

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 954 940**

51 Int. Cl.:

**C07K 4/04** (2006.01)

**C12N 15/82** (2006.01)

**C07K 14/21** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.10.2016 PCT/US2016/056898**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.04.2017 WO17066479**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.10.2016 E 16785666 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.06.2023 EP 3362466**

54 Título: **Gen de delta-endotoxina axmi554 y procedimientos para su utilización**

30 Prioridad:

**14.10.2015 US 201562241220 P**

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

**27.11.2023**

73 Titular/es:

**BASF AGRICULTURAL SOLUTIONS SEED US  
LLC (100.0%)  
100 Park Avenue  
Florham Park, NJ 07932, US**

72 Inventor/es:

**RODGERS-VIEIRA, ELYSE;  
SAMPSON, KIMBERLY;  
LEHTINEN, DUANE;  
LOESEL, PETER;  
PORTZ, DANIELA y  
CHOUGULE, NANASAHEB**

74 Agente/Representante:

**GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo**

**Observaciones:**

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

ES 2 954 940 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

Gen de delta-endotoxina axmi554 y procedimientos para su utilización

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere al campo de la biología molecular. Se proporcionan nuevos genes que codifican proteínas pesticidas. Estas proteínas y las secuencias de ácido nucleico que las codifican son útiles en la preparación de formulaciones pesticidas y en la producción de plantas transgénicas resistentes a plagas.

**Antecedentes de la invención**

10 *Bacillus thuringiensis* es una bacteria Gram-positiva del suelo formadora de esporas caracterizada por su capacidad de producir inclusiones cristalinas que son específicamente tóxicas para ciertos órdenes y especies de insectos, pero son inofensivas para las plantas y otros organismos no objetivo. Por esta razón, las composiciones que incluyen cepas de *Bacillus thuringiensis* o sus proteínas insecticidas pueden utilizarse como insecticidas aceptables desde el punto de vista medioambiental para controlar plagas de insectos agrícolas o insectos vectores de diversas enfermedades humanas o animales.

15 Las proteínas cristalinas (Cry) (delta-endotoxinas) de *Bacillus thuringiensis* tienen una potente actividad insecticida contra larvas predominantemente de lepidópteros, hemípteros, dípteros y coleópteros. Estas proteínas también han mostrado actividad contra los órdenes de plagas *Hymenoptera*, *Homoptera*, *Phthiraptera*, *Mallophaga* y *Acari*, así como otros órdenes de invertebrados como *Nemathelminthes*, *Platyhelminthes* y *Sarcostigophora* (Feitelson (1993) El árbol genealógico de *Bacillus Thuringiensis*. En *Advanced Engineered Pesticides*, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y.) Estas proteínas se clasificaron originalmente como CryI a CryV basándose principalmente en su actividad insecticida. Las clases principales eran 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 se clasificaron a su vez en subfamilias; a las proteínas más estrechamente relacionadas dentro de cada familia se les asignaron letras de división como *CryIA*, *Cry1B*, *Cry1C*, etc. A las proteínas aún más estrechamente relacionadas dentro de cada división se les asignaron nombres como *Cry1C1*, *Cry1C2*, etc.

20 Se describió una nomenclatura para los genes Cry basada en la homología de la secuencia de aminoácidos más que en la especificidad de la diana del insecto (Crickmore et al. (1998) *Microbiol. (J Mol. Biol.)*, 286(62):807-813. En esta clasificación, a cada toxina se le asigna un nombre único que incorpora un rango primario (un número arábigo), un rango secundario (una letra mayúscula), un rango terciario (una letra minúscula) y un rango cuaternario (otro número arábigo). Los números romanos se han sustituido por números arábigos en el rango primario. Las proteínas con menos de un 45% de identidad de secuencia tienen diferentes rangos primarios, y los criterios para los rangos secundarios y terciarios son 78% y 95%, respectivamente.

35 La proteína cristalina no muestra actividad insecticida hasta que ha sido ingerida y solubilizada en el intestino medio del insecto. La protoxina ingerida es hidrolizada por las proteasas del tubo digestivo del insecto hasta convertirse en una molécula tóxica activa. (Höfte y Whiteley (1989) *Microbiol.* 53, 242-255). Esta toxina se une a los receptores del borde en cepillo apical en el intestino medio de las larvas diana y se inserta en la membrana apical creando canales o poros iónicos, lo que provoca la muerte de las larvas.

40 Las delta-endotoxinas 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 consta de siete hélices alfa y participa en la inserción en la membrana y la formación de poros. El dominio II consta de tres hojas beta dispuestas en una configuración de llave griega, y el dominio III consta de dos hojas beta antiparalelas en formación de "jelly-roll" (de Maagd *et al.*, 2001, *supra*). Los dominios II y III intervienen en el reconocimiento y la unión al receptor, por lo que se consideran determinantes de la especificidad de la toxina.

45 Aparte de las delta-endotoxinas, existen otras clases conocidas de toxinas proteicas pesticidas. Las toxinas VIP1/VIP2 (véase, por ejemplo, Patente estadounidense 5.770.696) son toxinas plaguicidas binarias que muestran una fuerte actividad sobre los insectos mediante un mecanismo que se cree que implica endocitosis mediada por receptores seguida de toxicación celular, similar al modo de acción de otras toxinas binarias ("A/B"). Las toxinas A/B como VIP, C2, CDT, CST o las toxinas edematosa y letal de *B. anthracis* interactúan inicialmente con las células diana a través de una unión específica mediada por receptores de los componentes "B" como monómeros. Estos monómeros forman entonces homoheptámeros. El complejo heptámero-receptor "B" actúa entonces como una plataforma de acoplamiento que posteriormente se une y permite la translocación de un componente(s) enzimático(s) "A" al citosol a través de la endocitosis mediada por el receptor. Una vez dentro del citosol de la célula, los componentes "A" inhiben la función celular normal, por ejemplo, mediante la ADP-ribosilación de la G-actina o el aumento de los niveles intracelulares de AMP cíclico (AMPC). Véase Barth et al. (2004) *Microbiol Mol Biol Rev* 68:373 --402.

El uso intensivo de insecticidas basados en *B. thuringiensis* ya ha dado lugar a resistencias en poblaciones de campo de la polilla del diamante, *Plutella xylostella* (Ferre y Van Rie (2002) Annu. Rev. Entomol. 47, 501-533). El mecanismo más común de resistencia es la reducción de la unión de la toxina a su(s) receptor(es) específico(s) del intestino medio. Esto también puede conferir resistencia cruzada a otras toxinas que comparten el mismo receptor (Ferre y Van Rie (2002)).

Debido a la devastación que pueden conferir los insectos y a la mejora del rendimiento mediante el control de las plagas de insectos, existe una necesidad continua de descubrir nuevas formas de toxinas pesticidas.

### Sumario de la invención

Se proporcionan composiciones y procedimientos para conferir actividad pesticida a bacterias, plantas, células vegetales, tejidos y semillas. Las composiciones incluyen moléculas de ácido nucleico que codifican secuencias para polipéptidos pesticidas e insecticidas, vectores que comprenden esas moléculas de ácido nucleico y células huésped que comprenden los vectores. Las composiciones también incluyen las secuencias polipeptídicas pesticidas. Se divulgan anticuerpos contra esos polipéptidos. Las secuencias de nucleótidos pueden utilizarse en construcciones de ADN o casetes de expresión para la transformación y expresión en organismos, incluidos microorganismos y plantas. Las secuencias de nucleótidos o aminoácidos pueden ser secuencias sintéticas que han sido diseñadas para su expresión en un organismo, incluyendo, entre otros, un microorganismo o una planta. Por lo tanto, la presente invención se refiere a una molécula de ácido nucleico recombinante que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene actividad pesticida, en la que dicha secuencia de nucleótidos se selecciona del grupo que consiste en:

- a) la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3;
- b) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:4 o SEQ ID NO:5;
- c) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 96 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:4 o SEQ ID NO:5, en la que el polipéptido tiene actividad tóxica contra más de una plaga, incluidos miembros de los órdenes *Lepidoptera*, *Diptera* y *Coleoptera* o del filo *Nematoda*.

Además, la presente invención se refiere a un polipéptido recombinante con actividad insecticida, seleccionado del grupo que consiste en:

- a) un polipéptido que comprenda la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:4 o SEQ ID NO:5; y
- b) un polipéptido que comprenda una secuencia de aminoácidos que tenga al menos un 96% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO:4 o SEQ ID NO: 5, en el que el polipéptido tiene actividad tóxica contra más de una plaga, incluidos miembros de los órdenes *Lepidoptera*, *Diptera* y *Coleoptera* o del filo *Nematoda*.

Además, la presente invención proporciona una composición que proporciona dicho polipéptido recombinante. Se divulgan composiciones que comprenden bacterias, plantas, células vegetales, tejidos y semillas que comprenden la secuencia de nucleótidos de la invención.

En particular, se proporcionan moléculas de ácido nucleico aisladas o recombinantes que codifican una proteína pesticida. Además, se incluyen las secuencias de aminoácidos correspondientes a la proteína pesticida. En particular, la presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico recombinante que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO:4 o 5 o una secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO:2 o 3, así como variantes biológicamente activas y fragmentos de las mismas. También se divulgan secuencias de nucleótidos que son complementarias a una secuencia de nucleótidos de la invención, o que hibridan con una secuencia de la invención o un complemento de la misma. Se proporcionan además vectores, células huésped, plantas y semillas que comprenden las secuencias de nucleótidos de la invención, o secuencias de nucleótidos que codifican las secuencias de aminoácidos de la invención, así como variantes biológicamente activas y fragmentos de las mismas. Por lo tanto, la presente invención se refiere a un vector que comprende la molécula de ácido nucleico recombinante de la invención, a una célula huésped que contiene el ácido nucleico recombinante de la invención, a una planta transgénica que comprende la célula huésped de la invención y a una semilla transgénica que comprende la molécula de ácido nucleico de la invención.

Además, la presente invención se refiere a una planta o célula vegetal que tiene incorporada de forma estable en su genoma una construcción de ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína que tiene actividad insecticida, en la que dicha secuencia de nucleótidos se selecciona del grupo que consiste en:

- a) la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:3;
- b) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:4 o SEQ ID NO:5; y
- c) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 96% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:4 o SEQ

ID NO:5, en la que el polipéptido tiene actividad tóxica contra más de una plaga, incluidos miembros de los órdenes *Lepidoptera*, *Diptera* y *Coleoptera* o del filo *Nematoda*.

Se proporcionan procedimientos para producir los polipéptidos de la invención, y para usar esos polipéptidos para controlar o matar una plaga de lepidópteros, hemípteros, coleópteros, nematodos o dípteros. Por lo tanto, la presente invención se refiere a un procedimiento para controlar una población de plagas de lepidópteros, hemípteros, coleópteros, nematodos o dípteros que comprende el contacto de dicha población con una cantidad pesticida eficaz de dicho polipéptido recombinante. Además, la invención proporciona un procedimiento para matar una plaga de lepidópteros, hemípteros, coleópteros, nematodos o dípteros, que comprende poner en contacto dicha plaga con, o alimentar a dicha plaga con una cantidad plaguicida eficaz del polipéptido. Aún más, la invención se refiere a un procedimiento para proteger una planta de una plaga, que comprende expresar en una planta o célula de la misma una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido pesticida, en el que dicha secuencia de nucleótidos se selecciona del grupo que consiste en:

- a) la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:3;
- b) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:4 o SEQ ID NO:5; y
- c) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 96% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:4 o SEQ ID NO:5, en la que el polipéptido tiene actividad tóxica contra más de una plaga, incluidos miembros de los órdenes *Lepidoptera*, *Diptera* y *Coleoptera* o del filo *Nematoda*.

Además, la presente invención se refiere a un procedimiento para aumentar el rendimiento de una planta que comprende cultivar en un campo una planta o una semilla de la misma que tiene incorporada de forma estable en su genoma una construcción de ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína que tiene actividad insecticida, en la que dicha secuencia de nucleótidos se selecciona del grupo que consiste en:

- a) la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:3;
- b) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:4 o SEQ ID NO:5; y
- c) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 96% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:4 o SEQ ID NO:5, el polipéptido tiene actividad tóxica contra más de una plaga, incluidos miembros de los órdenes *Lepidoptera*, *Diptera* y *Coleoptera* o del filo *Nematoda*;

en el que dicho campo está infestado con una plaga contra la que dicho polipéptido tiene actividad pesticida; y en el que un aumento del rendimiento comprende cualquier aumento estadísticamente significativo del rendimiento en comparación con una planta que no exprese la proteína que tiene actividad insecticida.

También se incluyen en la divulgación procedimientos y kits para detectar los ácidos nucleicos y polipéptidos de la invención en una muestra.

Las composiciones y procedimientos de la invención son útiles para la producción de organismos con mayor resistencia o tolerancia a las plagas.

Estos organismos y composiciones que comprenden los organismos son deseables para fines agrícolas. Por lo tanto, la presente invención se refiere al ácido nucleico de la invención para proteger una planta de una plaga contra la cual el aminoácido codificado por dicho ácido nucleico tiene actividad pesticida. Las composiciones de la invención también son útiles para generar proteínas alteradas o mejoradas que tengan actividad pesticida, o para detectar la presencia de proteínas o ácidos nucleicos pesticidas en productos u organismos.

### Descripción detallada

La presente invención se refiere a composiciones y procedimientos para regular la resistencia o tolerancia a plagas en organismos, particularmente plantas o células vegetales. Por "resistencia" se entiende que la plaga (por ejemplo, el insecto) muere tras la ingestión u otro contacto con los polipéptidos de la invención. Por "tolerancia" se entiende una alteración o reducción del movimiento, la alimentación, la reproducción u otras funciones de la plaga. Los procedimientos implican la transformación de organismos con una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína pesticida de la invención. En particular, las secuencias nucleotídicas de la invención son útiles para preparar plantas y microorganismos que posean actividad pesticida. Así, se obtienen bacterias transformadas, plantas, células vegetales, tejidos vegetales y semillas. Las composiciones son ácidos nucleicos pesticidas y proteínas de *Bacillus* u otras especies. Las secuencias se utilizan en la construcción de vectores de expresión para su posterior transformación en organismos de interés, como sondas para el aislamiento de otros genes homólogos (o parcialmente homólogos) y para la generación de proteínas pesticidas alteradas mediante procedimientos conocidos en la técnica, como el intercambio de dominios o la mezcla de ADN, por ejemplo, con miembros de las familias de endotoxinas Cry1, Cry2 y Cry9. Las proteínas se utilizan para controlar o eliminar poblaciones de

lepidópteros, hemípteros, coleópteros, dípteros y nematodos, así como para producir composiciones con actividad pesticida.

Por "toxina plaguicida" o "proteína plaguicida" se entiende una toxina que tiene actividad tóxica contra una o más plagas, incluidos, entre otros, miembros de los órdenes *Lepidoptera*, *Diptera* y *Coleoptera*, o del filo *Nematoda*, o una proteína que tiene homología con dicha proteína. Se han aislado proteínas pesticidas de organismos como, por ejemplo, *Bacillus sp.*, *Clostridium bifermentans* y *Paenibacillus popilliae*. Las proteínas pesticidas incluyen secuencias de aminoácidos deducidas de las secuencias nucleotídicas de longitud completa aquí divulgadas, y secuencias de aminoácidos que son más cortas que las secuencias de longitud completa, ya sea debido al uso de un sitio de inicio alternativo aguas abajo, o debido a un procesamiento que produce una proteína más corta que tiene actividad pesticida. El procesamiento puede producirse en el organismo en el que se expresa la proteína o en la plaga tras la ingestión de la proteína.

Las proteínas pesticidas engloban las delta-endotoxinas. Las delta-endotoxinas incluyen las proteínas identificadas como *cry1 a cry72*, *cyt1* y *cyt2*, y la toxina Cyt-like. Actualmente se conocen más de 250 especies de delta-endotoxinas con una amplia gama de especificidades y toxicidades. Para una lista más amplia, véase Crickmore et al. (1998), Microbiol. (J Mol. Biol., Rev. 62:807-813y para actualizaciones periódicas, véase Crickmore et al. (2003) "Nomenclatura de la toxina *Bacillus thuringiensis*", en [www.biols.susx.ac.uk/Home/Neil\\_Crickmore/Bt/index](http://www.biols.susx.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/index).

Por lo tanto, aquí se proporcionan nuevas secuencias nucleotídicas aisladas o recombinantes que confieren actividad pesticida. Estas secuencias de nucleótidos codifican polipéptidos con homología a delta-endotoxinas o toxinas binarias conocidas. También se proporcionan las secuencias de aminoácidos de las proteínas pesticidas. La proteína resultante de la traducción de este gen permite a las células controlar o matar las plagas que la ingieren.

#### Moléculas de ácido nucleico aisladas, y variantes y fragmentos de las mismas

Un aspecto de la invención se refiere a moléculas de ácido nucleico recombinantes que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican proteínas y polipéptidos pesticidas o porciones biológicamente activas de los mismos. Se divulgan moléculas de ácido nucleico suficientes para su uso como sondas de hibridación para identificar moléculas de ácido nucleico que codifican proteínas con regiones de homología de secuencia. Además, se divulgan secuencias nucleotídicas capaces de hibridar con las secuencias nucleotídicas de la invención en condiciones estrictas, tal como se define en el presente documento. Tal y como se utiliza aquí, el término "molécula de ácido nucleico" pretende incluir moléculas de ADN (por ejemplo, ADN recombinante, ADNc o ADN genómico) y moléculas de ARN (por ejemplo, ARNm) y análogos del ADN o ARN generados utilizando análogos de nucleótidos. La molécula de ácido nucleico puede ser monocatenaria o bicatenaria, pero preferentemente es ADN bicatenario. El término "recombinante" engloba polinucleótidos o polipéptidos que han sido manipulados con respecto al polinucleótido o polipéptido nativo, de forma que el polinucleótido o polipéptido difiere (por ejemplo, en composición química o estructura) de lo que ocurre en la naturaleza. En otra realización, un polinucleótido "recombinante" está libre de secuencias internas (es decir, intrones) que se producen de forma natural en el ADN genómico del organismo del que se deriva el polinucleótido. Un ejemplo típico de este tipo de polinucleótidos es el denominado ADN complementario (ADNc).

Un ácido nucleico (o ADN) aislado o recombinante se utiliza aquí para referirse a un ácido nucleico (o ADN) que ya no se encuentra en su entorno natural, por ejemplo en una célula huésped bacteriana o vegetal *in vitro* o recombinante. En algunas realizaciones, un ácido nucleico aislado o recombinante está libre de secuencias (preferiblemente secuencias codificadoras de proteínas) que flanquean naturalmente al ácido nucleico (es decir, secuencias situadas en los extremos 5' y 3' del ácido nucleico) en el ADN genómico del organismo del que se deriva el ácido nucleico. A efectos de la invención, "aislado" cuando se utiliza para referirse a moléculas de ácido nucleico excluye los cromosomas aislados. Por ejemplo, en diversas realizaciones, la molécula de ácido nucleico codificante de delta-endotoxina aislada puede contener menos de aproximadamente 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2 kb, 1 kb, 0,5 kb o 0,1 kb de secuencias de nucleótidos que flanquean naturalmente la molécula de ácido nucleico en el ADN genómico de la célula de la que se deriva el ácido nucleico. En diversas realizaciones, una proteína delta-endotoxina que está sustancialmente libre de material celular incluye preparaciones de proteína que tienen menos de aproximadamente 30%, 20%, 10% o 5% (en peso seco) de proteína no delta-endotoxina (también denominada en el presente documento "proteína contaminante"). Según la divulgación, el ácido nucleico recombinante de la invención comprende una o más sustituciones nucleotídicas relativas a SEQ ID NO: 1, o una variante o fragmento del mismo.

Las secuencias de nucleótidos que codifican las proteínas de la presente invención incluyen la secuencia establecida en SEQ ID NO:2 o 3, y sus variantes, fragmentos y complementos. Por "complemento" se entiende una secuencia de nucleótidos que es lo suficientemente complementaria a una secuencia de nucleótidos dada como para poder hibridarse con la secuencia de nucleótidos dada y formar así un dúplex estable. Las correspondientes secuencias de aminoácidos para las proteínas pesticidas codificadas por estas secuencias nucleotídicas se exponen en SEQ ID NO:4 o 5.

