaño de 525 pares de base de ADN (bp) (inserción más adaptador).

La colección de ADN se amplió utilizando KAPA Biosystem HiFi Hot Start (Kapa Biosystems, Inc., Wilmington, MA) utilizando las siguientes condiciones cíclicas: [98 °C, 45 s]; 12 x [98 °C, 15 s, 60 °C, 30 s, 72 °C, 30 s]; [72 °C, 1 min]. Cada reacción contenía: 5 µL de colección de ADN, 1 µL de cebador universal Bioscience (25 µM), 18 µL de agua destilada, 1 µL de cebador indexado Bioscience (25 µM), 25 µL 2X de KAPA HiFi polimerasa.

Las colecciones se analizaron en el bioanalizador Agilent 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA), utilizando chips de alta sensibilidad para determinar el rango de tamaño de la colección y el tamaño promedio del inserto. Todas las colecciones fueron procesadas para la secuenciación de extremos emparejados (PE) (100 ciclos por lectura; 12-24 colecciones por vía) en un sistema de secuenciación HiSeq 2500 que utiliza los protocolos de secuenciación estándar del fabricante (Illumina, Inc., San Diego, CA).

Se desarrolló una herramienta de análisis computacional de *Bacillus* para identificar y caracterizar los genes de toxina probables para la priorización de moléculas de partida para el ensayo de laboratorio.

El ensamblaje y análisis del genoma así como el análisis de la colección genómica descritos anteriormente dieron lugar a la identificación de cuatro genes tipo Cry-9 en las cepas de *Bacillus thuringiensis* con toxicidad para al menos

el gusano cortador grasiento (*Agrotis ipsilon*). Las características de identificación de los genes tipo Cry9 y proteínas aparecen en la Tabla 1.

Tabla 1. Genes tipo Cry9 identificados en las cepas de *Bacillus thuringiensis*.

Cepa	Gen/proteína Nombre	Peso molecular (kD)	SEQ ID NO del nucleótido:	SEQ ID NO del aminoácido:
C2080	BT0044	127,4	1	13
C0633	BT0051	129,6	2	14
M0262	BT0068	132,3	3	15
M1455	BT0128	132,7	4	16

Ejemplo 5. Homología de BT0044, BT0051, BT0068 y BT0128 con proteínas Cry de Bt conocidas

Una búsqueda en bases de datos de proteínas con secuencias de aminoácidos de las proteínas de la invención revelaron que son homólogas a proteínas insecticidas conocidas. La comparación de las secuencias de aminoácido de las proteínas de la invención con la base de datos no redundante (nr) mantenida por NCBI utilizando el algoritmo de BLAST reveló que las siguientes proteínas tienen el bloque de identidad de aminoácidos más fuerte respecto de las secuencias de la invención (Tabla 2).

Tabla 2. Identidad porcentual de las proteínas Cry de la invención con las proteínas Cry conocidas.

		Identidad porcentual							
	Cry9Aa1	Cry9Ba1	Cry9Bb1	Cry9Ca1	Cry9Da1	Cry9Db1	Cry9Ea1	CryFa1	CryGa1
0044	73	56	50	52	53	52	52	50	47
0051	56	62	61	98	69	68	70	64	35
0068	54	70	77	69	66	68	69	62	36
0128	60	76	71	69	66	67	68	62	35

Ejemplo 6. Expresión de la proteína Bt en células huésped recombinantes

Expresión de *Bacillus*. Los genes de interés se expresaron en una cepa de *Bacillus* acristalífero sin actividad visible en coleópteros o lepidópteros mediante el vector de expresión pCIB5634' descrito anteriormente, que contiene un promotor de proteína Cry adecuado y un marcador de resistencia a la eritromicina. Los constructos se utilizaron para transformar la cepa huésped mediante electroporación y posterior selección en placas de agar que contienen eritromicina. Estas cepas recombinantes se cultivaron en la fase de esporulación en un medio de T3 a 28 °C durante de 4 a 5 días. El sedimento celular se recolectó y lavó de manera iterativa antes de la solubilización en un tampón de carbonato con pH alto (50 mM) que contenía DTT 2 mM.

Expresión en *E. coli*. Los genes de interés se expresaron en varias cepas de *E. coli* utilizando los vectores pET28a o pET29a (EMD Millipore). Los constructos se utilizaron para transformación mediante electroporación y posterior selección en placas de agar que contenían kanamicina. Estas cepas recombinantes se cultivaron y se indujo la expresión utilizando una inducción IPTG a 28°C. Las células se volvieron a suspender en un tampón de carbonato con pH alto (50 mM) que contenía DDT 2 mM y posteriormente se quebraron utilizando un homogeneizador Microfluidics LV-1.

Análisis de expresión. Los lisados celulares resultantes (de alguno de los huéspedes) se limpiaron mediante centrifugación y se analizaron las muestras para verificar su pureza mediante SDS-PAGE y electroferograma (BioRad Experion). Las concentraciones totales de proteína se determinaron mediante un ensayo de Bradford o Thermo 660. Las proteínas Cry purificadas se sometieron a bioensayos.

Ejemplo 7. Actividad de las proteínas Cry en los bioensayos

Las proteínas producidas en el Ejemplo 6 se sometieron a ensayo contra una o más de las siguientes especies de plagas de insectos utilizando un método de bioensayo de dieta artificial reconocido en la técnica: el cogollero del maíz (FAW; *Spodoptera frugiperda*); el gusano elotero (CEW; *Helicoverpa zea*), el barrenador de maíz europeo (ECB; *Ostrinia nubilalis*), el gusano cortador grasiento (BCW; *Agrotis ipsilon*), el barrenador de la caña de azúcar (SCB; *Diatraea saccharalis*), la oruga de la leguminosa (VBC; *Anticarsia gemmatalis*), el falso medidor de la soja (SBL; *Chrysodeixis includens*), el barrenador del maíz del sudoeste (SWCB; *Diatraea grandiosella*), gusano cortador occidental del frijol (WBCW; *Striacosta albicosta*), cogollero del tabaco (TBW; *Heliothis virescens*), barrenador de maíz asiático (ACB; *Ostrinia furnacalis*), gusano bellotero del algodón (CBW; *Helicoverpa armigera*), perforador rallado del tallo (SSB; *Chilo suppressalis*), perforador del tallo rosa (PSB; *Sesamia inferens*), enrollador de las hojas de arroz (RLF; *Cnaphalocrocis medinalis*).

Se aplicó una cantidad equivalente de proteína en solución a la superficie de una dieta de insectos artificial (Bioserv, Inc., Frenchtown, NJ) en placas de 24 pocillos. Después que la superficie de dieta se secara, se añadieron a cada pocillo las larvas de las especies de insectos que se estaban estudiando. Las placas se sellaron y mantuvieron en condiciones ambientales de laboratorio en cuanto a temperatura, luz y humedad relativa. Un grupo de control positivo consistió en larvas expuestas a una cepa *Bacillus* natural de amplio espectro y muy activa. Los grupos de control negativos consistieron en larvas expuestas a dieta de insectos tratada únicamente con la solución tampón y larvas en dieta de insectos no tratada; es decir, solo dieta. Se evaluó la mortalidad después de aproximadamente 120 horas y se puntuó en relación con los controles.

Los resultados aparecen en la Tabla 3, donde "-" significa que no hay actividad en comparación con el control, "+/-" significa una actividad del 0 al 10 % en comparación con el control (esta categoría también incluye una mortalidad del 0 % con un nivel alto de inhibición del crecimiento de larvas), "+" significa una actividad del 10 al 25 % en comparación con el control, "++" significa una actividad del 25 al 75 % en comparación con el control, y "+++" una actividad del 75 al 100 % en comparación con el control.

Tabla 3. Resultados del bioensayo con proteínas Cry.

Insecto	Proteínas BT			
	0044	0051	0068	0128
FAW	-	-	-	-
CEW	+	-	-	+
ECB	-	+++	-	+/-
BCW	+	+++	+++	+++
SCB	+/-	+++	-	+/-
VBC		+++	+++	+++
SBL		-	+++	+++
SWCB	-	+++	+	++
WBCW	-	-		
TBW			+++	+++
ACB		+++		
CBW		+/-		
SSB		+		
PSB		+		
RLF		+++		

Ejemplo 8. Destino de las proteínas Cry en el ensayo de fluido gástrico simulado.

Algunas proteínas Cry se han expresado en plantas y la semilla de dichas plantas se vende anualmente a productores para uso en el control de varias plagas de insectos. Dichos productos plaguicidas autoprotegidos se someten a revisión y registro mediante agencias reguladoras que incluyen, por ejemplo, la Agencia de Protección del Medioambiente de Estados Unidos (EPA).