Las moléculas de ácido nucleico que son fragmentos de estas secuencias de nucleótidos que codifican proteínas pesticidas también están comprendidas en la presente divulgación. Por "fragmento" se entiende una porción de la secuencia de nucleótidos que codifica una proteína pesticida. Un fragmento de una secuencia de nucleótidos puede

codificar una porción biológicamente activa de una proteína plaguicida, o puede ser un fragmento que pueda utilizarse como sonda de hibridación o cebador de PCR utilizando los procedimientos que se describen a continuación. Las moléculas de ácido nucleico que son fragmentos de una secuencia nucleotídica que codifica una proteína plaguicida comprenden al menos unos 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1350, 1400 nucleótidos contiguos, o hasta el número de nucleótidos presentes en una secuencia nucleotídica de longitud completa que codifica una proteína plaguicida divulgada en el presente documento, dependiendo del uso previsto. Por nucleótidos "contiguos" se entienden los residuos nucleotídicos que son inmediatamente adyacentes entre sí. Los fragmentos de las secuencias nucleotídicas de la presente invención codificarán fragmentos proteicos que conserven la actividad biológica de la proteína plaguicida y, por tanto, conserven la actividad plaguicida. Por lo tanto, también se incluyen los fragmentos biológicamente activos de los polipéptidos aquí descritos. Por "conserva la actividad" se entiende que el fragmento tendrá al menos alrededor del 30%, al menos alrededor del 50%, al menos alrededor del 70%, 80%, 90%, 95% o más de la actividad plaguicida de la proteína plaguicida. En una realización, la actividad pesticida es coleopterica. En otra realización, la actividad pesticida es lepidopterica. En otra realización, la actividad pesticida es nematocida. En otra realización, la actividad pesticida es la actividad dipterica. Los procedimientos para medir la actividad pesticida son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Czaplá y Lang (1990) *J. Econ. Entomol.* 83:2480-2485; Andrews *et al.* (1988) *Biochem.* 34, 252, 199-206, B. Zeynidazeh *et al.*, (1985) *J. of Economic Entomology* 78:290-293y Patente estadounidense nº 5.743.477.

Un fragmento de una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína pesticida que codifica una porción biológicamente activa de una proteína según la divulgación codificará al menos unos 15, 25, 30, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 400, 450 aminoácidos contiguos, o hasta el número total de aminoácidos presentes en una proteína pesticida de longitud completa de la invención. En algunos aspectos de la divulgación, el fragmento es un fragmento de escisión proteolítica. Por ejemplo, el fragmento de escisión proteolítica puede tener un truncamiento N-terminal o C-terminal de al menos unos 100 aminoácidos, unos 120, unos 130, unos 140, unos 150 o unos 160 aminoácidos en relación con SEQ ID NO:4-11. En algunos aspectos de la divulgación, los fragmentos aquí divulgados resultan de la eliminación del dominio de cristalización C-terminal, por ejemplo, por proteólisis o por inserción de un codón de parada en la secuencia codificante.

En diversas realizaciones, el ácido nucleico de la invención comprende un ácido nucleico degenerado de cualquiera de las SEQ ID NO:2 o 3, en las que dicha secuencia de nucleótidos degenerada codifica la misma secuencia de aminoácidos que cualquiera de las SEQ ID NO:4 o 5.

Las proteínas pesticidas preferidas de la presente invención están codificadas por una secuencia de nucleótidos suficientemente idéntica a la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:2 o 3, o las proteínas pesticidas son suficientemente idénticas a la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO:4 o 5. Por "suficientemente idéntica" se entiende una secuencia de aminoácidos o nucleótidos que tiene al menos aproximadamente un 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad de secuencia comparada con una secuencia de referencia utilizando uno de los programas de alineación descritos en el presente documento utilizando parámetros estándar. Un experto en la materia reconocerá que estos valores pueden ajustarse adecuadamente para determinar la identidad correspondiente de las proteínas codificadas por dos secuencias de nucleótidos teniendo en cuenta la degeneración de codones, la similitud de aminoácidos, el posicionamiento del marco de lectura y similares.

Para determinar el porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos o de dos ácidos nucleicos, las secuencias se alinean con fines de comparación óptima. El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, porcentaje de identidad = número de posiciones idénticas/número total de posiciones (por ejemplo, posiciones solapadas) x 100). En una realización, las dos secuencias tienen la misma longitud. En otra realización, el porcentaje de identidad se calcula a través de la totalidad de la secuencia de referencia (es decir, la secuencia divulgada en el presente documento como cualquiera de SEQ ID NO: 2-5). El porcentaje de identidad entre dos secuencias puede determinarse utilizando técnicas similares a las descritas a continuación, con o sin permitir huecos. Para calcular el porcentaje de identidad, normalmente se cuentan las coincidencias exactas. Un hueco, es decir, una posición en un alineamiento en la que un residuo está presente en una secuencia pero no en la otra, se considera una posición con residuos no idénticos.

La determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias puede realizarse mediante un algoritmo matemático. Un ejemplo no limitativo de algoritmo matemático utilizado para comparar dos secuencias es el algoritmo de Karlin y Altschul (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 87:2264 modificado como en Karlin y Altschul (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* (5873) 5877. Este algoritmo se ha incorporado a los programas BLASTN y BLASTX de Altschul *et al.* 1990, *Mol. Biol.*, 215:403. Se pueden realizar búsquedas de nucleótidos BLAST con el programa BLASTN, puntuación = 100, longitud de palabra = 12, para obtener secuencias de nucleótidos homólogas a las moléculas de ácido nucleico tipo pesticida de la invención. Se pueden realizar búsquedas de proteínas BLAST con el programa BLASTX, puntuación = 50, longitud de palabra = 3, para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a las moléculas de proteínas pesticidas de la invención. Para obtener alineaciones separadas con fines de comparación, se puede utilizar Gapped BLAST (en BLAST 2.0) como se describe en Altschul *et al.* (1997), *Nucleic Acids Res.*, 25:3389. Alternativamente, PSI-Blast puede utilizarse para realizar una búsqueda iterada que detecte relaciones distantes entre moléculas. Véase Altschul *et al.* (1997) *supra*. Al utilizar los programas BLAST,

Gapped BLAST y PSI-Blast, se pueden utilizar los parámetros por defecto de los respectivos programas (por ejemplo, BLASTX y BLASTN). La alineación también puede realizarse manualmente mediante inspección.

Otro ejemplo no limitativo de algoritmo matemático utilizado para la comparación de secuencias es el algoritmo ClustalW (Higgins et al. (1994), *Nucleic Acids Res.*, 22, 4673-4680). ClustalW compara secuencias y alinea la totalidad de la secuencia de aminoácidos o ADN, por lo que puede proporcionar datos sobre la conservación de la secuencia de aminoácidos completa. El algoritmo ClustalW se utiliza en varios paquetes de software de análisis de ADN/aminoácidos disponibles en el mercado, como el módulo ALIGNX del Vector NTI Program Suite (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA). Tras alinear las secuencias de aminoácidos con ClustalW, puede evaluarse el porcentaje de identidad de aminoácidos. Un ejemplo no limitativo de un programa de software útil para el análisis de alineaciones ClustalW es GENEDOC™. GENEDOC™ (Karl Nicholas) permite evaluar la similitud e identidad de aminoácidos (o ADN) entre múltiples proteínas. Otro ejemplo no limitativo de algoritmo matemático utilizado para la comparación de secuencias es el algoritmo de Myers y Miller (1988) CABIOS 4:11-17. Dicho algoritmo está incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0), que forma parte del paquete de software GCG Wisconsin Genetics, versión 10 (disponible en Accelrys, Inc., 9685 Scranton Rd., San Diego, CA, EE.UU.). Cuando se utiliza el programa ALIGN para comparar secuencias de aminoácidos, se puede utilizar una tabla de residuos de peso PAM120, una penalización de longitud de hueco de 12 y una penalización de hueco de 4.

A menos que se indique lo contrario, la versión 10 de GAP, que utiliza el algoritmo de Needleman y Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.*, 48(3):443-453 para determinar la identidad o similitud de secuencias utilizando los siguientes parámetros: % de identidad y % de similitud para una secuencia de nucleótidos utilizando un peso GAP de 50 y un peso de longitud de 3, y la matriz de puntuación nwsgapdna.cmp; % de identidad o % de similitud para una secuencia de aminoácidos utilizando un peso GAP de 8 y un peso de longitud de 2, y el programa de puntuación BLOSUM62. También pueden utilizarse programas equivalentes. Por "programa equivalente" se entiende cualquier programa de comparación de secuencias que, para dos secuencias cualesquiera en cuestión, genere un alineamiento que tenga idénticas coincidencias de residuos nucleotídicos y un idéntico porcentaje de identidad de secuencia cuando se compara con el correspondiente alineamiento generado por la versión 10 de GAP.

La invención también abarca moléculas de ácido nucleico variantes. Las "variantes" de las secuencias de nucleótidos que codifican las proteínas plaguicidas incluyen aquellas secuencias que codifican las proteínas plaguicidas divulgadas en el presente documento pero que difieren de forma conservadora debido a la degeneración del código genético, así como aquellas que son suficientemente idénticas como se ha comentado anteriormente. Las variantes alélicas de origen natural pueden identificarse con el uso de técnicas de biología molecular bien conocidas, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y las técnicas de hibridación que se describen a continuación. Las secuencias de nucleótidos variantes también incluyen secuencias de nucleótidos derivadas sintéticamente que se han generado, por ejemplo, utilizando mutagénesis dirigida al sitio pero que aún codifican las proteínas plaguicidas divulgadas en la presente invención como se discute a continuación. Las proteínas variantes abarcadas por la presente invención son biológicamente activas, es decir, siguen poseyendo la actividad biológica deseada de la proteína nativa, es decir, actividad plaguicida. Por "conserva la actividad" se entiende que la variante tendrá al menos alrededor del 30%, al menos alrededor del 50%, al menos alrededor del 70% o al menos alrededor del 80% de la actividad plaguicida de la proteína nativa. Los procedimientos para medir la actividad plaguicida son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Czaplá y Lang (1990) *J. Econ. Entomol.* 83: 2480-2485), Newman et al. (1988) *Biochem.* 34, 252, 199-206, B. Zeynidazeh *et al.*, (1985) *J. of Economic Entomology* 78:290-293y Patente estadounidense nº 5.743.477.

El experto en la materia apreciará además que pueden introducirse cambios por mutación de las secuencias de nucleótidos de la invención, dando lugar a cambios en la secuencia de aminoácidos de las proteínas plaguicidas codificadas, sin alterar la actividad biológica de las proteínas. Así, pueden crearse moléculas de ácido nucleico aisladas variantes introduciendo una o más sustituciones, adiciones o supresiones de nucleótidos en la correspondiente secuencia de nucleótidos divulgada en el presente documento, de manera que se introduzcan una o más sustituciones, adiciones o supresiones de aminoácidos en la proteína codificada. Las mutaciones pueden introducirse mediante técnicas estándar, como la mutagénesis dirigida al sitio y la mutagénesis mediada por PCR. Estas secuencias de nucleótidos variantes también se incluyen en la presente invención.

Por ejemplo, se pueden realizar sustituciones conservadoras de aminoácidos en uno o más residuos de aminoácidos no esenciales previstos. Un residuo de aminoácido "no esencial" es un residuo que puede alterarse de la secuencia de tipo salvaje de una proteína plaguicida sin alterar la actividad biológica, mientras que un residuo de aminoácido "esencial" es necesario para la actividad biológica. Una "sustitución conservadora de aminoácidos" es aquella en la que el residuo de aminoácido se sustituye por un residuo de aminoácido con una cadena lateral similar. En la técnica se han definido familias de residuos de aminoácidos con cadenas laterales similares. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales beta-ramificadas (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina).

- Las delta-endotoxinas 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 consta de siete hélices alfa y participa en la inserción en la membrana y la formación de poros. El dominio II consta de tres hojas beta dispuestas en una configuración de llave griega, y el dominio III consta de dos hojas beta antiparalelas en formación de "jelly-roll" (de Maagd *et al.*, 2001, *supra*). Los dominios II y III intervienen en el reconocimiento y la unión al receptor, por lo que se consideran determinantes de la especificidad de la toxina.
- Las sustituciones de aminoácidos pueden realizarse en regiones no conservadas que mantienen la función. En general, tales sustituciones no se harían para residuos de aminoácidos conservados, o para residuos de aminoácidos que residan dentro de un motivo conservado, cuando tales residuos sean esenciales para la actividad de la proteína. Ejemplos de residuos que se conservan y que pueden ser esenciales para la actividad de la proteína incluyen, por ejemplo, residuos que son idénticos entre todas las proteínas contenidas en un alineamiento de toxinas similares o relacionadas con las secuencias de la invención (por ejemplo, residuos que son idénticos en un alineamiento de proteínas homólogas). Ejemplos de residuos que se conservan pero que pueden permitir sustituciones conservadoras de aminoácidos y aún retener la actividad incluyen, por ejemplo, residuos que sólo tienen sustituciones conservadoras entre todas las proteínas contenidas en un alineamiento de toxinas similares o relacionadas con las secuencias de la invención (por ejemplo, residuos que sólo tienen sustituciones conservadoras entre todas las proteínas contenidas en el alineamiento proteínas homólogas). Sin embargo, un experto en la materia entendería que las variantes funcionales pueden tener pequeñas alteraciones conservadas o no conservadas en los residuos conservados.
- Alternativamente, las secuencias de nucleótidos variantes se pueden hacer mediante la introducción de mutaciones al azar a lo largo de la totalidad o parte de la secuencia de codificación, como por mutagénesis de saturación, y los mutantes resultantes pueden ser examinados para la capacidad de conferir actividad pesticida para identificar mutantes que retienen la actividad. Tras la mutagénesis, la proteína codificada puede expresarse de forma recombinante, y la actividad de la proteína puede determinarse mediante técnicas de ensayo estándar.
- Utilizando procedimientos como la hibridación por PCR, y similares, pueden identificarse secuencias pesticidas correspondientes, teniendo dichas secuencias una identidad sustancial con las secuencias de la invención y teniendo o confiriendo actividad pesticida. Véase, por ejemplo, Sambrook y Russell (2001) Molecular Cloning: Manual de laboratorio. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY) y Innis, et al. (1990) Protocolos PCR: A Guide to Methods and Applications (Academic Press, NY).
- En un procedimiento de hibridación, toda o parte de la secuencia de nucleótidos del pesticida puede utilizarse para cribar bibliotecas de ADNc o genómicas. Los procedimientos para la construcción de tales bibliotecas de ADNc y genómicas son generalmente conocidos en la técnica y se divulgan en Sambrook y Russell, 2001, *supra*. Las denominadas sondas de hibridación pueden ser fragmentos de ADN genómico, fragmentos de ADNc, fragmentos de ARN u otros oligonucleótidos, y pueden estar marcadas con un grupo detectable, como <sup>32</sup>P, o cualquier otro marcador detectable, como otros radioisótopos, un compuesto fluorescente, una enzima o un cofactor enzimático. Las sondas para la hibridación pueden fabricarse marcando oligonucleótidos sintéticos basados en la secuencia conocida de nucleótidos codificantes de proteínas plaguicidas divulgada en el presente documento. También pueden utilizarse cebadores degenerados diseñados a partir de nucleótidos o residuos de aminoácidos conservados en la secuencia de nucleótidos o la secuencia de aminoácidos codificada. La sonda comprende típicamente una región de secuencia nucleotídica que hibrida en condiciones estrictas con al menos unos 12, al menos unos 25, al menos unos 50, 75, 100, 125, 150, 175 o 200 nucleótidos consecutivos de secuencia nucleotídica que codifica una proteína pesticida de la invención o un fragmento o variante de la misma. Los procedimientos para la preparación de sondas para hibridación son generalmente conocidos en la técnica y se divulgan en Sambrook y Russell, 2001, *supra* aquí.
- Por ejemplo, una secuencia pesticida completa divulgada en el presente documento, o una o más porciones de la misma, puede utilizarse como una sonda capaz de hibridar específicamente con secuencias similares a proteínas pesticidas y ARN mensajeros correspondientes. Para lograr una hibridación específica bajo una variedad de condiciones, dichas sondas incluyen secuencias que son únicas y preferiblemente tienen al menos unos 10 nucleótidos de longitud, o al menos unos 20 nucleótidos de longitud. Dichas sondas pueden utilizarse para amplificar las secuencias pesticidas correspondientes a partir de un organismo o muestra elegidos mediante PCR. Esta técnica puede utilizarse para aislar secuencias codificantes adicionales de un organismo deseado o como ensayo de diagnóstico para determinar la presencia de secuencias codificantes en un organismo. Las técnicas de hibridación incluyen el cribado por hibridación de bibliotecas de ADN en placas (ya sean placas o colonias; véase, por ejemplo, Sambrook et al. (1989) Clonación molecular: A laboratory manual, 3ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY,
- Así, la presente divulgación abarca sondas para hibridación, así como secuencias de nucleótidos capaces de hibridar con toda o una parte de una secuencia de nucleótidos de la invención (por ejemplo, al menos unos 300 nucleótidos, al menos unos 400, al menos unos 500, 1000, 1200, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, o hasta la longitud completa de una secuencia de nucleótidos divulgada en el presente documento). La hibridación de tales secuencias puede llevarse a cabo en condiciones estrictas. Por "condiciones estrictas" o "condiciones estrictas de hibridación" se entienden las condiciones en las que una sonda se hibridará con su secuencia diana en un grado

detectablemente mayor que con otras secuencias (por ejemplo, al menos 2 veces por encima del fondo). Las condiciones estrictas dependen de la secuencia y serán distintas en circunstancias diferentes. Controlando la rigurosidad de la hibridación y/o las condiciones de lavado, pueden identificarse secuencias diana 100% complementarias a la sonda (sondeo homólogo). Alternativamente, las condiciones de rigurosidad pueden ajustarse para permitir cierto desajuste en las secuencias, de modo que se detecten grados inferiores de similitud (sondeo heterólogo). Generalmente, una sonda tiene menos de unos 1000 nucleótidos de longitud, preferiblemente menos de 500 nucleótidos de longitud.

Típicamente, las condiciones rigurosas serán aquellas en las que la concentración de sal es inferior a aproximadamente 1,5 M de ión Na, típicamente de aproximadamente 0,01 a 1,0 M de concentración de ión Na (u otras sales) a pH 7,0 a 8,3 y la temperatura es de al menos aproximadamente 30°C para sondas cortas (por ejemplo, de 10 a 50 nucleótidos) y de al menos aproximadamente 60°C para sondas largas (por ejemplo, superiores a 50 nucleótidos). También pueden conseguirse condiciones más estrictas añadiendo agentes desestabilizadores como la formamida. Las condiciones ejemplares de baja rigurosidad incluyen la hibridación con una solución tampón de 30 a 35% de formamida, 1 M de NaCl, 1% de SDS (dodecil sulfato sódico) a 37°C, y un lavado en 1X a 2X SSC (20X SSC = 3,0 M de NaCl/0,3 M de citrato trisódico) a 50 a 55°C. Un ejemplo de condiciones de rigor moderado incluye la hibridación en formamida al 40-45%, NaCl 1,0 M, SDS al 1% a 37°C, y un lavado en SSC de 0,5X a 1X a 55-60°C. Las condiciones ejemplares de alta rigurosidad incluyen hibridación en 50% de formamida, 1 M de NaCl, 1% de SDS a 37°C, y un lavado en SSC 0,1X a 60 a 65°C. Opcionalmente, los tampones de lavado pueden contener entre un 0,1% y un 1% de SDS. La duración de la hibridación es generalmente inferior a unas 24 horas, normalmente de unas 4 a unas 12 horas.

La especificidad es típicamente función de los lavados posteriores a la hibridación, siendo los factores críticos la fuerza iónica y la temperatura de la solución final de lavado. Para los híbridos ADN-ADN, la  $T_m$  puede aproximarse a partir de la ecuación de Meinkoth y Wahl (1984) Anal. Biochem. 138, 267-284.  $M$  es la molaridad de los cationes monovalentes, % de GC es el porcentaje de nucleótidos de guanosina y citosina en el tramo de ADN, % de forma es el porcentaje de formamida en la solución de hibridación, y  $L$  es la longitud del híbrido en pares de bases. La  $T_m$  es la temperatura (con una fuerza iónica y un pH definidos) a la que el 50% de una secuencia diana complementaria se hibrida con una sonda perfectamente adaptada. La  $T_m$  se reduce aproximadamente 1°C por cada 1% de desajuste; por lo tanto, la  $T_m$ , la hibridación y/o las condiciones de lavado pueden ajustarse para hibridar con secuencias de la identidad deseada. Por ejemplo, si se buscan secuencias con  $\geq 90\%$  de identidad, la  $T_m$  puede disminuirse 10°C. En general, las condiciones estrictas se seleccionan para que sean unos 5 °C más bajas que el punto de fusión térmica ( $T_m$ ) para la secuencia específica y su complemento a una fuerza iónica y un pH definidos. Sin embargo, las condiciones severamente rigurosas pueden utilizar una hibridación y/o lavado a 1, 2, 3 o 4°C por debajo del punto de fusión térmica ( $T_m$ ); las condiciones moderadamente rigurosas pueden utilizar una hibridación y/o lavado a 6, 7, 8, 9 o 10°C por debajo del punto de fusión térmica ( $T_m$ ); las condiciones de baja rigurosidad pueden utilizar una hibridación y/o lavado a 11, 12, 13, 14, 15 o 20°C por debajo del punto de fusión térmica ( $T_m$ ). Utilizando la ecuación, las composiciones de hibridación y lavado, y la  $T_m$  deseada, los expertos comprenderán que las variaciones en la rigurosidad de las soluciones de hibridación y/o lavado se describen de forma inherente. Si el grado de desajuste deseado da como resultado una  $T_m$  inferior a 45°C (solución acuosa) o 32°C (solución de formamida), se prefiere aumentar la concentración de CSS para poder utilizar una temperatura más elevada. Una extensa guía sobre la hibridación de ácidos nucleicos se encuentra en Tijssen (1993) Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid Probes, Part I, Chapter 2 (Elsevier, New York); y Ausubel et al., eds. (1995) Current Protocols in Molecular Biology, Capítulo 2 (Greene Publishing y Wiley-Interscience, Nueva York). Véase también Sambrook *et al.* (1989) Clonación molecular: A laboratory manual, 3ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY,

#### 45 Proteínas aisladas y variantes y fragmentos de las mismas

Las proteínas pesticidas también se incluyen en la presente invención. Por "proteína pesticida" se entiende una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 4 o 5. También se proporcionan fragmentos, porciones biológicamente activas y variantes de los mismos, que pueden utilizarse para poner en práctica los procedimientos de la presente invención. Una "proteína aislada" o una "proteína recombinante" se utiliza para referirse a una proteína que ya no se encuentra en su entorno natural, por ejemplo in vitro o en una célula huésped bacteriana o vegetal recombinante. En algunas realizaciones, la proteína recombinante es una variante de SEQ ID NO: 4 o 5, en la que la variante comprende al menos una sustitución, delección o inserción de aminoácidos con respecto a SEQ ID NO: 4 o 5.

Los "fragmentos" o "porciones biológicamente activas" incluyen fragmentos polipeptídicos que comprenden secuencias de aminoácidos suficientemente idénticas a la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 4 o 5, y que exhiben actividad pesticida. Una porción biológicamente activa de una proteína pesticida según la divulgación puede ser un polipéptido que tenga, por ejemplo, 10, 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1050, 1100, 1150, 1200, 1250, 1300, 1350, o más aminoácidos de longitud. Estas porciones biológicamente activas pueden prepararse mediante técnicas recombinantes y evaluarse para determinar su actividad plaguicida. Los procedimientos para medir la actividad pesticida son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Czaplá y Lang (1990) J. Econ. Entomol. 83-

2485), Newman et al. (1988) Biochem. 34, 252, 199-206, B. Zeynidazeh *et al.*, (1985) J. of Economic Entomology 78:290-293y Patente estadounidense nº 5.743.477. Como se utiliza aquí, un fragmento comprende al menos 8 aminoácidos contiguos de SEQ ID NO: 4 o 5. Sin embargo, la divulgación abarca otros fragmentos, como cualquier fragmento de la proteína de más de 10, 20, 30, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1050, 1100, 1150, 1200, 1250, 1300, 1350 o más aminoácidos de longitud.

Por "variantes" se entiende proteínas o polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO:4 o 5. Las variantes según la divulgación también incluyen polipéptidos codificados por una molécula de ácido nucleico que hibrida con la molécula de ácido nucleico de SEQ ID NO: 2 o 3, o un complemento de la misma, en condiciones estrictas. Las variantes incluyen polipéptidos que difieren en la secuencia de aminoácidos debido a la mutagénesis. Las proteínas variantes abarcadas por la presente invención son biológicamente activas, es decir, siguen poseyendo la actividad biológica deseada de la proteína nativa, es decir, conservando la actividad pesticida. En algunas realizaciones, las variantes tienen una actividad mejorada en relación con la proteína nativa. Los procedimientos para medir la actividad pesticida son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Czaplá y Lang (1990) J. Econ. Entomol. 83-2485; Lenihan et al. (1988) Biochem. 34, 252, 199-206, B. Zeynidazeh *et al.*, (1985) J. of Economic Entomology 78:290-293y Patente estadounidense nº 5.743.477.

Los genes bacterianos, como los genes *axmi* de esta invención, a menudo poseen múltiples codones de iniciación de metionina en proximidad al comienzo del marco de lectura abierto. A menudo, la iniciación de la traducción en uno o más de estos codones de arranque conducirá a la generación de una proteína funcional. Estos codones de inicio pueden incluir codones ATG. Sin embargo, bacterias como *Bacillus sp.* también reconocen el codón GTG como codón de inicio, y las proteínas que inician la traducción en codones GTG contienen una metionina en el primer aminoácido. En raras ocasiones, la traducción en sistemas bacterianos puede iniciarse en un codón TTG, aunque en este caso el TTG codifica una metionina. Además, no suele determinarse *a priori* cuáles de estos codones se utilizan de forma natural en la bacteria. Así, se entiende que el uso de uno de los codones alternativos de metionina también puede conducir a la generación de proteínas pesticidas. Estas proteínas pesticidas están incluidas en la presente invención y pueden utilizarse en los procedimientos de la presente invención. Se entenderá que, cuando se exprese en plantas, será necesario alterar el codón de inicio alternativo a ATG para una traducción adecuada.

En varias realizaciones de la presente invención, las proteínas pesticidas incluyen secuencias de aminoácidos deducidas de las secuencias de nucleótidos de longitud completa divulgadas en el presente documento, y secuencias de aminoácidos que son más cortas que las secuencias de longitud completa debido al uso de un sitio de inicio alternativo aguas abajo. Así, la secuencia de nucleótidos de la invención y/o los vectores, células huésped y plantas que comprenden la secuencia de nucleótidos de la invención (y los procedimientos de fabricación y uso de la secuencia de nucleótidos de la invención) pueden comprender una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos correspondiente a SEQ ID NO: 5.

También se incluyen los anticuerpos contra los polipéptidos de la presente invención, o contra variantes o fragmentos de los mismos. Los procedimientos para producir anticuerpos son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Harlow y Lane (1988) Anticuerpos: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY; Patente de EE.UU. nº 4.196.265).

Así, un aspecto de la divulgación se refiere a anticuerpos, moléculas de unión a antígeno de cadena simple u otras proteínas que se unen específicamente a una o más de las moléculas proteicas o peptídicas de la invención y sus homólogos, fusiones o fragmentos. En particular, el anticuerpo se une específicamente a una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 4 o 5 o un fragmento de la misma. En otro aspecto de la divulgación, el anticuerpo se une específicamente a una proteína de fusión que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 4 o 5 o un fragmento de la misma. En varios aspectos de la divulgación, el anticuerpo que se une específicamente a la proteína de la invención o a una proteína de fusión que comprende la proteína de la invención es un anticuerpo no natural.

Los anticuerpos de la divulgación pueden utilizarse para detectar cuantitativa o cualitativamente las moléculas proteicas o peptídicas de la invención, o para detectar modificaciones postraduccionales de las proteínas. Tal como se utiliza en el presente documento, se dice que un anticuerpo o péptido se "une específicamente" a una molécula proteica o peptídica de la invención si dicha unión no se inhibe competitivamente por la presencia de moléculas no relacionadas.

Los anticuerpos de la divulgación pueden estar contenidos en un kit útil para la detección de las moléculas proteicas o peptídicas de la invención. La divulgación comprende además un procedimiento de detección de la molécula proteica o peptídica de la invención (particularmente una proteína codificada por la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 4 o 5, incluyendo variantes o fragmentos de la misma que son capaces de unirse específicamente al anticuerpo de la divulgación) que comprende poner en contacto una muestra con el anticuerpo y determinar si la muestra contiene la molécula proteica o peptídica de la invención. Los procedimientos para utilizar anticuerpos para la detección de una proteína o péptido de interés son conocidos en la técnica.

Variantes alteradas o mejoradas

Se reconoce que las secuencias de ADN de una proteína pesticida pueden alterarse por diversos procedimientos, y que estas alteraciones pueden dar lugar a secuencias de ADN que codifican proteínas con secuencias de aminoácidos diferentes de la codificada por una proteína pesticida de la presente invención. Esta proteína puede alterarse de varias maneras, incluyendo sustituciones de aminoácidos, deleciones, truncamientos e inserciones de uno o más aminoácidos de SEQ ID NO: 4 o 5. Los procedimientos de trituración son conocidos en la técnica. Por ejemplo, se pueden preparar variantes de la secuencia de aminoácidos de una proteína pesticida mediante mutaciones en el ADN. Esto también puede lograrse mediante una de varias formas de mutagénesis y/o en la evolución dirigida. En algunos aspectos, los cambios codificados en la secuencia de aminoácidos no afectarán sustancialmente a la función de la proteína. Tales variantes poseerán la actividad pesticida deseada. Sin embargo, se entiende que la capacidad de una proteína plaguicida para conferir actividad plaguicida puede mejorarse mediante el uso de dichas técnicas en las composiciones de la presente invención. Por ejemplo, se puede expresar una proteína pesticida en células huésped que presenten altas tasas de desincorporación de bases durante la replicación del ADN, como XL-1 Red (Stratagene, La Jolla, CA). Tras la propagación en dichas cepas, se puede aislar el ADN (por ejemplo, preparando ADN plasmídico, o amplificando por PCR y clonando el fragmento de PCR resultante en un vector), cultivar las mutaciones de la proteína pesticida en una cepa no mutagénica, e identificar los genes mutados con actividad pesticida, por ejemplo, realizando un ensayo para comprobar la actividad pesticida. Generalmente, la proteína se mezcla y se utiliza en ensayos de alimentación. Véase, por ejemplo Marrone et al. (1985) J. of Economic Entomology 78:290-293. Dichos ensayos pueden incluir el contacto de las plantas con una o más plagas y la determinación de la capacidad de la planta para sobrevivir y/o causar la muerte de las plagas. Ejemplos de mutaciones que provocan un aumento de la toxicidad se encuentran en Schnepf et al. (1998) Microbiol. (J Mol. Biol., 286(62):775-806.

Alternativamente, se pueden realizar alteraciones en la secuencia proteica de muchas proteínas en el extremo amino o carboxi sin afectar sustancialmente a la actividad. Esto puede incluir inserciones, deleciones o alteraciones introducidas por procedimientos moleculares modernos, como la PCR, incluidas las ampliaciones por PCR que alteran o amplían la secuencia codificadora de proteínas en virtud de la inclusión de secuencias codificadoras de aminoácidos en los oligonucleótidos utilizados en la amplificación por PCR. Alternativamente, las secuencias de proteínas añadidas pueden incluir secuencias completas de codificación de proteínas, como las utilizadas habitualmente en la técnica para generar fusiones de proteínas. Dichas proteínas de fusión se utilizan a menudo 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 proteínas, la detección de proteínas u otros usos experimentales conocidos en la técnica (3) dirigir la secreción o traducción de una proteína a un orgánulo subcelular, como el espacio periplásmico de las bacterias Gram negativas o el retículo endoplásmico de las células eucariotas, lo que a menudo da lugar a la glicosilación de la proteína.

Las secuencias variantes de nucleótidos y aminoácidos de la presente invención también abarcan secuencias derivadas de procedimientos mutagénicos y recombinogénicos como la mezcla de ADN. Con este procedimiento, se pueden utilizar una o más regiones codificantes de proteínas plaguicidas diferentes para crear una nueva proteína plaguicida que posea las propiedades deseadas. De esta manera, las bibliotecas de polinucleótidos recombinantes se generan a partir de una población de polinucleótidos de secuencias relacionadas que comprenden regiones de secuencias que tienen una identidad de secuencia sustancial y pueden recombinarse homológamente *in vitro* o *in vivo*. Por ejemplo, utilizando este enfoque, los motivos de secuencia que codifican un dominio de interés pueden barajarse entre un gen plaguicida de la invención y otros genes plaguicidas conocidos para obtener un nuevo gen que codifique una proteína con una propiedad mejorada de interés, como una mayor actividad insecticida. Las estrategias para barajar el 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; Cramer et al. (1997) Nature Biotech. 15:438), Newman et al. 1997, Mol. Biol., 272-347; Lenihan et al. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. 34, 94, 4504-4509, B. Zeynidazeh et al., (1998) Nature 391:288-291 y Patentes estadounidenses nº 5.605.793 y 5,837,458.

El intercambio o barajado de dominios es otro mecanismo para generar proteínas pesticidas alteradas. Se pueden intercambiar dominios entre proteínas plaguicidas, lo que da lugar a toxinas híbridas o quiméricas con una actividad plaguicida o un espectro diana mejorados. Los procedimientos para generar proteínas recombinantes y probar su actividad pesticida son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Naimov et al. (2001) Appl. Environ. Microbiol., 67-5330; Lenihan et al. (1996) Appl. Environ. Microbiol., 62-1543), Newman et al. (1991), J. Virol. Química. 266-17958), Newman et al. (1990), J. Virol. Química. 265-20930), Newman et al. 91999) Appl. Environ. Microbiol., 65, 2918-2925).

En otra realización, las secuencias variantes de nucleótidos y/o aminoácidos pueden obtenerse utilizando una o más de las siguientes técnicas: PCR propensa a errores, mutagénesis dirigida por oligonucleótidos, PCR de ensamblaje, mutagénesis sexual por PCR, mutagénesis *in vivo*, mutagénesis en casete, mutagénesis recursiva por ensamblaje, mutagénesis exponencial por ensamblaje, mutagénesis específica de sitio, reensamblaje génico, mutagénesis de saturación de sitio génico, mutagénesis permutacional, reensamblaje de ligamiento sintético (SLR), recombinación, recombinación recursiva de secuencias, mutagénesis de ADN modificado con fosfotioato, mutagénesis de plantillas que contienen uracilo, mutagénesis de dúplex con huecos, mutagénesis de reparación de desajustes puntuales, mutagénesis de cepas hospedadoras deficientes en reparación, mutagénesis química, mutagénesis radiogénica, mutagénesis de deleción, mutagénesis de selección por restricción, mutagénesis de purificación por restricción,

síntesis de genes artificiales, mutagénesis de conjuntos, creación de multímeros de ácidos nucleicos quiméricos y similares.

### Vectores

5 Una secuencia pesticida de la invención puede proporcionarse en un casete de expresión para su expresión en una célula huésped de interés, por ejemplo, una célula vegetal o un microbio. Por "casete de expresión vegetal" se entiende una construcción de ADN capaz de dar lugar a la expresión de una proteína a partir de un marco de lectura abierto en una célula vegetal. Normalmente contienen un promotor y una secuencia codificadora. A menudo, estas construcciones también contienen una región 3' no traducida. Dichas construcciones pueden contener una "secuencia señal" o "secuencia líder" para facilitar el transporte cotraduccional o postraduccional del péptido a determinadas estructuras intracelulares como el cloroplasto (u otro plástido), el retículo endoplásmico o el aparato de Golgi.

15 Por "secuencia señal" se entiende una secuencia que se sabe o se sospecha que da lugar al transporte cotraduccional o postraduccional del péptido a través de la membrana celular. En los eucariotas, esto suele implicar la secreción en el aparato de Golgi, con la consiguiente glicosilación. Las toxinas insecticidas de las bacterias suelen sintetizarse como protoxinas, que se activan protólicamente en el intestino de la plaga objetivo (Chang (1987) Methods Enzymol. 153, 507-516). En algunas realizaciones de la presente invención, la secuencia señal se encuentra en la secuencia nativa, o puede derivarse de una secuencia de la invención. Por "secuencia líder" se entiende cualquier secuencia que, cuando se traduce, da lugar a una secuencia de aminoácidos suficiente para desencadenar el transporte cotraduccional de la cadena peptídica a un orgánulo subcelular. Así, esto incluye secuencias líder dirigidas al transporte y/o glicosilación por paso al retículo endoplásmico, paso a vacuolas, plástidos incluyendo cloroplastos, mitocondrias, y similares. Por lo tanto, en el presente documento se proporciona además un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de la presente invención que está operablemente unida a una secuencia líder o señal heteróloga.

25 Por "vector de transformación vegetal" se entiende una molécula de ADN necesaria para la transformación eficiente de una célula vegetal. Dicha molécula puede consistir en uno o más casetes de expresión vegetal, y puede estar organizada en más de una molécula de ADN "vectorial". Por ejemplo, los vectores binarios son vectores de transformación de plantas que utilizan dos vectores de ADN no contiguos para codificar todas las funciones de acción cis y trans necesarias para la transformación de células vegetales (Hellens y Mullineaux (2000) Trends in Plant Science 5:446-451). "Vector" se refiere a una construcción de ácido nucleico diseñada para la transferencia entre diferentes células huésped. "Vector de expresión" se refiere a un vector que tiene la capacidad de incorporar, integrar y expresar secuencias o fragmentos de ADN heterólogo en una célula extraña. El casete incluirá secuencias reguladoras 5' y/o 3' enlazadas operablemente a una secuencia de la invención. Por "operativamente vinculada" se entiende una vinculación funcional entre un promotor y una segunda secuencia, en la que la secuencia promotora inicia y media la transcripción de la secuencia de ADN correspondiente a la segunda secuencia. Generalmente, enlazadas de forma operable significa que las secuencias de ácido nucleico enlazadas son contiguas y, cuando es necesario unir dos regiones codificantes de proteínas, contiguas y en el mismo marco de lectura. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos está operablemente unida a un promotor heterólogo capaz de dirigir la expresión de dicha secuencia de nucleótidos en una célula huésped, como una célula huésped microbiana o una célula huésped vegetal. El casete puede contener además al menos un gen adicional que se cotransformará en el organismo. Alternativamente, el gen o genes adicionales pueden proporcionarse en múltiples casetes de expresión.

45 En varias realizaciones, la secuencia de nucleótidos de la invención está operablemente unida a un promotor heterólogo capaz de dirigir la expresión de la secuencia de nucleótidos en una célula, por ejemplo, en una célula vegetal o un microbio. "Promotor" se refiere a una secuencia de ácido nucleico que funciona para dirigir la transcripción de una secuencia codificante posterior. El promotor, junto con otras secuencias de ácido nucleico reguladoras de la transcripción y la traducción (también denominadas "secuencias de control"), es necesario para la expresión de una secuencia de ADN de interés.

Tal casete de expresión está provisto de una pluralidad de sitios de restricción para la inserción de la secuencia pesticida que estará bajo la regulación transcripcional de las regiones reguladoras.

50 El casete de expresión incluirá en la dirección de transcripción 5'-3', una región de iniciación transcripcional y traslacional (es decir, un promotor), una secuencia de ADN de la invención, y una región de terminación traslacional y transcripcional (es decir, región de terminación) funcional en plantas. El promotor puede ser nativo o análogo, o extraño o heterólogo, al huésped vegetal y/o a la secuencia de ADN de la invención. Además, el promotor puede ser la secuencia natural o alternativamente una secuencia sintética. Cuando el promotor es "nativo" u "homólogo" a la planta huésped, se entiende que el promotor se encuentra en la planta nativa en la que se introduce el promotor. Cuando el promotor es "extraño" o "heterólogo" a la secuencia de ADN de la invención, se entiende que el promotor no es el promotor nativo o natural de la secuencia de ADN enlazada operablemente de la invención. El promotor puede ser inducible o constitutivo. Puede ser de origen natural, estar compuesto por porciones de varios promotores de origen natural o ser parcial o totalmente sintético. Los estudios sobre la estructura de los promotores, como el de Harley y Reynolds (1987) Nucleic Acids Res. 15, 2343-2361. Asimismo, puede optimizarse la ubicación del

promotor con respecto al inicio de la transcripción. Véase también Sambrook *et al.* (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. (760) 764: Muchos promotores adecuados para su uso en plantas son bien conocidos en la técnica.