La exposición dietaria es la vía principal a través de la cual los seres humanos pueden estar expuestos a proteínas Cry expresadas en plantas transgénicas. La toxicidad mamífera oral aguda y la digestibilidad de la proteína son los criterios de valoración en la evaluación del riesgo de salud humano de la EPA. Una prueba científica adicional de la seguridad de las proteínas Cry es que se ha mostrado que se degradan rápidamente *in vitro* utilizando fluidos gástricos simulados. Los resultados de siete ensayos *in vitro* realizados con proteínas Cry1, Cry2 y Cry3 representativas establecen que las proteínas se degradan rápidamente, generalmente en 30 segundos. Los resultados respaldan la conclusión más amplia de que los miembros de estos grupos de proteínas Cry (que comparten una identidad de la secuencia de aminoácidos significativa) posiblemente se degraden rápidamente después de la ingestión por seres humanos. Otra área de consideración es si las proteínas Cry pueden inducir una reacción alérgica. La degradación *in vitro* rápida demostrada de las proteínas Cry debería minimizar la posibilidad de que esto ocurra. En comparación, los alérgenos alimentarios persisten generalmente en el modelo gastrointestinal *in vitro*, mientras que las proteínas alimenticias comunes sin historial alérgico se degradaron rápidamente en el fluido gástrico simulado (Metcalfe et al. 1996).

Se puede tener más información acerca de la alergenidad potencial de una proteína a través de un análisis de la digestibilidad de la proteína en un fluido gástrico simulado (SGF). Casi todas las proteínas Cry expresadas en plantas transgénicas que han sido sometidas a ensayo hasta la fecha se digieren rápidamente y por ende, se consideran no alérgicas. Sin embargo una proteína Cry9C encontrada en el producto de maíz transgénico conocida como Starlink es considerada parcialmente estable a SGF. Aunque la proteína Cry9C Starlink no es tóxica para animales, las propiedades de digestibilidad parcial y estabilidad de procesamiento parcial hicieron que a la EPA le resultara difícil eliminar con certeza la posibilidad de que la proteína Cry9C Starlink pudiera actuar como un alérgeno alimenticio lo que propició que finalmente la compañía que desarrolló Starlink retirara los productos del mercado estadounidense.

Actualmente, no existen ensayos definitivos para determinar el potencial alergénico de nuevas proteínas. Por lo tanto, EPA utiliza un enfoque de ponderación de pruebas donde se consideran los siguientes factores: fuente de la característica; comparación de la secuencia de aminoácidos con alérgenos conocidos; y propiedades bioquímicas de la proteína, que incluyen la digestibilidad *in vitro* en fluido gástrico simulado (SGF) y glicosilación.

Un ensayo del fluido gástrico simulado (SGF) mide la digestibilidad *in vitro* de una proteína de ensayo en condiciones muy controladas representativas del tubo digestivo superior de un mamífero. Para resumir, se expuso la proteína Cry de ensayo producida por vía bacteriana (a una concentración de 0,5-5 mg/ml) a la pepsina enzimática (de la mucosa gástrica porcina, solubilizada en 2 mg/ml de NaCl, pH 1,2) en una relación de 10 unidades de actividad pepsina/μg de proteína de ensayo en un período de tiempo de una hora a 37 °C. Las muestras se retiraron a los 1, 2, 5, 10, 30, y 60 minutos e inmediatamente se desactivaron con la adición de un tampón de terminación (65 % de bicarbonato de sodio 0,5 M pH 11, 35 % de tampón de carga de tricina) pre-calentado (95 °C – 2 minutos) para inactivar inmediatamente la pepsina y se volvieron a calentar durante 5 minutos adicionales. Una vez que el ensayo se completó, las muestras de puntos temporales y los controles (proteína de ensayo sola, pepsina sola) se examinaron mediante SDS-PAGE en un gel de Tris-Tricina al 10-20 % (con péptidos visibles hasta 1 kDa) para hacer un seguimiento de la cinética y el nivel de digestión logrado por la pepsina.

Los resultados de los ensayos de SGF demostraron que todas las proteínas Cry de la invención se degradaron muy rápidamente. Estos resultados demuestran que aunque las proteínas Cry de la invención están relacionadas con la familia de la proteína Cry9, son bastante diferentes en cuanto a su respuesta al ensayo de SGF en comparación con algunos resultados publicados, por ejemplo, Cry9C en Starlink, lo que sugiere que existen diferencias estructurales significativas en los sitios de escisión clave de la pepsina en la proteína. Estos resultados sugieren que la posibilidad de que las proteínas Cry de la invención sean alergénicas es mínima.