5 Por ejemplo, los promotores constitutivos adecuados para su uso en plantas incluyen: los promotores de virus de plantas, como el promotor del caulimovirus de la raya clorótica del cacahuete (PCISV) (Pat. N° 5.850.019); el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) (Odell *et al.* (1985) Nature 313:810-812); promotores de genes de metiltransferasa del virus Chlorella (Pat. N° 5.563.328) y el promotor de transcripción de longitud completa del virus del mosaico de la higuera (FMV) (Pat. N° 5.378.619); los promotores de genes como la actina del arroz (McElroy *et al.* (1990) Plant Cell 2:163-171 y Patente estadounidense 5.641.876); ubiquitina (Christensen *et al.* 1989, Mol. Biol., 12:619-632 y Christensen *et al.* 1992, Mol. Biol., (Mosk), 18, 675-689), M.Bsp6I (Lubys *et al.*, (1991) Theor. Appl. Genet. (Mosk), 81, 581-588), M.Bsp6I (Lubys *et al.*, (1984) EMBO J. 3:2723-2730 y Patente estadounidense 5.510.474); histona H3 del maíz (Lepetit *et al.* 1992, Mol. Gen. Genet. 231:276-285 y Atanassova *et al.* (1992) Plant J. 2(3):291-300); Brassica napus ALS3 (Solicitud PCT WO97/41228); un gen de subunidad pequeña de ribulosa-biscarboxilasa/oxigenasa vegetal (RuBisCO); el circovirus (AU 689 311) o el virus del mosaico venoso de la yuca (CsVMV, US 7,053,205); y promotores de varios genes de *Agrobacterium* (véase Pat. Nos. 15 4.771.002; 5,102,796; 5,182,200 y 5,428,147).

Entre los promotores inducibles adecuados para su uso en plantas se incluyen: el promotor del sistema ACE1 que responde al cobre (Mett *et al.* (1993) PNAS 90:4567-4571); el promotor del gen In2 del maíz que responde a los herbicidas protectores bencenosulfonamida (Hershey *et al.* 1991, Mol. Gen. (Mosk), 227, 229-237), M.Bsp6I (Lubys *et al.*, 1994, Mol. Gen. Genética 243:32-38); y el promotor del represor Tet de Tn10 (Gatz *et al.* 1991, Mol. Gen. Genet. 227, 229-237). Otro promotor inducible para su uso en plantas es aquel que responde a un agente inductor al que las plantas no responden normalmente. Un promotor inducible ejemplar de este tipo es el promotor inducible de un gen de hormona esteroidea, cuya actividad transcripcional es inducida por una hormona glucocorticosteroidea (Schena *et al.* (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 88:10421) o la reciente aplicación de un activador de transcripción quimérico, XVE, para su uso en un sistema de expresión vegetal inducible basado en receptores de estrógenos y activado por estradiol (Zuo *et al.* (2000) Plant J., 24:265-273). Otros promotores inducibles para su uso en plantas se describen en el documento EP 332104, PCT WO 93/21334 y PCT WO 97/06269. También pueden utilizarse promotores compuestos por porciones de otros promotores y promotores parcial o totalmente sintéticos. Véase también Sambrook *et al.* (1995) Plant J. 7:661-676 y PCT WO 95/14098 que describen dichos promotores para su uso en plantas.

30 En una realización de esta invención, puede utilizarse una secuencia promotora específica para regiones o tejidos particulares de plantas para expresar las proteínas pesticidas de la invención, como promotores específicos para semillas (Datla, R. *et al.*, 1997, Biotechnology Ann. Rev. 3, 269-296), especialmente el promotor napina (EP 255 378 A1), el promotor de la faseolina, el promotor de la glutenina, el promotor de la heliantina (WO92/17580), el promotor de la albúmina (WO98/45460), el promotor de la oleosina (WO98/45461), el promotor SAT1 o el promotor SAT3 (PCT/US98/06978).

También puede utilizarse un promotor inducible elegido ventajosamente entre los promotores fenilalanina amonio liasa (PAL), HMG-CoA reductasa (HMG), quitinasa, glucanasa, inhibidor de proteinasa (PI), gen de la familia PR1, nopalina sintasa (nos) y vspB (US 5 670 349 tabla 3), el promotor HMG2 (US 5 670 349), el promotor de la beta-galactosidasa de la manzana (ABG1) y el promotor de la aminociclopropano carboxilato sintasa de la manzana (ACC sintasa) (WO98/45445). Pueden utilizarse múltiples promotores en las construcciones de la invención, incluso sucesivamente.

El promotor puede incluir, o modificarse para incluir, uno o más elementos potenciadores. En algunas realizaciones, el promotor puede incluir una pluralidad de elementos potenciadores. Los promotores que contienen elementos potenciadores proporcionan mayores niveles de transcripción en comparación con los promotores que no los incluyen. Los elementos potenciadores adecuados para su uso en plantas incluyen el elemento potenciador PCISV (Pat. N° 5.850.019), el elemento potenciador CaMV 35S (Pat. Nos. 5.106.739 y 5,164,316) y el elemento potenciador FMV (Maiti *et al.* (1997) Transgenic Res. 6:143-156); el activador de la traducción del virus del mosaico del tabaco (TMV) descrito en la solicitud WO87/076440 del virus del grabado del tabaco (TEV) descrito en Carrington & Freed 1990, J. Virol. 64: 1590-1597 por ejemplo, o intrones como el intrón adh1 del maíz o el intrón 1 de la actina del arroz. Véase también PCT WO96/23898, WO2012/021794, WO2012/021797, WO2011/084370 y WO2011/028914.

A menudo, dichas construcciones pueden contener regiones no traducidas 5' y 3'. Dichas construcciones pueden contener una "secuencia señal" o "secuencia líder" para facilitar el transporte cotraduccional o postraduccional del péptido de interés a determinadas estructuras intracelulares como el cloroplasto (u otro plástido), el retículo endoplásmico o el aparato de Golgi, o para ser secretado. Por ejemplo, la construcción puede diseñarse para que contenga un péptido señal que facilite la transferencia del péptido al retículo endoplásmico. Por "secuencia señal" se entiende una secuencia que se sabe o se sospecha que provoca el transporte cotraduccional o postraduccional del péptido a través de la membrana celular. En los eucariotas, esto suele implicar la secreción en el aparato de Golgi, con la consiguiente glicosilación. Por "secuencia líder" se entiende cualquier secuencia que, cuando se traduce, da lugar a una secuencia de aminoácidos suficiente para desencadenar el transporte cotraduccional de la cadena peptídica a un orgánulo subcelular. Así, esto incluye secuencias líder dirigidas al transporte y/o glicosilación por paso

al retículo endoplásmico, paso a vacuolas, plástidos incluyendo cloroplastos, mitocondrias, y similares. También puede ser preferible diseñar el casete de expresión de la planta para que contenga un intrón, de forma que se requiera el procesamiento del ARNm del intrón para la expresión.

5 Por "región no traducida 3'" se entiende un polinucleótido situado aguas abajo de una secuencia codificante. Las secuencias señal de poliadenilación y otras secuencias que codifican señales reguladoras capaces de afectar a la adición de tramos de ácido poliadenílico al extremo 3' del precursor del ARNm son regiones 3' no traducidas. Por "región no traducida 5'" se entiende un polinucleótido situado aguas arriba de una secuencia codificante.

10 Otros elementos no traducidos aguas arriba o aguas abajo incluyen potenciadores. Los potenciadores son polinucleótidos que actúan para aumentar la expresión de una región promotora. Los potenciadores son bien conocidos en la técnica e incluyen, entre otros, la región potenciadora SV40 y el elemento potenciador 35S.

15 La región de terminación puede ser nativa con la región de iniciación transcripcional, puede ser nativa con la secuencia de ADN de interés enlazada operablemente, puede ser nativa con la planta huésped, o puede derivarse de otra fuente (es decir, ajena o heteróloga al promotor, la secuencia de ADN de interés, la planta huésped, o cualquier combinación de las mismas). Existen regiones de terminación convenientes en el plásmido Ti de *A. tumefaciens*, como las regiones de terminación de la octopina sintasa y la nopalina sintasa. Véase también Sambrook *et al.* 1991, Mol. Gen. Genet. 262:141-144; Proudfoot (1991) Cell 64:671-674; Sanfacon *et al.* 1991, Gene, 157: 5-149; Lenihan *et al.* (1990) Plant Cell 2:1261-1272; Munroe *et al.* (1990) Gene 91:151-158; Ballas *et al.* (1989), Nucleic Acids Res., 17-7903y Yuan *et al.* (1987) Nucleic Acid Res., 15, 9627-9639.

20 Cuando proceda, el gen o genes pueden optimizarse para aumentar su expresión en la célula huésped transformada (secuencia de ADN sintético). Es decir, los genes pueden sintetizarse utilizando codones preferidos por la célula huésped para mejorar la expresión, o pueden sintetizarse utilizando codones con una frecuencia de uso de codones preferida por el huésped. La expresión del marco de lectura abierto de la secuencia sintética de ADN en una célula da lugar a la producción del polipéptido de la invención. Las secuencias sintéticas de ADN pueden ser útiles simplemente para eliminar sitios de endonucleasas de restricción no deseados, para facilitar las estrategias de clonación de ADN, para alterar o eliminar cualquier sesgo potencial de codones, para alterar o mejorar el contenido de GC, para eliminar o alterar marcos de lectura alternativos, y/o para alterar o eliminar sitios de reconocimiento de empalme de intrones/exones, sitios de poliadenilación, secuencias Shine-Delgarno, elementos promotores no deseados y similares que puedan estar presentes en una secuencia nativa de ADN. Generalmente, el contenido de GC del gen aumentará. Véase, por ejemplo, Campbell y Gowri (1990) Plant Physiol. 92:1-11 para una discusión sobre el uso de codones preferido por el huésped. Existen procedimientos para sintetizar genes preferidos por las plantas. Véase, por ejemplo, Patentes estadounidenses n° 5.380.831y 5,436,391, Publicación de patente estadounidense n° 20090137409y Murray *et al.* (1989), Nucleic Acids Res., 17, 477-498.

35 También es posible utilizar secuencias sintéticas de ADN para introducir otras mejoras en una secuencia de ADN, como la introducción de una secuencia intrónica, la creación de una secuencia de ADN que se exprese como una fusión proteica con secuencias dirigidas a orgánulos, como péptidos de tránsito cloroplástico, péptidos dirigidos a la vacuola, o secuencias peptídicas que den lugar a la retención del péptido resultante en el retículo endoplásmico. Así, en una realización, la proteína pesticida se dirige al cloroplasto para su expresión. De este modo, cuando la proteína pesticida no se inserte directamente en el cloroplasto, el casete de expresión contendrá además un ácido nucleico que codifique un péptido de tránsito para dirigir la proteína pesticida a los cloroplastos. Tales péptidos de tránsito son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Von Heijne *et al.* 1991, Mol. Biol., Rep. 9-126), Newman *et al.* (1989), J. Virol. Química. 264, 17544, 257-17550, B. Zeynidazeh *et al.*, (1987) Plant Physiol. 84-968; Lenihan *et al.* (1993) Biochem. Biophys. Res. Commun. 196-1421y Yuan *et al.* (1986) Science 233:478-481.

45 El gen pesticida dirigido al cloroplasto puede optimizarse para su expresión en el cloroplasto para tener en cuenta las diferencias en el uso de codones entre el núcleo de la planta y este orgánulo. De este modo, los ácidos nucleicos de interés pueden sintetizarse utilizando codones preferidos por los cloroplastos. Véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 5 958 728.

#### Transformación de plantas

50 Los procedimientos de la invención implican la introducción de una construcción nucleotídica en una planta. Por "introducir" se entiende presentar a la planta la construcción nucleotídica de tal manera que la construcción acceda al interior de una célula de la planta. Los procedimientos de la invención no requieren que se utilice un procedimiento concreto para introducir una construcción nucleotídica en una planta, sólo que la construcción nucleotídica acceda al interior de al menos una célula de la planta. Los procedimientos para introducir construcciones de nucleótidos en plantas son conocidos en la técnica, incluyendo, pero sin limitarse a, procedimientos de transformación estable, procedimientos de transformación transitoria y procedimientos mediados por virus.

55 Por "planta" se entienden plantas enteras, órganos vegetales (por ejemplo, hojas, tallos, raíces, etc.), semillas, células vegetales, propágulos, embriones y progenie de los mismos. Las células vegetales pueden ser diferenciadas o indiferenciadas (por ejemplo, callo, células de cultivo en suspensión, protoplastos, células foliares, células radiculares, células del floema, polen).

"Plantas transgénicas" o "plantas transformadas" o plantas o células o tejidos "transformados de forma estable" se refiere a plantas que han incorporado o integrado secuencias de ácido nucleico exógeno o fragmentos de ADN en la célula vegetal. Estas secuencias de ácido nucleico incluyen las que son exógenas, o no están presentes en la célula vegetal no transformada, así como las que pueden ser endógenas, o estar presentes en la célula vegetal no transformada. "Heterólogas" se refiere generalmente a las secuencias de ácido nucleico que no son endógenas a la célula o parte del genoma nativo en el que están presentes, y que han sido añadidas a la célula por infección, transfección, microinyección, electroporación, microproyección o similares.

Las plantas transgénicas de la invención expresan una o más de las secuencias de toxinas novedosas aquí divulgadas. En algunas realizaciones, la proteína o secuencia de nucleótidos de la invención se combina ventajosamente en plantas con otros genes que codifican proteínas o ARN que confieren propiedades agronómicas útiles a dichas plantas. Entre los genes que codifican proteínas o ARN que confieren propiedades agronómicas útiles a las plantas transformadas, cabe mencionar las secuencias de ADN que codifican proteínas que confieren tolerancia a uno o más herbicidas, y otras que confieren tolerancia a determinados insectos, las que confieren tolerancia a determinadas enfermedades, los ADN que codifican ARN que proporcionan control de nematodos o insectos, y similares. Tales genes se describen en particular en las Solicitudes de patente PCT WO91/02071 y WO95/06128 y en las Patentes estadounidenses 7.923.602 y Publicación de solicitud de patente estadounidense nº 20100166723.

Entre las secuencias de ADN que codifican proteínas que confieren tolerancia a determinados herbicidas a las células vegetales y plantas transformadas, cabe mencionar un gen bar o PAT o el gen *Streptomyces coelicolor* descrito en WO2009/152359 que confiere tolerancia a los herbicidas glufosinato, un gen que codifica un EPSPS adecuado que confiere tolerancia a los herbicidas que tienen EPSPS como diana, como el glifosato y sus sales (US 4.535.060, US 4.769.061, US 5.094.945, US 4.940.835, US 5.188.642, US 4.971.908, US 5.145.783, US 5.310.667, US 5.312.910, US 5.627.061, US 5.633.435), un gen que codifica glifosato-n-acetiltransferasa (por ejemplo, US 8.222.489, US 8.088.972, US 8.044.261, US 8.021.857, US 8.008.547, US 7.999.152, US 7.998.703, US 7.863.503, US 7.714.188, US 7.709.702, US 7.666.644, US 7.666.643, US 7.531.339, US 7.527.955y US 7.405.074), un gen que codifica la glifosato oxidorreductasa (por ejemplo, US 5.463.175), o un gen que codifica una proteína tolerante al inhibidor de HPPD (por ejemplo, los genes de tolerancia al inhibidor de HPPD descritos en el documento WO 2004/055191, WO 199638567, US 6791014, WO2011/068567, WO2011/076345, WO2011/085221, WO2011/094205, WO2011/068567, WO2011/094199, WO2011/094205, WO2011/145015, WO2012/056401y WO2014/043435 ).

Entre las secuencias de ADN que codifican una EPSPS adecuada que confiere tolerancia a los herbicidas que tienen EPSPS como diana, se mencionará más particularmente el gen que codifica una EPSPS vegetal, en particular una EPSPS de maíz, en particular una EPSPS de maíz que comprende dos mutaciones, en particular una mutación en la posición aminoácida 102 y una mutación en la posición aminoácida 106 (WO2004/074443), y que se describe en la solicitud de patente US 6566587 en lo sucesivo denominada EPSPS de maíz doble mutante o 2mEPSPS, o el gen que codifica una EPSPS aislada de *Agrobacterium* y que se describe mediante la secuencia ID nº 2 y la secuencia ID nº 3 de la Patente estadounidense 5.633.435 también denominado CP4.

Entre las secuencias de ADN que codifican un EPSPS adecuado que confiere tolerancia a los herbicidas que tienen EPSPS como diana, se mencionará más particularmente el gen que codifica un EPSPS GRG23 de *Arthrobacter globiformis*, pero también los mutantes GRG23 ACE1, GRG23 ACE2, o GRG23 ACE3, en particular los mutantes o variantes de GRG23 descritos en WO2008/100353 como GRG23(ace3)R173K de SEQ ID Nº 29 en WO2008/100353.

En el caso de las secuencias de ADN que codifican EPSPS, y más particularmente que codifican los genes anteriores, la secuencia que codifica estas enzimas está precedida ventajosamente por una secuencia que codifica un péptido de tránsito, en particular el "péptido de tránsito optimizado" descrito en la Patente estadounidense 5.510.471 o 5,633,448.

Rasgos ejemplares de tolerancia a herbicidas que pueden combinarse con la secuencia de ácido nucleico de la invención incluyen además al menos un inhibidor de ALS (acetolactato sintasa) (WO2007/024782); un gen ALS/AHAS mutado de *Arabidopsis* (Patente de EE.UU. 6.855.533); genes que codifican 2,4-D-monooxigenasas que confieren tolerancia al 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) por metabolización (Patente estadounidense 6.153.401); y, genes que codifican Dicamba monooxigenasas que confieren tolerancia a dicamba (ácido 3,6-dicloro-2-metoxibenzoico) por metabolización (US 2008/0119361 y US 2008/0120739).

En varias realizaciones, el ácido nucleico de la invención se apila con uno o más genes tolerantes a herbicidas, incluyendo uno o más genes tolerantes a herbicidas inhibidores de HPPD, y/o uno o más genes tolerantes a glifosato y/o glufosinato.

Entre las secuencias de ADN que codifican proteínas relativas a las propiedades de tolerancia a los insectos, se mencionarán más concretamente las proteínas Bt ampliamente descritas en la literatura y bien conocidas por los expertos en la materia. También se mencionarán las proteínas extraídas de bacterias como *Photorhabdus* (WO97/17432 & WO98/08932).

Entre tales secuencias de ADN que codifican proteínas de interés que confieren propiedades novedosas de tolerancia a los insectos, se mencionarán más particularmente las proteínas Bt Cry o VIP ampliamente descritas en la literatura y bien conocidas por los expertos en la materia. Estos incluyen la proteína Cry1F o híbridos derivados de una proteína Cry1F (por ejemplo, las proteínas híbridas Cry1A-Cry1F descritas en US 6.326.169; US 6.281.016; US 6.218.188o fragmentos tóxicos de las mismas), las proteínas de tipo Cry1A o fragmentos tóxicos de las mismas, preferiblemente la proteína Cry 1 Ac o híbridos derivados de la proteína Cry 1 Ac (por ejemplo, la proteína híbrida Cry1Ab-Cry1Ac descrita en el documento US 5.880.275) o la proteína Cry1Ab o Bt2 o sus fragmentos insecticidas descritos en el documento EP451878las proteínas Cry2Ae, Cry2Af o Cry2Ag descritas en el documento WO2002/057664 o fragmentos tóxicos de las mismas, la proteína Cry1A.105 descrita en WO 2007/140256 (SEQ ID n° 7) o un fragmento tóxico de la misma, la proteína VIP3Aa19 del NCBI de acceso ABG20428, la proteína VIP3Aa20 del NCBI de acceso ABG20429 (SEQ ID n° 2 en WO 2007/142840), las proteínas VIP3A producidas en los eventos de algodón COT202 o COT203 (WO2005/054479 y WO2005/054480respectivamente), las proteínas Cry descritas en el documento WO2001/47952la proteína VIP3Aa o un fragmento tóxico de la misma descrito en Estruch et al. (1996), Proc Natl Acad Sci U S A. 28;93(11):5389-94 y US 6.291.156las proteínas insecticidas de*Xenorhabdus* (descritas en el documento WO98/50427), *Serratia* (particularmente de *S. entomophila*) o cepas de especies de *Photorhabdus*, tales como las proteínas Tc de *Photorhabdus* descritas en WO98/08932 (por ejemplo, Waterfield et al., 2001, Appl Environ Microbiol. 67(11):5017-24; Ffrench-Constant y Bowen, 2000, Cell Mol Life Sci.; 57(5):828-33). También se incluye aquí cualquier variante o mutante de cualquiera de estas proteínas que difiera en algunos (1-10, preferiblemente 1-5) aminoácidos de cualquiera de las secuencias anteriores, en particular la secuencia de su fragmento tóxico, o que estén fusionadas a un péptido de tránsito, como un péptido de tránsito plastidial, o a otra proteína o péptido.

En varias realizaciones, el ácido nucleico de la invención puede combinarse en plantas con uno o más genes que confieren un rasgo deseable, como tolerancia a herbicidas, tolerancia a insectos, tolerancia a la sequía, control de nematodos, eficiencia en el uso del agua, eficiencia en el uso del nitrógeno, valor nutricional mejorado, resistencia a enfermedades, fotosíntesis mejorada, calidad de fibra mejorada, tolerancia al estrés, reproducción mejorada, y similares.