Ejemplo 9. Mutagénesis de BT-0051

La predicción de las regiones antigénicas en una proteína es útil para un enfoque racional de la síntesis de péptidos que pueden provocar anticuerpos que reaccionan con la proteína intacta y diferencian las proteínas relacionadas. Para este ejemplo, se superimpuso la secuencia de aminoácidos de BT-0051 nativo (SEQ ID NO:6) en la estructura cristalina de una proteína Cry8Ea1 (n.º de acceso 3EB7; banco de datos de proteína en www.web.rcsb.org/pdb/; Véase también Berman *et al.*, 2000. Nuc. Acids Res. 28:235-242) y se mapearon las regiones antigénicas predichas utilizando el Vector NTI 8.0 (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA; Véase también Welling *et al.* 1985. FEBS Lett. 188:215-218) en la estructura. La selección de una región mutagénica adecuada consistió en elegir los dominios de bucle en las regiones no conservadas fuera del dominio I. Los bucles involucrados en el reconocimiento del receptor de la proteína Cry fueron eliminados de la selección al igual que cualquier residuo del que se había predicho que estaba involucrado en la activación de la proteasa. Esto dejó una región para mutagénesis representada por los aminoácidos 342-354 de la SEQ ID NO:6. Se seleccionaron los cambios L350I, N351Q, y T354S (SEQ ID NO: 18) en base a la expectativa de que darían lugar a un mínimo cambio estructural o cambio funcional en relación con la BT-0051 nativa. Dichos cambios produjeron una región antigénica que permite que BT-0051 (mBT-0051; SEQ ID NO:18) mutante se distinga de BT-0051 nativa (SEQ ID NO:14) y de otras proteínas Cry9 relacionadas.

Ejemplo 10. Vectorización de genes para la expresión en plantas

Antes de la expresión en plantas, se sintetiza un polinucleótido sintético que comprende una secuencia nucleotídica que codifica cada una de las proteínas Cry de Bt, BT-0044, BT-0051, BT-0068 y BT-0128 (SEQ ID NO:5-8, respectivamente), y un polinucleótido sintético que comprende una secuencia nucleotídica que codifica cada una de las proteínas Cry de Bt mutantes, mBT-0044, mBT-0051, mBT-0068 y mBT-0128 (SEQ ID NO:17-20, respectivamente) en una plataforma de síntesis de genes automática (Genscript, Inc., Piscataway, NJ). Para este ejemplo, se produjo un primer casete de expresión que comprende un promotor de la ubiquitina (Ubi1) de maíz unido a la secuencia codificante de la proteína Cry que se une operablemente a un terminador NOS y se produce un segundo casete de expresión que comprende un promotor Ubi1 unido operablemente a una secuencia que codifica la fosfomanosa isomerasa (PMI) que se une funcionalmente a un terminador NOS. La expresión de PMI permite la selección positiva de las plantas transgénicas en manosa. Ambos casetes de expresión se clonan en un vector adecuado para la transformación de maíz mediada por *Agrobacterium*.

Ejemplo 11. Expresión de las proteínas Cry en plantas

La transformación de embriones de maíz inmaduros se realiza básicamente como se describe en Negrotto *et al.*, 2000, Plant Cell Reports 19: 798 803. Resumiendo, se cultiva la cepa LBA4404 (pSB1) de *Agrobacterium* que comprende un vector descrito en el Ejemplo 12 en un medio sólido de YEP (extracto de levadura (5 g/L), peptona (10g/L), NaCl (5g/L), 15g/l agar, pH 6,8) durante de 2 a 4 días a 28 °C. Se suspendieron aproximadamente 0,8X 10⁹ células de *Agrobacterium* en un medio LS-inf complementado con 100 μM As. Las bacterias se preindujeron en este medio durante aproximadamente de 30 a 60 minutos.