Los eventos transgénicos particularmente útiles que pueden combinarse con los genes de la presente invención en plantas de la misma especie (por ejemplo, mediante cruzamiento o retransformación de una planta que contiene otro evento transgénico con un gen quimérico de la invención), incluyen el Evento 531/ PV-GHBK04 (algodón, control de insectos, descrito en WO2002/040677), el evento 1143-14A (algodón, control de insectos, no depositado, descrito en WO2006/128569); Evento 1143-51B (algodón, control de insectos, no depositado, descrito en WO2006/128570); Suceso 1445 (algodón, tolerancia a herbicidas, no depositado, descrito en US-A 2002-120964 o WO2002/034946Evento 17053 (arroz, tolerancia a herbicidas, depositado como PTA-9843, descrito en WO2010/117737); Evento 17314 (arroz, tolerancia a herbicidas, depositado como PTA-9844, descrito en WO2010/117735); Suceso 281-24-236 (algodón, control de insectos - tolerancia a herbicidas, depositado como PTA-6233, descrito en WO2005/103266 o US-A 2005-216969); Suceso 3006-210-23 (algodón, control de insectos - tolerancia a herbicidas, depositado como PTA-6233, descrito en US-A 2007-143876 o WO2005/103266); evento 3272 (maíz, rasgo de calidad, depositado como PTA-9972, descrito en WO2006/098952 o US-A 2006-230473); evento 33391 (trigo, tolerancia a herbicidas, depositado como PTA-2347, descrito en WO2002/027004), Evento 40416 (maíz, control de insectos - tolerancia a herbicidas, depositado como ATCC PTA-11508, descrito en WO 11/075593); evento 43A47 (maíz, control de insectos - tolerancia a herbicidas, depositado como ATCC PTA-11509, descrito en WO2011/075595); Evento 5307 (maíz, control de insectos, depositado como ATCC PTA-9561, descrito en WO2010/077816); Evento ASR-368 (hierba doblada, tolerancia a herbicidas, depositado como ATCC PTA-4816, descrito en US-A 2006-162007 o WO2004/053062); Evento B16 (maíz, tolerancia a herbicidas, no depositado, descrito en US-A 2003-126634); evento BPS-CV127-9 (soja, tolerancia a herbicidas, depositado como NCIMB n.º 41603, descrito en WO2010/080829); Evento BLR1 (colza oleaginosa, restauración de la esterilidad masculina, depositado como NCINM 41193, descrito en WO2005/074671), Evento CE43-67B (algodón, control de insectos, depositado como DSM ACC2724, descrito en US-A 2009-217423 o WO2006/128573); Evento CE44-69D (algodón, control de insectos, no depositado, descrito en US-A 2010-0024077); Evento CE44-69D (algodón, control de insectos, no depositado, descrito en WO2006/128571); Evento CE46-02A (algodón, control de insectos, no depositado, descrito en WO2006/128572); Suceso COT102 (algodón, control de insectos, no depositado, descrito en US-A 2006-130175 o WO2004/039986); Evento COT202 (algodón, control de insectos, no depositado, descrito en US-A 2007-067868 o WO2005/054479); Evento COT203 (algodón, control de insectos, no depositado, descrito en WO2005/054480); ); Evento DAS21606-3 / 1606 (soja, tolerancia a herbicidas, depositado como PTA-11028, descrito en WO2012/033794), Evento DAS40278 (maíz, tolerancia a herbicidas, depositado como ATCC PTA-10244, descrito en WO2011/022469); Evento DAS-44406-6 / pDAB8264.44.06.1 (soja, tolerancia a herbicidas, depositado como PTA-11336, descrito en WO2012/075426), Evento DAS-14536-7 /pDAB8291.45.36.2 (soja, tolerancia a herbicidas, depositado como PTA-11335, descrito en WO2012/075429), Evento DAS-59122-7 (maíz, control de insectos - tolerancia a herbicidas, depositado como ATCC PTA 11384 , descrito en US-A 2006-070139); Evento DAS-59132 (maíz, control de insectos - tolerancia a herbicidas, no depositado, descrito en WO2009/100188); Evento DAS68416 (soja, tolerancia a herbicidas, depositado como ATCC PTA-10442, descrito en WO2011/066384 o WO2011/066360); Evento DP-098140-6 (maíz, tolerancia a herbicidas, depositado como ATCC PTA-8296, descrito en US-A 2009-137395 o WO 08/112019); Evento DP-305423-1 (soja, rasgo de calidad, no

depositado, descrito en US-A 2008-312082 o WO2008/054747); Evento DP-32138-1 (maíz, sistema de hibridación, depositado como ATCC PTA-9158, descrito en US-A 2009-0210970 o WO2009/103049); Evento DP-356043-5 (soja, tolerancia a herbicidas, depositado como ATCC PTA-8287, descrito en US-A 2010-0184079 o WO2008/002872);  
 5 Evento EE-1 (berenjena, control de insectos, no depositado, descrito en WO 07/091277); Evento F1117 (maíz, tolerancia a herbicidas, depositado como ATCC 209031, descrito en US-A 2006-059581 o WO 98/044140); Evento FG72 (soja, tolerancia a herbicidas, depositado como PTA-11041, descrito en WO2011/063413), el evento GA21 (maíz, tolerancia a herbicidas, depositado como ATCC 209033, descrito en US-A 2005-086719 o WO 98/044140);  
 10 evento GG25 (maíz, tolerancia a herbicidas, depositado como ATCC 209032, descrito en US-A 2005-188434 o WO 98/044140); Evento GHB119 (algodón, control de insectos - tolerancia a herbicidas, depositado como ATCC PTA-8398, descrito en WO2008/151780); Evento GHB614 (algodón, tolerancia a herbicidas, depositado como ATCC PTA-6878, descrito en US-A 2010-050282 o WO2007/017186); Evento GJ11 (maíz, tolerancia a herbicidas, depositado como ATCC 209030, descrito en US-A 2005-188434 o WO98/044140); Evento GMRZ13 (remolacha azucarera, resistencia a un virus, depositado como NCIMB-41601, descrito en WO2010/076212); Evento H7-1 (remolacha azucarera, tolerancia a herbicidas, depositado como NCIMB 41158 o NCIMB 41159, descrito en US-A 2004-172669 o WO 2004/074492); Evento JOPLIN1 (trigo, tolerancia a enfermedades, no depositado, descrito en US-A 2008-064032); Evento LL27 (soja, tolerancia a herbicidas, depositado como NCIMB41658, descrito en WO2006/108674 o US-A 2008-320616); Evento LL55 (soja, tolerancia a herbicidas, depositado como NCIMB 41660, descrito en WO 2006/108675 o US-A 2008-196127); Evento LLcotton25 (algodón, tolerancia a herbicidas, depositado como ATCC PTA-3343, descrito en WO2003/013224 o US-A 2003-097687); Evento LLRICE06 (arroz, tolerancia a herbicidas, depositado como ATCC 203353, descrito en US 6,468,747 o WO2000/026345); Evento LLRice62 (arroz, tolerancia a herbicidas, depositado como ATCC 203352, descrito en WO2000/026345); Evento LLRICE601 (arroz, tolerancia a herbicidas, depositado como ATCC PTA-2600, descrito en US-A 2008-2289060 o WO2000/026356); evento LY038 (maíz, rasgo de calidad, depositado como ATCC PTA-5623, descrito en US-A 2007-028322 o WO2005/061720); Evento MIR162 (maíz, control de insectos, depositado como PTA-8166, descrito en US-A 2009-300784 o WO2007/142840); Evento MIR604 (maíz, control de insectos, no depositado, descrito en US-A 2008-167456 o WO2005/103301); Evento MON15985 (algodón, control de insectos, depositado como ATCC PTA-2516, descrito en US-A 2004-250317 o WO2002/100163); Evento MON810 (maíz, control de insectos, no depositado, descrito en US-A 2002-102582); Evento MON863 (maíz, control de insectos, depositado como ATCC PTA-2605, descrito en WO2004/011601 o US-A 2006-095986); evento MON87427 (maíz, control de la polinización, depositado como ATCC PTA-7899, descrito en WO2011/062904); evento MON87460 (maíz, tolerancia al estrés, depositado como ATCC PTA-8910, descrito en WO2009/111263 o US-A 2011-0138504); Evento MON87701 (soja, control de insectos, depositado como ATCC PTA-8194, descrito en US-A 2009-130071 o WO2009/064652); Evento MON87705 (soja, rasgo de calidad - tolerancia a herbicidas, depositado como ATCC PTA-9241, descrito en US-A 2010-0080887 o WO2010/037016); Evento MON87708 (soja, tolerancia a herbicidas, depositado como ATCC PTA-9670, descrito en WO2011/034704); evento MON87712 (soja, rendimiento, depositado como PTA-10296, descrito en WO2012/051199); Evento MON87754 (soja, rasgo de calidad, depositado como ATCC PTA-9385, descrito en WO2010/024976); evento MON87769 (soja, rasgo de calidad, depositado como ATCC PTA-8911, descrito en US-A 2011-0067141 o WO2009/102873); evento MON88017 (maíz, control de insectos - tolerancia a herbicidas, depositado como ATCC PTA-5582, descrito en US-A 2008-028482 o WO2005/059103);  
 40 Evento MON88913 (algodón, tolerancia a herbicidas, depositado como ATCC PTA-4854, descrito en WO2004/072235 o US-A 2006-059590); evento MON88302 (colza oleaginosa, tolerancia a los herbicidas, depositado como PTA-10955, descrito en WO2011/153186), el evento MON88701 (algodón, tolerancia a los herbicidas, depositado como PTA-11754, descrito en WO2012/134808), evento MON89034 (maíz, control de insectos, depositado como ATCC PTA-7455, descrito en WO 07/140256 o US-A 2008-260932); evento MON89788 (soja, tolerancia a herbicidas, depositado como ATCC PTA-6708, descrito en US-A 2006-282915 o WO2006/130436); Evento MS 11 (colza oleaginosa, control de la polinización - tolerancia a herbicidas, depositado como ATCC PTA-850 o PTA-2485, descrito en WO2001/031042); Evento MS8 (colza oleaginosa, control de la polinización - tolerancia a herbicidas, depositado como ATCC PTA-730, descrito en WO2001/041558 o US-A 2003-188347); evento NK603 (maíz, tolerancia a herbicidas, depositado como ATCC PTA-2478, descrito en US-A 2007-292854); Evento PE-7 (arroz, control de insectos, no depositado, descrito en WO2008/114282); Evento RF3 (colza oleaginosa, control de la polinización - tolerancia a herbicidas, depositado como ATCC PTA-730, descrito en WO2001/041558 o US-A 2003-188347); Evento RT73 (colza oleaginosa, tolerancia a herbicidas, no depositado, descrito en WO2002/036831 o US-A 2008-070260); Evento SYHT0H2 / SYN-000H2-5 (soja, tolerancia a herbicidas, depositado como PTA-11226, descrito en WO2012/082548), Evento T227-1 (remolacha azucarera, tolerancia a herbicidas, no depositado, descrito en WO2002/44407 o US-A 2009-265817); Evento T25 (maíz, tolerancia a herbicidas, no depositado, descrito en US-A 2001-029014 o WO2001/051654); Evento T304-40 (algodón, control de insectos - tolerancia a herbicidas, depositado como ATCC PTA-8171, descrito en US-A 2010-077501 o WO2008/122406); Evento T342-142 (algodón, control de insectos, no depositado, descrito en WO2006/128568); Evento TC1507 (maíz, control de insectos - tolerancia a herbicidas, no depositado, descrito en US-A 2005-039226 o WO2004/099447); Evento VIP1034 (maíz, control de insectos - tolerancia a herbicidas, depositado como ATCC PTA-3925., descrito en WO2003/052073), Evento 32316 (maíz, control de insectos - tolerancia a herbicidas, depositado como PTA-11507, descrito en WO2011/084632), evento 4114 (maíz, control de insectos-tolerancia a herbicidas, depositado como PTA-11506, descrito en WO2011/084621), evento EE-GM3 / FG72 (soja, tolerancia a herbicidas, N° acceso ATCC PTA-11041) opcionalmente apilado con el evento EE-GM1/LL27 o el evento EE-GM2/LL55 (WO2011/063413A2), evento DAS-68416-4 (soja, tolerancia a herbicidas, N° de acceso ATCC

5 PTA-10442, WO2011/066360A1), evento DAS-68416-4 (soja, tolerancia a herbicidas, N° acceso ATCC PTA-10442, WO2011/066384A1), evento DP-040416-8 (maíz, control de insectos, N° acceso ATCC PTA-11508, WO2011/075593A1), evento DP-043A47-3 (maíz, control de insectos, N° acceso ATCC PTA-11509, WO2011/075595A1), evento DP-004114-3 (maíz, control de insectos, N° acceso ATCC PTA-11506, WO2011/084621A1), evento DP-032316-8 (maíz, control de insectos, N° acceso ATCC PTA-11507, WO2011/084632A1), evento MON-88302-9 (colza oleaginosa, tolerancia a herbicidas, N° acceso ATCC PTA-10955, WO2011/153186A1), evento DAS-21606-3 (soja, tolerancia a herbicidas, N° acceso ATCC PTA-11028, WO2012/033794A2), evento MON-87712-4 (soja, rasgo de calidad, N° acceso ATCC. PTA-10296, WO2012/051199A2), evento DAS-44406-6 (soja, tolerancia apilada a herbicidas, N° acceso ATCC. PTA-11336, WO2012/075426A1), evento DAS-14536-7 (soja, tolerancia apilada a herbicidas, N° acceso ATCC. PTA-11335, WO2012/075429A1), evento SYN-000H2-5 (soja, tolerancia a herbicidas, N° acceso ATCC. PTA-11226, WO2012/082548A2), evento DP-061061-7 (colza oleaginosa, tolerancia a herbicidas, sin N° de depósito disponible, WO2012071039A1), evento DP-073496-4 (colza oleaginosa, tolerancia a los herbicidas, sin número de depósito disponible, US2012131692), evento 8264.44.06.1 (soja, tolerancia apilada a herbicidas, N° de accesión PTA-11336, WO2012075426A2), evento 8291.45.36.2 (soja, tolerancia apilada a herbicidas, n° de acceso PTA-11336, WO2012075426A2) PTA-11335, WO2012075429A2), evento SYHT0H2 (soja, N° acceso ATCC. PTA-11226, WO2012/082548A2), evento MON88701 (algodón, N° acceso ATCC PTA-11754, WO2012/134808A1), evento KK179-2 (alfalfa, N° acceso ATCC PTA-11833, WO2013/003558A1), evento pDAB8264.42.32.1 (soja, tolerancia apilada a herbicidas, N° acceso ATCC PTA-11993, WO2013/010094A1), evento MZDT09Y (maíz, N° acceso ATCC PTA-13025, WO2013/012775A1).

25 La transformación de células vegetales puede llevarse a cabo mediante una de las diversas técnicas conocidas en la técnica. El gen pesticida de la invención puede modificarse para obtener o potenciar su expresión en células vegetales. Normalmente, una construcción que exprese una proteína de este tipo contendría un promotor para impulsar la transcripción del gen, así como una región no traducida 3' para permitir la terminación de la transcripción y la poliadenilación. La organización de tales construcciones es bien conocida en la técnica. En algunos casos, puede ser útil diseñar el gen de forma que el péptido resultante sea secretado o dirigido de otra forma dentro de la célula vegetal. Por ejemplo, el gen puede modificarse para que contenga un péptido señal que facilite la transferencia del péptido al retículo endoplásmico. También puede ser preferible diseñar el casete de expresión de la planta para que contenga un intrón, de forma que se requiera el procesamiento del ARNm del intrón para la expresión.

30 Normalmente, este "casete de expresión vegetal" se insertará en un "vector de transformación vegetal". Este vector de transformación vegetal puede estar compuesto por uno o más vectores de ADN necesarios para lograr la transformación vegetal. Por ejemplo, es una práctica común en la técnica utilizar vectores de transformación de plantas que se componen de más de un segmento contiguo de ADN. Estos vectores suelen denominarse en la técnica "vectores binarios". Los vectores binarios, así como los vectores con plásmidos auxiliares, se utilizan con mayor frecuencia para la transformación mediada por *Agrobacterium*, donde el tamaño y la complejidad de los segmentos de ADN necesarios para lograr una transformación eficaz son bastante grandes, y resulta ventajoso separar las funciones en moléculas de ADN independientes. Los vectores binarios suelen contener un vector plasmídico que contiene las secuencias de acción cis necesarias para la transferencia de ADN-T (como el borde izquierdo y el borde derecho), un marcador seleccionable diseñado para poder expresarse en una célula vegetal y un "gen de interés" (un gen diseñado para poder expresarse en una célula vegetal para la que se desea generar plantas transgénicas). En este vector plasmídico también están presentes secuencias necesarias para la replicación bacteriana. Las secuencias de acción cis están dispuestas de forma que permitan una transferencia eficaz a las células vegetales y su expresión en ellas. Por ejemplo, el gen marcador seleccionable y el gen pesticida están situados entre los bordes izquierdo y derecho. A menudo, un segundo vector plasmídico contiene los factores trans-actores que median la transferencia del ADN-T de *Agrobacterium* a las células vegetales. Este plásmido contiene a menudo las funciones de virulencia (genes Vir) que permiten la infección de células vegetales por *Agrobacterium*, y la transferencia de ADN por clivaje en secuencias frontera y transferencia de ADN mediada por virus, como se entiende en la técnica (Hellens y Mullineaux (2000) Trends in Plant Science 5:446-451). Para la transformación de plantas pueden utilizarse varios tipos de cepas de *Agrobacterium* (por ejemplo, LBA4404, GV3101, EHA101, EHA105, etc.). El segundo vector plasmídico no es necesario para transformar las plantas por otros procedimientos como microinyección, microinyección, electroporación, polietilenglicol, etc.

55 En general, los procedimientos de transformación vegetal implican la transferencia de ADN heterólogo a células vegetales diana (por ejemplo, embriones inmaduros o maduros, cultivos en suspensión, callos indiferenciados, protoplastos, etc.), seguida de la aplicación de un nivel umbral máximo de selección apropiado (dependiendo del gen marcador seleccionable) para recuperar las células vegetales transformadas de un grupo de masa celular no transformada. Normalmente, los explantes se transfieren a un nuevo suministro del mismo medio y se cultivan de forma rutinaria. Posteriormente, las células transformadas se diferencian en brotes tras colocarlas en medio de regeneración suplementado con un nivel umbral máximo de agente de selección. A continuación, los brotes se transfieren a un medio de enraizamiento selectivo para recuperar el brote enraizado o la plántula. A continuación, la plántula transgénica crece hasta convertirse en una planta madura y produce semillas fértiles (p. ej. Hiei et al. (1994) The Plant Journal 6:271-282; Ishida et al. (1996) Nature Biotechnology 14:745-750). Normalmente, los explantes se transfieren a un nuevo suministro del mismo medio y se cultivan de forma rutinaria. Una descripción general de las

técnicas y procedimientos para generar plantas transgénicas se encuentra en Ayres y Park (1994) *Critical Reviews in Plant Science* 13:219-239 y Bommineni y Jauhar (1997) *Maydica* 42:107-120. Dado que el material transformado contiene muchas células, tanto las transformadas como las no transformadas están presentes en cualquier trozo de callo o tejido diana sometido o grupo de células. La capacidad de eliminar las células no transformadas y permitir la proliferación de las transformadas da lugar a cultivos vegetales transformados. A menudo, la capacidad de eliminar las células no transformadas es una limitación para la rápida recuperación de las células vegetales transformadas y la generación satisfactoria de plantas transgénicas.

Los protocolos de transformación, así como los protocolos para introducir secuencias de nucleótidos en plantas, pueden variar en función del tipo de planta o célula vegetal, es decir, monocotiledónea o dicotiledónea, objetivo de la transformación. La generación de plantas transgénicas puede realizarse por uno de varios procedimientos, incluyendo, pero no limitado a, microinyección, electroporación, transferencia directa de genes, introducción de ADN heterólogo por *Agrobacterium* en células vegetales (transformación mediada por *Agrobacterium*), bombardeo de células vegetales con ADN extraño heterólogo adherido a partículas, aceleración de partículas balísticas, transformación por haz de aerosol (Solicitud publicada en EE.UU. n° 20010026941; Patente estadounidense n° 4.945.050; Publicación internacional No. WO 91/00915; Solicitud publicada en EE.UU. n° 2002015066), transformación Led, y otros diversos procedimientos no mediados directamente por partículas para transferir ADN.

Los procedimientos para la transformación de cloroplastos son conocidos en la técnica. Por ejemplo, Tomazic y col. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 87:8526-8530; Svab y Maliga (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 90:913-917; Svab y Maliga (1993) *EMBO J.* 12:601-606. El procedimiento se basa en el suministro por pistola de partículas de ADN que contiene un marcador seleccionable y en la localización del ADN en el genoma plastidial mediante recombinación homóloga. Además, la transformación plastidial puede llevarse a cabo mediante la transactivación de un transgén plastidial silencioso a través de la expresión tisular preferente de una ARN polimerasa codificada en el núcleo y dirigida por el plásmido. Se ha informado de un sistema de este tipo en McBride et al. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* (7301) 7305:

Tras la integración del ADN extraño heterólogo en las células vegetales, se aplica un nivel umbral máximo de selección apropiada en el medio para matar las células no transformadas y se separan y proliferan las células supuestamente transformadas que sobreviven a este tratamiento de selección transfiriéndolas regularmente a un medio fresco. Mediante el paso continuo y el desafío con la selección adecuada, se identifican y proliferan las células que se transforman con el vector plasmídico. A continuación, se pueden utilizar procedimientos moleculares y bioquímicos para confirmar la presencia del gen heterólogo de interés integrado en el genoma de la planta transgénica.

Las células que han sido transformadas pueden ser cultivadas en plantas de acuerdo con las formas convencionales. Por ejemplo, Tomazic y col. (1986) *Plant Cell Reports* 5:81-84. A continuación, estas plantas pueden cultivarse y polinizarse con la misma cepa transformada o con cepas diferentes, y se identifica el híbrido resultante con expresión constitutiva de la característica fenotípica deseada. Se pueden cultivar dos o más generaciones para garantizar que la expresión de la característica fenotípica deseada se mantiene de forma estable y se hereda y, a continuación, se cosechan las semillas para garantizar que se ha logrado la expresión de la característica fenotípica deseada. De este modo, la presente invención proporciona semillas transformadas (también denominadas "semillas transgénicas") que tienen una construcción nucleotídica de la invención, por ejemplo, un casete de expresión de la invención, incorporado de forma estable en su genoma.

#### Evaluación de la transformación de plantas

Tras la introducción de ADN extraño heterólogo en células vegetales, la transformación o integración del gen heterólogo en el genoma de la planta se confirma mediante diversos procedimientos, como el análisis de ácidos nucleicos, proteínas y metabolitos asociados al gen integrado.

El análisis PCR es un procedimiento rápido para examinar células, tejidos o brotes transformados para detectar la presencia del gen incorporado en la fase inicial antes del trasplante al suelo (Sambrook y Russell (2001) *Molecular Cloning: Manual de laboratorio. A laboratory manual*, 3ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, La PCR se lleva a cabo utilizando cebadores oligonucleótidos específicos del gen de interés o del fondo del vector *Agrobacterium*, etc.

La transformación de la planta puede confirmarse mediante análisis Southern blot del ADN genómico (Sambrook y Russell, 2001, *supra*). En general, el ADN total se extrae del transformante, se digiere con las enzimas de restricción adecuadas, se fracciona en un gel de agarosa y se transfiere a una membrana de nitrocelulosa o nailon. A continuación, la membrana o "blot" se sondea, por ejemplo, con un fragmento de ADN diana <sup>32</sup>P radiomarcado para confirmar la integración del gen introducido en el genoma de la planta según las técnicas estándar (Sambrook y Russell, 2001, *supra*).

En el análisis de Northern blot, el ARN se aísla de tejidos específicos del transformante, se fracciona en un gel de agarosa con formaldehído y se coloca en un filtro de nylon de acuerdo con los procedimientos estándar que se utilizan habitualmente en la técnica (Sambrook y Russell, 2001, *supra*). La expresión del ARN codificado por el gen

pesticida se comprueba entonces hibridando el filtro con una sonda radiactiva derivada de un gen pesticida, por procedimientos conocidos en la técnica (Sambrook y Russell, 2001, *supra*).

- 5 [0104] Los ensayos de Western blot, bioquímicos y similares pueden llevarse a cabo en las plantas transgénicas para confirmar la presencia de la proteína codificada por el gen pesticida mediante procedimientos estándar (Sambrook y Russell, 2001, *supra*) utilizando anticuerpos que se unen a uno o más epítomos presentes en la proteína pesticida.

#### Actividad plaguicida en plantas

- 10 En otro aspecto de la invención, se pueden generar plantas transgénicas que expresen una proteína pesticida que tenga actividad pesticida. Los procedimientos descritos anteriormente a modo de ejemplo pueden utilizarse para generar plantas transgénicas, pero la forma en que se generan las células vegetales transgénicas no es crítica para esta invención. Los procedimientos conocidos o descritos en la técnica, como la transformación mediada por *Agrobacterium*, la transformación biolística y los procedimientos no mediados por partículas, pueden utilizarse a discreción del experimentador. Las plantas que expresan una proteína plaguicida pueden aislarse mediante procedimientos comunes descritos en la técnica, por ejemplo mediante la transformación de callo, la selección de callo transformado y la regeneración de plantas fértiles a partir de dicho callo transgénico. En dicho proceso, se puede utilizar cualquier gen como marcador seleccionable siempre que su expresión en las células vegetales confiera la capacidad de identificar o seleccionar las células transformadas.

- 20 Se han desarrollado varios marcadores para su uso con células vegetales, como la resistencia al cloranfenicol, al aminoglucósido G418, a la higromicina o similares. Otros genes que codifican un producto implicado en el metabolismo del cloroplasto también pueden utilizarse como marcadores seleccionables. Por ejemplo, los genes que proporcionan resistencia a herbicidas para plantas como el glifosato, el bromoxinil o la imidazolinona pueden encontrar un uso particular. Se han descrito genes de este tipo (Stalker et al. (1985), J. Virol. Química. 263:6310-6314 (gen de la nitrilasa resistente al bromoxinil); y Sathasivan et al. (1990) Nucl. Acids Res. 18:2188 (gen de resistencia a la imidazolinona AHAS). Además, los genes aquí divulgados son útiles como marcadores para evaluar la transformación de células bacterianas o vegetales. Los procedimientos para detectar la presencia de un transgén en una planta, órgano vegetal (por ejemplo, hojas, tallos, raíces, etc.), semilla, célula vegetal, propágulo, embrión o progenie del mismo son bien conocidos en la técnica. En una realización, la presencia del transgén se detecta mediante pruebas de actividad pesticida.

- 30 Las plantas fértiles que expresan una proteína plaguicida pueden someterse a pruebas de actividad plaguicida, y las plantas que muestran una actividad óptima se seleccionan para su posterior reproducción. Existen procedimientos para ensayar la actividad de las plagas. Generalmente, la proteína se mezcla y se utiliza en ensayos de alimentación. Véase, por ejemplo Marrone et al. (1985) J. of Economic Entomology 78:290-293.

- 35 La presente invención puede utilizarse para la transformación de cualquier especie vegetal, incluyendo, pero sin limitarse a, monocotiledóneas y dicotiledóneas. Ejemplos de plantas de interés incluyen, pero no se limitan a, maíz (maíz), sorgo, trigo, girasol, cebada y colza oleaginosa, *Brassica* sp., alfalfa, centeno, mijo, cártamo, cacahuete, batata, mandioca, café, coco, piña, cítricos, cacao, té, plátano, aguacate, higo, guayaba, mango, olivo, papaya, anacardo, macadamia, almendra, avena, hortalizas, plantas ornamentales y coníferas.

- 40 Las verduras incluyen, entre otras, los tomates, la lechuga, las judías verdes, las habas, los guisantes y los miembros del género *Curcumis* como el pepino, el melón cantalupo y el melón almizclero. Las plantas ornamentales incluyen, entre otras, azaleas, hortensias, hibiscos, rosas, tulipanes, narcisos, petunias, claveles, poinsettia y crisantemos. Preferentemente, las plantas de la presente invención son plantas de cultivo (por ejemplo, maíz, sorgo, trigo, girasol, tomate, crucíferas, pimientos, patata, algodón, arroz, soja, remolacha azucarera, caña de azúcar, tabaco, cebada, colza, etc.).

#### Uso en el control de plaguicidas

Se conocen en la técnica procedimientos generales para emplear cepas que comprenden una secuencia nucleotídica de la presente invención, o una variante de la misma, en el control de plagas o en la ingeniería de otros organismos como agentes pesticidas. Véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 5 958 728.

- 50 Las cepas de *Bacillus* que contienen una secuencia nucleotídica de la presente invención, o una variante de la misma, o los microorganismos que han sido alterados genéticamente para contener un gen pesticida de la invención y proteína pueden utilizarse para proteger cultivos y productos agrícolas de plagas. En un aspecto de la invención, las células enteras, es decir, no lisadas, de un organismo productor de toxina (pesticida) se tratan con reactivos que prolongan la actividad de la toxina producida en la célula cuando ésta se aplica al entorno de la(s) plaga(s) objetivo.

- 55 Alternativamente, el pesticida se produce introduciendo un gen pesticida en un huésped celular. La expresión del gen pesticida da lugar, directa o indirectamente, a la producción intracelular y al mantenimiento del pesticida. En un

aspecto de esta invención, estas células se tratan entonces en condiciones que prolongan la actividad de la toxina producida en la célula cuando ésta se aplica al entorno de la(s) plaga(s) objetivo. El producto resultante conserva la toxicidad de la toxina. Estos plaguicidas encapsulados de forma natural pueden entonces formularse de acuerdo con las técnicas convencionales para su aplicación al medio ambiente que alberga una plaga objetivo, por ejemplo, el suelo, el agua y el follaje de las plantas. Véase, por ejemplo, EPA 0192319, y las referencias citadas en el mismo. Alternativamente, se pueden formular las células que expresan un gen de esta invención para permitir la aplicación del material resultante como pesticida.

Los ingredientes activos de la presente invención se aplican normalmente en forma de composiciones y pueden aplicarse al área de cultivo o planta a tratar, simultáneamente o en sucesión, con otros compuestos. Estos compuestos pueden ser fertilizantes, herbicidas, crioprotectores, tensioactivos, detergentes, jabones pesticidas, aceites latentes, polímeros y/o formulaciones portadoras de liberación prolongada o biodegradables que permiten la dosificación a largo plazo de una zona objetivo tras una única aplicación de la formulación. También pueden ser herbicidas selectivos, insecticidas químicos, virucidas, microbicidas, amebicidas, pesticidas, fungicidas, bactericidas, nematocidas, molusquicidas o mezclas de varias de estas preparaciones, si se desea, junto con otros portadores aceptables desde el punto de vista agrícola, tensioactivos o adyuvantes promotores de la aplicación empleados habitualmente en la técnica de la formulación. Los portadores y adyuvantes adecuados pueden ser sólidos o líquidos y corresponden a las sustancias empleadas habitualmente en la tecnología de formulación, por ejemplo, sustancias minerales naturales o regeneradas, disolventes, dispersantes, agentes humectantes, adherentes, aglutinantes o fertilizantes. Del mismo modo, las formulaciones pueden prepararse como "cebos" comestibles o como "trampas" para plagas que permitan la alimentación o ingestión de la formulación plaguicida por una plaga diana.

Los procedimientos de aplicación de un ingrediente activo de la presente invención o una composición agroquímica de la presente invención que contenga al menos una de las proteínas pesticidas producidas por las cepas bacterianas de la presente invención incluyen la aplicación foliar, el recubrimiento de semillas y la aplicación al suelo. El número de aplicaciones y la tasa de aplicación dependen de la intensidad de la infestación por la plaga correspondiente.

La composición puede formularse como polvo, polvo fino, bolitas, gránulo, aerosol, emulsión, coloide, solución o similar, y puede prepararse por medios convencionales como desecación, liofilización, homogeneización, extracción, filtración, centrifugación, sedimentación o concentración de un cultivo de células que comprenda el polipéptido. En todas las composiciones que contienen al menos un polipéptido plaguicida, el polipéptido puede estar presente en una concentración de entre el 1% y el 99% en peso.

Las plagas de lepidópteros, hemípteros, dípteros o coleópteros pueden eliminarse o reducirse en número en un área determinada mediante los procedimientos de la invención, o pueden aplicarse profilácticamente a un área ambiental para prevenir la infestación por una plaga susceptible. Preferiblemente, la plaga ingiere, o entra en contacto con, una cantidad del polipéptido eficaz como plaguicida. Por "cantidad de plaguicida eficaz" se entiende una cantidad de plaguicida capaz de provocar la muerte de al menos una plaga o de reducir notablemente su crecimiento, alimentación o desarrollo fisiológico normal. Esta cantidad variará en función de factores tales como, por ejemplo, las plagas diana específicas a controlar, el entorno específico, la ubicación, la planta, el cultivo o el lugar agrícola a tratar, las condiciones ambientales y el procedimiento, la tasa, la concentración, la estabilidad y la cantidad de aplicación de la composición polipeptídica con eficacia plaguicida. Las formulaciones también pueden variar con respecto a las condiciones climáticas, las consideraciones medioambientales y/o la frecuencia de aplicación y/o la gravedad de la infestación por plagas.

Las composiciones plaguicidas descritas pueden elaborarse formulando la célula bacteriana, el cristal y/o la suspensión de esporas, o el componente proteico aislado con el portador deseable aceptable desde el punto de vista agrícola. Las composiciones pueden formularse antes de la administración en un medio apropiado, como liofilizado, liofilizado, desecado, o en un portador acuoso, medio o diluyente adecuado, como solución salina u otro tampón. Las composiciones formuladas pueden presentarse en forma de polvo o material granular, o en suspensión en aceite (vegetal o mineral), o agua o emulsiones aceite/agua, o como polvo mojable, o en combinación con cualquier otro material portador adecuado para la aplicación agrícola. Los portadores agrícolas adecuados pueden ser sólidos o líquidos y son bien conocidos en la técnica. El término "portador aceptable desde el punto de vista agrícola" abarca todos los adyuvantes, componentes inertes, dispersantes, tensioactivos, adherentes, aglutinantes, etc. que se utilizan habitualmente en la tecnología de formulación de plaguicidas; son bien conocidos por los expertos en formulación de plaguicidas. Las formulaciones pueden mezclarse con uno o más adyuvantes sólidos o líquidos y prepararse por diversos medios, por ejemplo, mezclando homogéneamente, combinando y/o triturando la composición plaguicida con los adyuvantes adecuados mediante técnicas de formulación convencionales. Las formulaciones y procedimientos de aplicación adecuados se describen en Patente de EE.UU. nº 6.468.523.

"Plaga" incluye, entre otros, insectos, hongos, bacterias, nematodos, ácaros, garrapatas y similares. Las plagas de insectos incluyen insectos seleccionados de los órdenes *Coleoptera*, *Diptera*, *Hymenoptera*, *Lepidoptera*, *Mallophaga*, *Homoptera*, *Hemiptera*, *Orthoptera*, *Thysanoptera*, *Dermaptera*, *Isoptera*, *Anoplura*, *Siphonaptera*, *Trichoptera*, etc., particularmente *Coleoptera*, *Lepidoptera*, y *Diptera*.

- El orden *Coleoptera* incluye los subórdenes *Adephaga* y *Polyphaga*. El suborden *Adephaga* incluye las superfamilias *Caraboidea* y *Gyrinoidea*, mientras que el suborden *Polyphaga* incluye las superfamilias *Hydrophiloidea*, *Staphylinoidea*, *Cantharoidea*, *Cleroidea*, *Elateroidea*, *Dascilloidea*, *Dryopoidea*, *Byrrhoidea*, *Cucujoidea*, *Meloidea*, *Mordelloidea*, *Tenebrionoidea*, *Bostrichoidea*, *Scarabaeoidea*, *Cerambycoidea*, *Chrysomeloidea* y *Curculionoidea*. La superfamilia *Caraboidea* incluye las familias *Cicindelidae*, *Carabidae* y *Dytiscidae*. La superfamilia *Gyrinoidea* incluye la familia *Gyrinidae*. La superfamilia *Hydrophiloidea* incluye la familia *Hydrophilidae*. La superfamilia *Staphylinoidea* incluye las familias *Silphidae* y *Staphylinidae*. La superfamilia *Cantharoidea* incluye las familias *Cantharidae* y *Lampyridae*. La superfamilia *Cleroidea* incluye las familias *Cleridae* y *Dermeestidae*. La superfamilia *Elateroidea* incluye las familias *Elateridae* y *Buprestidae*. La superfamilia *Cucujoidea* incluye la familia *Coccinellidae*. La superfamilia *Meloidea* incluye la familia *Meloidae*. La superfamilia *Tenebrionoidea* incluye la familia *Tenebrionidae*. La superfamilia *Scarabaeoidea* incluye las familias *Passalidae* y *Scarabaeidae*. La superfamilia *Cerambycoidea* incluye la familia *Cerambycidae*. La superfamilia *Chrysomeloidea* incluye la familia *Chrysomelidae*. La superfamilia *Curculionoidea* incluye las familias *Curculionidae* y *Scolytidae*.
- El orden *Diptera* incluye los subórdenes *Nematocera*, *Brachycera* y *Cyclorrhapha*. El suborden *Nematocera* incluye las familias *Tipulidae*, *Psychodidae*, *Culicidae*, *Ceratopogonidae*, *Chironomidae*, *Simuliidae*, *Bibionidae* y *Cecidomyiidae*. El suborden *Brachycera* incluye las familias *Stratiomyidae*, *Tabanidae*, *Therevidae*, *Asilidae*, *Mydidae*, *Bombyliidae* y *Dolichopodidae*. El suborden *Cyclorrhapha* incluye las divisiones *Aschiza* y *Aschiza*. La división *Aschiza* incluye las familias *Phoridae*, *Syrphidae* y *Conopidae*. La División *Aschiza* incluye las Secciones *Acalyptatae* y *Calyptatae*. La sección *Acalyptatae* incluye las familias *Otitidae*, *Tephritidae*, *Agromyzidae* y *Drosophilidae*. La sección *Calyptatae* incluye las familias *Hippoboscidae*, *Oestridae*, *Tachinidae*, *Anthomyiidae*, *Muscidae*, *Calliphoridae* y *Sarcophagidae*.
- El orden *Lepidoptera* incluye las familias *Papilionidae*, *Pieridae*, *Lycaenidae*, *Nymphalidae*, *Danaidae*, *Satyridae*, *Hesperiidae*, *Sphingidae*, *Saturniidae*, *Geometridae*, *Arctiidae*, *Noctuidae*, *Lymantriidae*, *Sesiidae* y *Tineidae*.
- Los nematodos incluyen nematodos parásitos como los nematodos del nudo de la raíz, los nematodos del quiste y los nematodos de la lesión, incluidos *Heterodera* spp., *Meloidogyne* spp., y *Globodera* spp.; en particular, miembros de los nematodos del quiste, incluidos, entre otros, *Heterodera glycines* (nematodo del quiste de la soja); *Heterodera schachtii* (nematodo del quiste de la remolacha); *Heterodera avenae* (nematodo del quiste del cereal); y *Globodera rostochiensis* y *Globodera pallida* (nematodos del quiste de la patata). Los nematodos de las lesiones son *Pratylenchus* spp.
- Las plagas de hemípteros (que incluyen especies que se designan como Hemiptera, Homoptera o Heteroptera) incluyen, pero no se limitan a, *Lygus* spp., como el chinche deslustrado occidental de las plantas (*Lygus hesperus*), el chinche deslustrado de las plantas (*Lygus lineolaris*) y el chinche verde de las plantas (*Lygus elisus*); pulgones, como el pulgón verde del melocotonero (*Myzus persicae*), el pulgón del algodón (*Aphis gossypii*), el pulgón de la cereza o pulgón negro de la cereza (*Myzus cerasi*), el pulgón de la soja (*Aphis glycines Matsumura*); la chicharrita marrón de las plantas (*Nilaparvata lugens*), y la chicharrita verde del arroz (*Nephotettix* spp.); y chinches apestosas, como la chinche apestosa verde (*Acrosternum hilare*), la chinche apestosa marrón (*Halyomorpha halys*), la chinche apestosa verde del sur (*Nezara viridula*), la chinche apestosa del arroz (*Oebalus pugnax*), la chinche del bosque (*Pentatoma rufipes*), la chinche apestosa europea (*Rhaphigaster nebulosa*) y la chinche escudo *Troilus luridus*.
- Las plagas de insectos de la invención para los principales cultivos incluyen: Maíz: *Ostrinia nubilalis*, barrenador europeo del maíz; *Agrotis ipsilon*, gusano cortador negro; *Helicoverpa zea*, gusano de la espiga del maíz; *Spodoptera frugiperda*, gusano militar del otoño; *Diatraea grandiosella*, barrenador suroccidental del maíz; *Elasmopalpus lignosellus*, barrenador menor del tallo del maíz; *Diatraea saccharalis*, barrenador de la caña de azúcar; *Diabrotica virgifera*, gusano de la raíz del maíz occidental; *Diabrotica longicornis barberi*, gusano de la raíz del maíz septentrional; *Diabrotica undecimpunctata howardi*, gusano de la raíz del maíz meridional; *Melanotus* spp., *cyclocephala borealis*, gusano enmascarado del norte (gusano blanco); *Cyclocephala immaculata*, gusano enmascarado del sur (gusano blanco); *Popillia japonica*, escarabajo japonés; *Chaetocnema pulicaria*, escarabajo pulgoso del maíz; *Sphenophorus maidis*, chinche del maíz; *Rhopalosiphum maidis*, pulgón de la hoja del maíz; *Anuraphis maidiradicis*, pulgón de la raíz del maíz; *Blissus leucopterus leucopterus*, chinche; *Melanoplus femurrubrum*, saltamontes de patas rojas; *Melanoplus sanguinipes*, saltamontes migratorio; *Hylemya platura*, gusano del maíz; *Agromyza parvicornis*, minador del maíz; *Anaphothrips obscurus*, trips de la hierba; *Solenopsis milesta*, hormiga ladrona; *Tetranychus urticae*, araña roja; Sorgo: *Chilo partellus*, barrenador del sorgo; *Spodoptera frugiperda*, gusano militar del otoño; *Spodoptera cosmioides*; *Spodoptera eridania*; *Helicoverpa zea*, gusano de la espiga del maíz; *Elasmopalpus lignosellus*, barrenador menor del tallo del maíz; *Feltia subterranea*, gusano cortador granulado; *Phyllophaga crinita*, gusano blanco; *Eleodes*, *Conoderus* y *Aeolus* spp, gusanos de alambre; *Oulema melanopus*, escarabajo de la hoja del cereal; *Chaetocnema pulicaria*, escarabajo pulgoso del maíz; *Sphenophorus maidis*, chinche del maíz; *Rhopalosiphum maidis*; pulgón de la hoja del maíz; *Sipha flava*, pulgón amarillo de la caña de azúcar; *Blissus leucopterus leucopterus*, chinche; *Contarinia sorghicola*, mosquito del sorgo; *Tetranychus cinnabarinus*, araña roja del carmín; *Tetranychus urticae*, araña roja de dos manchas; Trigo: *Pseudaleitia unipunctata*, gusano militar; *Spodoptera frugiperda*, gusano militar del otoño; *Elasmopalpus lignosellus*, barrenador menor del tallo del maíz; *Agrotis orthogonia*, gusano cortador