- Se extirparon embriones inmaduros de una línea de maíz consanguínea de mazorcas de 8 a 12 días y se añadieron a LS-inf + 100 μ M As líquido. Los embriones se enjuagaron una vez con un medio de infección fresco. Posteriormente, se añadió solución de *Agrobacterium* y los embriones se agitaron en vórtex durante 30 segundos y se dejaron sedimentar con la bacteria durante 5 minutos. Los embriones se transfirieron posteriormente con el escutelo boca arriba al medio LSA y se cultivaron en la oscuridad durante de dos a tres días. Posteriormente, se transfirieron entre aproximadamente 20 y 25 embriones por placa petri a un medio LSD complementado con cefotaxima (250 mg/l) y nitrato de plata (1,6 mg/l) y se cultivaron en la oscuridad a aproximadamente 28 °C durante 10 días.
- Los embriones inmaduros, que producen callo embriogénico, se transfirieron a un medio de LSD1M0.5S. Los cultivos se seleccionaron en este medio durante aproximadamente 6 semanas con una etapa de subcultivo a aproximadamente las 3 semanas. Los callos que sobrevivieron se transfirieron a un medio de Reg1 complementado con manosa. Después del cultivo con luz (16 horas de luz/ 8 horas de oscuridad), se transfirieron los tejidos verdes a un medio de Reg2 sin reguladores del crecimiento y se incubaron durante aproximadamente de 1 a 2 semanas. Los plantones se transfirieron a cajas de Magenta GA-7 (Magenta Corp, Chicago Ill.) que contenían medio Reg3 y se cultivaron en la luz. Después de aproximadamente de 2 a 3 semanas, las plantas se sometieron a ensayo para verificar la presencia de genes PMI y el gen *cry* Bt mediante PCR. Las plantas positivas del ensayo de PCR se transfirieron a un invernadero para una evaluación adicional.
- Se evaluó el número de copia (determinado mediante análisis de Taqman), nivel de expresión de proteínas (determinado mediante ELISA), y eficacia frente a especies de insectos de interés en las plantas transgénicas mediante bioensayos de escisión de la hoja. Específicamente, se escindió tejido de la hoja de eventos de copia única (etapa V3-V4) y se infectó con larvas neonatas, y posteriormente se incubó a temperatura ambiente durante 5 días. El tamaño de la muestra para el bioensayo de disco de la hoja varía dependiendo de las especies de insectos estudiadas (barrenador de maíz europeo (ECB), n=10; cogollero de maíz (CEW), n=3, gusano cortador grasiento (BCW), n=5). Las lecturas para evaluar el daño del tejido y la mortalidad se realizan aproximadamente el día 3 y el día 5; las muestras se evaluaron para verificar el daño en relación con el control negativo utilizando la siguiente escala: "+" : <5 % de daño del tejido, todas las larvas muertas; "+/-": 5-20 % de daño del tejido, todas las larvas muertas; o "-": >20 % de daño del tejido, algunas larvas vivas y/o progresando a la 2.^a etapa.
- Los resultados del bioensayo del tejido de la planta transgénica confirman que las proteínas Cry de la invención cuando se expresan en plantas transgénicas son tóxicas para los insectos diana. Por ejemplo, mBT-0051 expresada en maíz transformado de manera estable con un gen quimérico de la invención es activa contra al menos el gusano cortador grasiento (*Agrotis ipsilon*) así como contra el barrenador de maíz asiático (*Ostrinia furnacalis*), el perforador rallado del tallo (*Chilo suppressalis*) y el gusano bellotero del algodón (*Helicoverpa armigera*).

REIVINDICACIONES

1. Un gen quimérico que comprende un promotor heterólogo unido funcionalmente a una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia nucleotídica que codifica una proteína tóxica para al menos el gusano cortador grasiento (*Agrotis ipsilon*), donde la secuencia nucleotídica (a) comprende la SEQ ID NO: 10; o (b) codifica una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 18.
2. Una molécula de ácido nucleico sintética que comprende una secuencia nucleotídica que codifica una proteína que es activa contra al menos el gusano cortador grasiento (*Agrotis ipsilon*), donde la secuencia nucleotídica codifica una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 18.
3. Una proteína aislada que es tóxica para al menos el gusano cortador grasiento (*Agrotis ipsilon*), donde la proteína comprende una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 18.
4. Una composición insecticida que comprende la proteína de la reivindicación 3 y un portador aceptable en agricultura.
5. Un vector recombinante que comprende un gen quimérico de la reivindicación 1.
6. Una planta transgénica que comprende el gen quimérico de la reivindicación 1.
7. La semilla transgénica de la planta transgénica de la reivindicación 6, donde dicha semilla comprende el gen quimérico de la reivindicación 1.
8. Un método para controlar al menos insectos del gusano cortador grasiento (*Agrotis ipsilon*), que comprende administrar a los insectos una cantidad eficaz de la proteína de la reivindicación 3.