occidental; *Elasmopalpus lignosellus*, barrenador menor del tallo del maíz; *Oulema melanopus*, escarabajo de la hoja del cereal; *Hypera punctata*, gorgojo de la hoja del trébol; *Diabrotica undecimpunctata howardi*, gusano de la raíz del maíz del sur; pulgón ruso del trigo; *Schizaphis graminum*, chinche verde; *Macrosiphum avenae*, pulgón inglés del grano; *Melanoplus femurrubrum*, saltamontes de patas rojas; *Melanoplus differentialis*, saltamontes diferencial; *Melanoplus sanguinipes*, saltamontes migratorio; *Mayetiola destructor*, mosca de Hesse; *Sitodiplosis mosellana*, mosquito del trigo; *Meromyza americana*, gusano del tallo del trigo; *Hylemya coarctata*, mosca del bulbo del trigo; *Frankliniella fusca*, trips del tabaco; *Cephus cinctus*, mosca del tallo del trigo; *Aceria tulipae*, ácaro del rizado del trigo; Girasol: *Suleima helianthana*, polilla del capullo del girasol; *Homoeosoma electellum*, polilla del girasol; *zygogramma exclamationis*, escarabajo del girasol; *Bothyrus gibbosus*, escarabajo de la zanahoria; *Neolasioptera murtfeldtiana*, mosquito de las semillas de girasol; Algodón: *Heliothis virescens*, gusano del algodón; *Helicoverpa zea*, gusano del algodón; *Spodoptera exigua*, gusano de la remolacha; *Pectinophora gossypiella*, gusano rosado del algodón; *Anthonomus grandis*, gorgojo de la cápsula; *Aphis gossypii*, pulgón del algodón; *Pseudatomoscelis seriatus*, pulgón del algodón; *Trialeurodes abutilonea*, mosca blanca de alas anilladas; *Lygus lineolaris*, chinche deslustrada; *Melanoplus femurrubrum*, saltamontes de patas rojas; *Melanoplus differentialis*, saltamontes diferencial; *Thrips tabaci*, trips de la cebolla; *Frankliniella fusca*, trips del tabaco; *Tetranychus cinnabarinus*, araña roja del carmín; *Tetranychus urticae*, araña roja de dos manchas; Arroz: *Diatraea saccharalis*, barrenador de la caña de azúcar; *Spodoptera frugiperda*, gusano militar del otoño; *Spodoptera cosmioidea*; *Spodoptera eridania*; *Helicoverpa zea*, gusano de la espiga del maíz; *Colaspis brunnea*, colaspis de la uva; *Lissorhoptrus oryzophilus*, gorgojo del agua del arroz; *Sitophilus oryzae*, gorgojo del arroz; *Nephotettix nigropictus*, saltahojas del arroz; *Blissus leucopterus leucopterus*, chinche; *Acrosternum hilare*, chinche apestosa verde; *Chilu suppressalis*, barrenador asiático del arroz; Soja: *Pseudoplusia includens*, gusano barrenador de la soja; *Anticarsia gemmatilis*, oruga del frijol terciopelo; *Plathypena scabra*, gusano verde del trébol; *Ostrinia nubilalis*, barrenador europeo del maíz; *Agrotis ipsilon*, gusano cortador negro; *Spodoptera exigua*, gusano cogollero de la remolacha; *Spodoptera cosmioidea*; *Spodoptera eridania*; *Heliothis virescens*, gusano cogollero del algodón; *Helicoverpa zea*, gusano cogollero del algodón; *Epilachna varivestis*, escarabajo mexicano de la judía; *Myzus persicae*, pulgón verde del melocotonero; *Empoasca fabae*, chicharrita de la patata; *Acrosternum hilare*, chinche apestosa verde; *Melanoplus femurrubrum*, saltamontes de patas rojas; *Melanoplus differentialis*, saltamontes diferencial; *Hylemya platura*, gusano de la semilla; *Sericothrips variabilis*, trips de la soja; *Thrips tabaci*, trips de la cebolla; *Tetranychus turkestanii*, araña roja de la fresa; *Tetranychus urticae*, araña roja de la cebada; *Ostrinia nubilalis*, barrenador europeo del maíz; *Agrotis ipsilon*, gusano cortador negro; *Schizaphis graminum*, chinche verde; *Blissus leucopterus leucopterus*, chinche del maíz; *Acrosternum hilare*, chinche apestosa verde; *Euschistus servus*, chinche apestosa marrón; *Euschistus heros*, chinche apestosa marrón neotropical; *Delia platura*, gusano del maíz de siembra; *Mayetiola destructor*, mosca de Hesse; *Petrobia latens*, ácaro marrón del trigo; Colza oleaginosa: *Brevicoryne brassicae*, pulgón de la col; *Phyllotreta cruciferae*, escarabajo de la pulga; *Mamestra configurata*, gusano militar de Bertha; *Plutella xylostella*, polilla dorso de diamante; *Delia* spp., gusanos de la raíz.

#### Procedimientos para aumentar el rendimiento de las plantas

Se proporcionan procedimientos para aumentar el rendimiento de las plantas. Los procedimientos comprenden proporcionar una planta o célula vegetal que exprese un polinucleótido que codifique la secuencia del polipéptido pesticida aquí divulgado y cultivar la planta o una semilla de la misma en un campo infestado con (o susceptible de infestación por) una plaga contra la que dicho polipéptido tenga actividad pesticida. El polipéptido tiene actividad plaguicida contra una plaga de lepidópteros, coleópteros, dípteros o nematodos, y dicho campo está infestado por una plaga de lepidópteros, hemípteros, coleópteros, dípteros o nematodos. Tal y como se define aquí, el "rendimiento" de la planta se refiere a la calidad y/o cantidad de biomasa producida por la planta. Por "biomasa" se entiende cualquier producto vegetal medido. Un aumento en la producción de biomasa es cualquier mejora en el rendimiento del producto vegetal medido. Aumentar el rendimiento de las plantas tiene varias aplicaciones comerciales. Por ejemplo, el aumento de la biomasa de las hojas de las plantas puede incrementar el rendimiento de las hortalizas de hoja verde para consumo humano o animal. Además, el aumento de la biomasa foliar puede utilizarse para incrementar la producción de productos farmacéuticos o industriales derivados de plantas. Un aumento del rendimiento puede comprender cualquier aumento estadísticamente significativo que incluya, entre otros, al menos un aumento del 1%, al menos un aumento del 3%, al menos un aumento del 5%, al menos un aumento del 10%, al menos un aumento del 20%, al menos un aumento del 30%, al menos un aumento del 50%, al menos un aumento del 70%, al menos un aumento del 100% o un aumento mayor del rendimiento en comparación con una planta que no exprese la secuencia pesticida. En procedimientos específicos, el rendimiento de la planta se incrementa como resultado de la mejora de la resistencia a las plagas de una planta que expresa una proteína pesticida divulgada en el presente documento. La expresión de la proteína pesticida reduce la capacidad de la plaga para infestar o alimentarse.

Las plantas también pueden ser tratadas con una o más composiciones químicas, incluyendo uno o más herbicidas, insecticidas o fungicidas. Las composiciones químicas ejemplares incluyen: Frutas y verduras Herbicidas: Atrazina, Bromacil, Diurón, Glifosato, Linurón, Metribuzin, Simazina, Trifluralina, Fluazifop, Glufosinato, Halosulfurón Gowan, Paraquat, Propizamida, Setoxidim, Butafenacil, Halosulfurón, Indaziflam; Insecticidas para frutas y verduras: Aldicarb, Bacillus thuringiensis, Carbaril, Carbofurano, Clorpirifos, Cipermetrina, Deltametrina, Abamectina, Ciflutrina/beta-ciflutrina, Esfenvalerato, Lambda-cialotrina, Acequinocilo, Bifenazato, Metoxifenoza, Novalurón, Cromafenoza,

Tiacloprid, Dinotefurano, Fluacipirima, Espirodiclofeno, Gamma-cialotrina, Spiromesifen, Spinosad, Rynaxypyr, Cyazopyr, Triflumurón, Spirotetramat, Imidacloprid, Flubendiamide, Thiodicarb, Metaflumizone, Sulfoxaflor, Cyflumetofen, Cyanopyrafen, Clothianidin, Thiamethoxam, Spinotoram, Thiodicarb, Fonicamid, Methiocarb, Emamectin-benzoate, Indoxacarb, Fenamiphos, Pyriproxifen, Fenbutatin-oxid; Fungicidas para frutas y hortalizas: Ametoctradin, Azoxystrobin, Benthiavalicarb, Boscalid, Captan, Carbendazim, Chlorothalonil, Copper, Cyazofamid, Cyflufenamid, Cymoxanil, Cyproconazole, Cyprodinil, Difenconazole, Dimetomorfo, Ditianón, Fenamidona, Fenhexamida, Fluazinam, Fludioxonil, Flupicolida, Fluopiram, Fluoxastrobina, Fluxaproxad, Folpet, Fosetil, Iprodiona, Iprovalicarb, Isopirazam, Kresoxim-metilo, Mancozeb, Mandipropamid, Metalaxil/mefenoxam, Metiram, Metrafenona, Miclobutanil, Penconazol, Penthiopirad, Picoxistrobina, Propamocarb, Propiconazol, Propineb, Proquinazid, Prothioconazol, Piraclostrobina, Pirimetanil, Quinoxifeno, Espiroxamina, Azufre, Tebuconazol, Tiofanato-metil, Trifloxistrobina; Herbicidas para cereales: 2,4-D, Amidosulfurón, Bromoxinil, Carfentrazona-E, Clorotolurón, Clorsulfurón, Clodinafop-P, Clopiralida, Dicamba, Diclofop-M, Diflufenicán, Fenoxaprop, Florasulam, Flucarbazona-NA, Flufenacet, Flupirosulfurón-M, Fluroxipir, Flurtamona, Glifosato, Iodosulfurón, Ioxinil, Isoproturón, MCPA, Mesosulfurón, Metsulfurón, Pendimetalina, Pinoxaden, Propoxicarbazona, Prosulfocarb, Piroxulam, Sulfosulfurón, Tifensulfurón, Traloxidim, Triasulfurón, Tribenurón, Trifluralina, Tritosulfurón; Fungicidas para cereales: Azoxistrobina, Bixafen, Boscalid, Carbendazim, Chlorothalonil, Cyflufenamid, Cyproconazole, Cyprodinil, Dimoxystrobin, Epoxiconazole, Fenpropidin, Fenpropimorph, Fluopyram, Fluoxastrobina, Fluquinconazole, Fluxapyroxad, Isopyrazam, Kresoxim-metilo, Metconazol, Metrafenona, Penthiopirad, Picoxistrobina, Procloraz, Propiconazol, Proquinazid, Prothioconazol, Piraclostrobina, Quinoxifeno, Espiroxamina, Tebuconazol, Tiofanato-metilo, Trifloxistrobina; Insecticidas para cereales: Dimetoato, lambda-cihaltrina, deltametrina, alfa-cipermetrina, beta-ciflutrina, bifentrina, imidacloprid, clotianidina, tiametoxam, tiacloprid, acetamiprid, dinotefurano, clorpirifos, pirimicarb, metiocarb, sulfoxaflor; herbicidas para el maíz: Atrazina, alacloro, bromoxinil, acetocloro, dicamba, clopiralida, (S-)dimetenamida, glufosinato, glifosato, isoxaflutol, (S-)metolaclo, mesotriona, nicosulfurón, primisulfurón, rimsulfurón, sulcotriona, foramsulfurón, topramezona, tembotriona, saflufenacil, tienocarbazona, flufenacet, piroxasulfon; Insecticidas para el maíz: Carbofurano, clorpirifos, bifentrina, fipronil, imidacloprid, lambda-cialotrina, teflutrina, terbufos, tiametoxam, clotianidina, espiromesifeno, flubendiamida, triflumurón, Rynaxypyr, Deltamethrin, Thiodicarb, beta-Cyfluthrin, Cypermethrin, Bifenthrin, Lufenuron, Tebupirimfos, Ethiprole, Cyazopyr, Thiacloprid, Acetamiprid, Dinotefuran, Avermectin; Fungicidas para el maíz: Azoxistrobina, Bixafen, Boscalid, Ciproconazol, Dimoxistrobina, Epoxiconazol, Fenitropan, Fluopiram, Fluoxastrobina, Fluxaproxad, Isopirazam, Metconazol, Penthiopirad, Picoxistrobina, Propiconazol, Prothioconazol, Piraclostrobina, Tebuconazol, Trifloxistrobina; Herbicidas para el arroz: Butacloro, Propanil, Azimsulfurón, Bensulfurón, Cihalofop, Daimurón, Fentrazamida, Imazosulfurón, Mefenacet, Oxaziclomefona, Pirazosulfurón, Piributicarb, Quinclorac, Tiobencarb, Indanofán, Flufenacet, Fentrazamida, Halosulfurón, Oxaziclomefona, Benzobiciclón, Pirifitalida, Penoxsulam, Bispiribac, Oxadiargilo, Etoxisulfurón, Pretilacloro, Mesotriona, Tefuriltriona, Oxadiazona, Fenoxaprop, Pirimisulfán; Insecticidas para el arroz: Diazinón, Fenobucarb, Benfuracarb, Buprofezina, Dinotefuran, Fipronil, Imidacloprid, Isoprocarb, Tiacloprid, Cromafnozida, Clotianidina, Etiprol, Flubendiamida, Rynaxypyr, Deltametrina, Acetamiprid, Tiametoxam, Cyazopyr, Spinosad, Spinotoram, Emamectin-Benzoato, Cipermetrina, Clorpirifos, Etofenprox, Carbofurano, Benfuracarb, Sulfoxaflor; Fungicidas para el arroz: Azoxistrobina, Carbendazima, Carpropamid, Diclocymet, Difenconazol, Edifenfos, Ferimzona, Gentamicina, Hexaconazol, Hymexazol, Iprobenfos (IBP), Isoprotiolano, Isotianil, Kasugamicina, Mancozeb, Metominostrobin, Orysastrobin, Pencycuron, Probenazole, Propiconazole, Propineb, Pyroquilon, Tebuconazole, Thiophanate-methyl, Tiadinil, Tricyclazole, Trifloxystrobin, Validamycin; Herbicidas para el algodón: Diurón, Fluometurón, MSMA, Oxifluorfen, Prometrina, Trifluralina, Carfentrazona, Cletodim, Fluazifop-butilo, Glifosato, Norflurazón, Pendimetalina, Piritibac-sodio, Trifloxisulfurón, Tepraloxidim, Glufosinato, Flumioxazina, Tidiazurón; Insecticidas para el algodón: Acefato, Aldicarb, Clorpirifos, Cipermetrina, Deltametrina, Abamectina, Acetamiprid, Benzoato de emamectina, Imidacloprid, Indoxacarb, Lambda-cihalotrina, Espinosad, Tiodicarb, Gamma-cihalotrina, Spiromesifeno, Piridaliil, Fonicamida, Flubendiamida, Triflumurón, Rynaxipir, Beta-ciflutrina, Spirotetramat, clotianidina, tiametoxam, tiacloprid, dinotefurano, flubendiamida, ciazipir, espinosad, espinotoram, gammacialotrina, 4-[[[6-clorpiridin-3-il)metil]](2,2-difluoroetil)amino]furano-2(5H)-on, tiodicarb, avermectina, fonicamid, piridaliil, espiromesifeno, sulfoxaflor; Fungicidas para el algodón: Azoxistrobina, Bixafeno, Boscalid, Carbendazima, Clorotalonil, Cobre, Ciproconazol, Difenconazol, Dimoxistrobina, Epoxiconazol, Fenamidona, Fluazinam, Fluopiram, Fluoxastrobina, Fluxaproxad, Iprodiona, Isopirazam, Isotianil, Mancozeb, Maneb, Metominostrobin, Penthiopirad, Picoxystrobin, Propineb, Prothioconazole, Pyraclostrobin, Quintozene, Tebuconazole, Tetraconazole, Thiophanate-methyl, Trifloxystrobin; Herbicidas para la soja: Alacloro, Bentazona, Trifluralina, Clorimurón-etilo, Cloransulam-metilo, Fenoxaprop, Fomesafén, Fluazifop, Glifosato, Imazamox, Imazaquin, Imazetapir, (S-)Metolaclo, Metribuzin, Pendimetalina, Tepraloxidim, Glufosinato; Insecticidas para soja: Lambda-cihalotrina, metomilo, imidacloprid, clotianidina, tiametoxam, tiacloprid, acetamiprid, dinotefurano, flubendiamida, rinaxipir, ciazipir, espinosad, espinotoram, benzoato de emamectina, fipronil, etiprol, Deltametrina, beta-ciflutrina, gamma y lambda cihalotrina, 4-[[[6-clorpiridin-3-il)metil]](2,2-difluoroetil)amino]furano-2(5H)-on, espirotetramat, espirodiclofeno, triflumurón, fonicamida, tiodicarb, beta-ciflutrina; Fungicidas para la soja: Azoxistrobina, Bixafen, Boscalid, Carbendazim, Chlorothalonil, Cobre, Cyproconazole, Difenconazole, Dimoxystrobin, Epoxiconazole, Fluazinam, Fluopyram, Fluoxastrobina, Flutriafol, Fluxapyroxad, Isopyrazam, Iprodione, Isotianil, Mancozeb, Maneb, Metconazol, Metominostrobin, Myclobutanil, Penthiopirad, Picoxystrobin, Propiconazole, Propineb, Prothioconazole, Pyraclostrobin, Tebuconazole, Tetraconazole, Thiophanate-methyl, Trifloxystrobin; Herbicidas para remolacha azucarera: Cloridazón, Desmedifam, Etofumesato, Fenmedifam, Trialato, Clopiralida, Fluazifop, Lenacil, Metamitrón, Quinmerac, Cicloxidim, Triflusulfurón, Tepraloxidim,

5 Quizalofop; Insecticidas para remolacha azucarera: Imidacloprid, clotianidina, tiametoxam, tiacloprid, acetamiprid, dinetofurano, deltametrina,  $\beta$ -ciflutrina, gamma/lambda cihalotrina, 4-[[[(6-clorpiridin-3-il)metil](2,2-difluoroetil)amino]furano-2(5H)-on, teflutrina, rinaxipir, ciaxipir, fipronil, carbofurano; Herbicidas para la colza: Clopiralida, diclofop, fluazifop, glufosinato, glifosato, metazacloro, trifluralina, etametsulfurón, quinmerac, 10 quizalofop, cletodim, tepraloxidim; fungicidas para la colza: Azoxistrobin, Bixafen, Boscalid, Carbendazim, Cyproconazole, Difenoconazole, Dimoxystrobin, Epoxiconazole, Fluazinam, Fluopyram, Fluoxastrobin, Flusilazole, Fluxapyroxad, Iprodione, Isopyrazam, Mepiquat-cloruro, Metconazole, Metominostrobin, Paclobutrazole, Penthiopyrad., Picoxistrobina, Procloraz, Protiocanazol, Piraclostrobin, Tebuconazol, Tiofanato-metil, Trifloxistrobina, Vinclozolina; Insecticidas para colza: Carbofurano, tiacloprid, deltametrina, imidacloprid, clotianidina, 15 tiametoxam, acetamiprid, dinetofurano,  $\beta$ -ciflutrina, gamma y lambda cihalotrina, tau-Fluvaleriate, Ethiprole, Spinosad, Spinotoram, Flubendiamide, Rynaxypyr, Cyazypyr, 4-[(6-Chlorpyridin-3-yl)methyl](2,2-difluorethyl)amino]furan-2(5H)-on.

#### Procedimientos de introducción de un gen de la invención en otra planta

15 También se proporcionan procedimientos para introducir el ácido nucleico de la invención en otra planta. El ácido nucleico de la invención, o un fragmento del mismo, puede introducirse en una segunda planta mediante selección recurrente, retrocruzamiento, cría por pedigrí, selección de línea, selección masiva, cría por mutación y/o selección potenciada por marcadores genéticos.

20 Así, en una realización, los procedimientos de la divulgación comprenden cruzar una primera planta que comprende un ácido nucleico de la invención con una segunda planta para producir plantas de progenie F1 y seleccionar plantas de progenie F 1 que comprenden el ácido nucleico de la invención. Los procedimientos pueden comprender además cruzar las plantas progenitoras seleccionadas con la primera planta que comprende el ácido nucleico de la invención para producir plantas progenitoras retrocruzadas y seleccionar plantas progenitoras retrocruzadas que comprendan el ácido nucleico de la invención. Los procedimientos de evaluación de la actividad plaguicida se describen en el presente documento. Los procedimientos pueden comprender además la repetición de estos pasos una o más veces 25 en sucesión para producir plantas seleccionadas de segunda o superior progenie de retrocruzamiento que comprenden el ácido nucleico de la invención.

30 Cualquier procedimiento de mejora que implique la selección de plantas para el fenotipo deseado puede utilizarse en el procedimiento de la presente divulgación. En algunas realizaciones, las plantas F1 pueden autopolinizarse para producir una generación F2 segregante. A continuación, pueden seleccionarse plantas individuales que representen el fenotipo deseado (por ejemplo, la actividad pesticida) en cada generación (F3, F4, F5, etc.) hasta que los rasgos sean homocigóticos o se fijen dentro de una población de cría.

35 La segunda planta puede ser una planta con un rasgo deseado, como tolerancia a herbicidas, tolerancia a insectos, tolerancia a la sequía, control de nematodos, eficiencia en el uso del agua, eficiencia en el uso del nitrógeno, valor nutricional mejorado, resistencia a enfermedades, fotosíntesis mejorada, calidad de fibra mejorada, tolerancia al estrés, reproducción mejorada y similares. La segunda planta puede ser un evento de élite, tal como se describe en el presente documento

40 En varias realizaciones, las partes de la planta (plantas enteras, órganos de la planta (por ejemplo, hojas, tallos, raíces, etc.), semillas, células vegetales, propágulos, embriones y similares) pueden cosecharse del cruce resultante y propagarse o recogerse para su uso posterior (como alimentos, piensos, biocombustibles, aceite, harina, harina, etc.).

#### Procedimientos de obtención de un producto vegetal

45 La presente invención también se refiere a un proceso para obtener un producto básico, que comprende cosechar y/o moler los granos de un cultivo que comprende un ácido nucleico de la invención para obtener el producto básico. Productos y/o composiciones de materia importantes desde el punto de vista agronómico y comercial, incluidos, entre otros, piensos, materias primas y productos y subproductos vegetales destinados a ser utilizados como 50 alimentos para el consumo humano o en composiciones y materias primas destinadas al consumo humano, en particular, productos de semillas/granos desvitalizados, incluidos los productos (semi)elaborados producidos a partir de tales semillas/granos, en los que dicho producto es o comprende semillas o granos enteros o elaborados, piensos, harina de maíz o soja, harina de maíz o soja, maíz, almidón de maíz, harina de soja, harina de soja, copos, 55 concentrado de proteína de soja, aislados de proteína de soja, concentrado de proteína de soja texturizada, cosméticos, productos para el cuidado del cabello, mantequilla de nueces de soja, natto, tempeh, proteína de soja hidrolizada, cobertura batida, manteca, lecitina, soja entera comestible (cruda, tostada o como edamame), yogur de soja, queso de soja, tofu, yuba, así como grano cocido, pulido, cocido al vapor, cocinados, pulidos, cocidos al vapor, horneados o sancochados, y similares, están incluidos en el ámbito de la presente invención si estos productos y composiciones de materia contienen cantidades detectables de las secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos establecidas en el presente documento como diagnósticas para cualquier planta que contenga dichas secuencias de nucleótidos.

Los siguientes ejemplos se ofrecen a título ilustrativo y no limitativo.

**Ejemplos experimentales**

**Ejemplo 1 Descubrimiento de nuevos genes pesticidas de *Pseudomonas putida***

Se identificaron nuevos genes pesticidas a partir de la cepa bacteriana ATX83556 siguiendo los siguientes pasos:

- 5 • Preparación del ADN total de la cepa. El ADN total contiene tanto ADN genómico como ADN extracromosómico. El ADN extracromosómico contiene una mezcla de algunos o todos los siguientes elementos: plásmidos de diversos tamaños; cromosomas de fagos; otras moléculas extracromosómicas no caracterizadas.
- Secuenciación del ADN. El ADN total se secuencia mediante procedimientos de secuenciación de próxima generación.
- 10 • Identificación de genes putativos de toxinas mediante homología y/u otros análisis computacionales.
- Cuando sea necesario, secuenciación del gen de interés mediante una de las diversas estrategias de PCR o clonación (por ejemplo, TAIL-PCR).

Tabla 1 Nuevo gen identificado en la cepa ATX83556

Nombre del gen	Peso molecular (kD)	Homólogo más cercano	Nucleótido (SEQ ID NO)	Aminoácido SEQ ID NO
Axmi554	31	25% Cry64Aa1	1	4
Axmi554(inicio alto)				5*
				6*
				7*
				8*
				9*
				10*
				11*
*Proteínas codificadas a partir de un sitio de inicio aguas abajo en relación con Axmi554.				

- 15 El gen de la toxina aquí divulgado se amplifica por PCR a partir de pAX980, y el producto de PCR se clona en el vector de expresión de *Bacillus* pAX916, u otro vector adecuado, por procedimientos bien conocidos en la técnica. La cepa de *Bacillus* resultante, que contiene el vector con el gen *axmi*, se cultiva en un medio de crecimiento convencional, como el medio CYS (10 g/l de Bacto-casitona; 3 g/l de extracto de levadura; 6 g/l de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 14 g/l de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,5 mM de MgSO<sub>4</sub>; 0,05 mM de MnCl<sub>2</sub>; 0,05 mM de FeSO<sub>4</sub>), hasta que la esporulación sea evidente mediante examen microscópico. Se preparan muestras y se comprueba su actividad en bioensayos.
- 20

**Ejemplo 2. Ensayos de actividad pesticida**

- 25 Las secuencias de nucleótidos de la invención pueden probarse para determinar su capacidad de producir proteínas pesticidas. La capacidad de una proteína plaguicida para actuar como tal sobre una plaga suele evaluarse de varias maneras. Una forma bien conocida en la técnica es realizar un ensayo de alimentación. En un ensayo de alimentación de este tipo, se expone a la plaga a una muestra que contiene compuestos a ensayar o muestras de control. A menudo esto se lleva a cabo colocando el material a ensayar, o una dilución adecuada de dicho material, sobre un material que la plaga vaya a ingerir, como una dieta artificial. El material a ensayar puede estar compuesto por un líquido, un sólido o un lodo. El material a ensayar puede colocarse sobre la superficie y dejar que se seque. Alternativamente, el material a ensayar puede mezclarse con una dieta artificial fundida y, a continuación, dispensarse en la cámara de ensayo. La cámara de ensayo puede ser, por ejemplo, una taza, un plato o un pocillo de una placa de microtitulación.
- 30

Los ensayos para plagas chupadoras (por ejemplo, áfidos) pueden implicar separar el material de prueba del insecto mediante una partición, idealmente una porción que pueda ser perforada por las partes bucales chupadoras del insecto chupador, para permitir la ingestión del material de prueba. A menudo, el material de prueba se mezcla con un estimulante de la alimentación, como la sacarosa, para promover la ingestión del compuesto de prueba.

- 5 Otros tipos de ensayos pueden incluir la microinyección del material de prueba en la boca o intestino de la plaga, así como el desarrollo de plantas transgénicas, seguido de la prueba de la capacidad de la plaga para alimentarse de la planta transgénica. Las pruebas en plantas pueden implicar el aislamiento de las partes de la planta que normalmente se consumen, por ejemplo, pequeñas jaulas unidas a una hoja, o el aislamiento de plantas enteras en jaulas que contienen insectos.
- 10 Otros procedimientos y enfoques para ensayar plagas son conocidos en la técnica, y pueden encontrarse, por ejemplo en Robertson y Preisler, eds. (1992) *Pesticide bioassays with arthropods*, CRC, Boca Raton, FL. Alternativamente, los ensayos suelen describirse en las revistas *Arthropod Management Tests* y *Journal of Economic Entomology* o mediante conversaciones con miembros de la Entomological Society of America (ESA).

- 15 En algunas realizaciones, las regiones de ADN que codifican la región de toxina de las proteínas pesticidas aquí divulgadas se clonan en el vector de expresión de *E. coli* pMAL-C4x detrás del gen *malE* que codifica la proteína de unión a maltosa (MBP). Estas fusiones in-frame dan lugar a la expresión de proteínas de fusión MBP-Axmi en *E. coli*.

- 20 Para la expresión en *E. coli*, BL21-DE3 se transforman con plásmidos individuales. Se inoculan colonias individuales en LB suplementado con carbenicilina y glucosa, y se cultivan durante la noche a 37°C. Al día siguiente, se inocula medio fresco con el 1% del cultivo de la noche y se hace crecer a 37°C hasta la fase logarítmica. Posteriormente, los cultivos se inducen con 0,3mM IPTG durante toda la noche a 20°C. Cada sedimento celular se suspende en tampón Tris-Cl 20mM, pH 7,4 + 200mM NaCl + 1mM DTT + inhibidores de proteasas y se sonicó. El análisis por SDS-PAGE puede utilizarse para confirmar la expresión de las proteínas de fusión.

- 25 A continuación, los extractos totales libres de células se pasan por una columna de amilosa unida a una cromatografía líquida de proteínas rápida (FPLC) para la purificación por afinidad de las proteínas de fusión MBP-axmi. Las proteínas de fusión unidas se eluyen de la resina con una solución de maltosa 10mM. A continuación, las proteínas de fusión purificadas se escinden con Factor Xa o tripsina para eliminar la etiqueta MBP aminoterminal de la proteína Axmi. El desdoblamiento y la solubilidad de las proteínas pueden determinarse mediante SDS-PAGE

### Ejemplo 3. Expresión y purificación

- 30 Axmi554.1 y Axmi554.2 fueron expresados y ensayados para bioactividad. Se sintetizaron genes optimizados de *E. coli* (SEQ ID NO:2 y 3, respectivamente, que codifican las secuencias de aminoácidos establecidas en SEQ ID NO:4 y 5, respectivamente) para su expresión y se clonaron en un vector de expresión pMalC4X. Los clones se confirmaron mediante secuenciación. pGen554-1 y pGen554-2 se transformaron en células competentes BI21 para la expresión de las proteínas. Se inoculó una sola colonia de cada placa recién transformada en medio LB y se cultivó a 37°C hasta la fase logarítmica, y se indujo con 1 mM de IPTG a 18°C durante 18 horas. Axmi554.1 y Axmi554.2 purificados se sometieron a bioensayo frente a plagas de insectos seleccionadas según el protocolo estándar. Los resultados se muestran en la Tabla 4.

Tabla 1 Actividad de Axmi554.1

Grupo de plagas	Puntuación de retraso	Porcentaje de mortalidad
<i>Spodoptera frugiperda</i> (FAW)	0,66	0 %
<i>Heliothis virescens</i> (Hv)	4	0 %
<i>Helicoverpa zea</i> (Hz)	2	0 %
<i>Anticarsia gemmatalis</i> (VBC)	4	100 %
<i>Agrotis ipsilon</i> (BCW)	0,5	0 %
<i>Plutella xylostella</i> (DBM)	4	100 %
<i>Diatraea grandiosella</i> (SWCB)	3	66 %

ES 2 954 940 T3

Grupo de plagas	Puntuación de retraso	Porcentaje de mortalidad
<i>Diatraea crambidoides</i> (SCB)	3,7	75 %
<i>Spodoptera exigua</i> (BAW)	3	58 %
<i>Chrysodeixis includens</i> (SBL)	1,7	0 %
<i>L. hesperus</i>	4	100 %
<i>Halyomorpha halys</i> (BMSB)	2	100 %
<i>Helicoverpa armigera</i> (Ha)	4	100 %
<i>Myzus persicae</i> (GPA)	4	100 %
<i>Aphis glycines</i> (SBA)	4	100 %
<i>Nilaparvata lugens</i> (HPB)	2	50 %
<i>Nezara viridula</i> (SGSB)	4	100 %
<i>Euschistus servus</i> (BSB)	4	100 %
<i>Anthonomus grandis</i>	4	75 %

Tabla 2 Actividad de Axmi554.1

Grupo de plagas	Puntuación de daños en hojas
<i>Leptinotarsa decemlineata</i> (CPB)	3,5

Tabla 3: Actividad de Axmi554.2

Grupo de plagas	Puntuación de retraso	Porcentaje de mortalidad
<i>Spodoptera frugiperda</i> (FAW)	1,7	6 %
<i>Heliothis virescens</i> (Hv)	4	16 %
<i>Helicoverpa zea</i> (Hz)	2,3	0 %
<i>Anticarsia gemmatalis</i> (VBC)	4	100 %
<i>Agrotis ipsilon</i> (BCW)	1	0 %
<i>Plutella xylostella</i> (DBM)	4	100 %
<i>Diatraea grandiosella</i> (SWCB)	2,7	66 %
<i>Diatraea crambidoides</i> (SCB)	2	42 %
<i>Spodoptera exigua</i> (BAW)	2,7	66 %

Grupo de plagas	Puntuación de retraso	Porcentaje de mortalidad
<i>Chrysodeixis includens</i> (SBL)	3	16 %
<i>L. hesperus</i>	4	100 %
<i>Halyomorpha halys</i> (BMSB)	2	100 %
<i>Helicoverpa armigera</i> (Ha)	4	100 %
<i>Myzus persicae</i> (GPA)	4	100 %
<i>Aphis glycines</i> (SBA)	4	100 %
<i>Nilaparvata lugens</i> (HPB)	2	50 %
<i>Nezara viridula</i> (SGSB)	4	100 %
<i>Euschistus servus</i> (BSB)	4	100 %
<i>Anthonomus grandis</i>	4	75 %

Tabla 4 Actividad de Axmi554.2

Grupo de plagas	Puntuación de daños en hojas
<i>Leptinotarsa decemlineata</i> (CPB)	3,3

#### **Ejemplo 4. Vectorización de genes para su expresión en plantas**

5 Las regiones codificantes de la invención están conectadas con secuencias promotoras y terminadoras apropiadas para la expresión en plantas. Tales secuencias son bien conocidas en la técnica y pueden incluir el promotor de actina del arroz o el promotor de ubiquitina del maíz para la expresión en monocotiledóneas, el promotor UBQ3 de *Arabidopsis* o el promotor CaMV 35S para la expresión en dicotiledóneas, y los terminadores nos o PinII. Las técnicas para producir y confirmar construcciones promotor - gen - terminador también son bien conocidas en la técnica.

10 En un aspecto de la invención, se diseñan y generan secuencias sintéticas de ADN. Estas secuencias sintéticas tienen una secuencia de nucleótidos alterada con respecto a la secuencia original, pero codifican proteínas que son esencialmente idénticas a la secuencia original.

15 En otro aspecto de la invención, se diseñan versiones modificadas de los genes sintéticos de forma que el péptido resultante se dirija a un orgánulo vegetal, como el retículo endoplásmico o el apoplasto. Las secuencias peptídicas que permiten dirigir las proteínas de fusión a orgánulos vegetales son conocidas en la técnica. Por ejemplo, la región N-terminal del gen de la fosfatasa ácida del altramuz blanco *Lupinus albus* (GENBANK® ID GI:14276838, Miller et al. (2001) Fisiología vegetal 127: 594-606) es conocido en la técnica por dar lugar a la orientación de proteínas heterólogas al retículo endoplásmico. Si la proteína de fusión resultante también contiene una secuencia de retención del retículo endoplásmico que comprende el péptido N-terminal-lisina-ácido aspártico-ácido glutámico-leucina (es decir, el motivo "KDEL", SEQ ID NO:11) en el C-terminal, la proteína de fusión se dirigirá al retículo endoplásmico. Si la proteína de fusión carece de una secuencia dirigida al retículo endoplásmico en el extremo C-terminal, la proteína se dirigirá al retículo endoplásmico, pero finalmente quedará secuestrada en el apoplasto.

20 Así, este gen codifica una proteína de fusión que contiene los treinta y un aminoácidos N-terminales del gen de la fosfatasa ácida del altramuz blanco *Lupinus albus* (GENBANK® ID GI:14276838, Miller et al., 2001, supra) fusionados al N-terminal de la secuencia de aminoácidos de la invención, así como la secuencia KDEL (SEQ ID NO:11) en el C-terminal. Por lo tanto, se prevé que la proteína resultante se dirija al retículo endoplásmico de la planta tras su expresión en una célula vegetal.

25 Los casetes de expresión vegetal descritos anteriormente se combinan con un marcador vegetal seleccionable apropiado para ayudar en la selección de células y tejidos transformados, y se ligan en vectores de transformación

30

vegetal. Estos pueden incluir vectores binarios de transformación mediada por *Agrobacterium* o vectores plasmídicos simples para la transformación por aerosol o biolística.

#### **Ejemplo 5. Transformación de la soja**

5 La transformación de la soja se consigue utilizando procedimientos bien conocidos en la técnica, como el descrito utilizando la transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* de explantes de media semilla de soja utilizando esencialmente el procedimiento descrito por Paz et al. (2006), Plant cell Rep. 25:206. Los transformantes se identifican utilizando tembotriona como marcador de selección. Se observó la aparición de brotes verdes y se documentó como indicador de tolerancia al herbicida isoxaflutol o tembotriona. Los brotes transgénicos tolerantes 10 mostrarán un enverdecimiento normal comparable al de los brotes de soja de tipo silvestre no tratados con isoxaflutol o tembotriona, mientras que los brotes de soja de tipo silvestre tratados con la misma cantidad de isoxaflutol o tembotriona se blanquearán por completo. Esto indica que la presencia de la proteína HPPD permite la tolerancia a herbicidas inhibidores de la HPPD, como el isoxaflutol o la tembotriona.

15 Los brotes verdes tolerantes se transfieren a medios de enraizamiento o se injertan. Las plántulas enraizadas se trasladan al invernadero tras un periodo de aclimatación. A continuación, las plantas que contienen el transgén se rocían con herbicidas inhibidores de HPPD, como por ejemplo con tembotriona a una dosis de 100 g Al/ha o con mesotriona a una dosis de 300 g Al/ha complementado con aceite de colza de éster metílico de sulfato de amonio. Diez días después de la aplicación se evalúan los síntomas debidos a la aplicación del herbicida y se comparan con los síntomas observados en plantas de tipo silvestre en las mismas condiciones.

#### **Ejemplo 6: Establecimiento y selección de plantas T0 de algodón.**

20 La transformación del algodón se consigue utilizando procedimientos bien conocidos en la técnica, procedimiento especialmente preferido en el descrito en la Publicación de patente PCT WO 00/71733. Las plantas regeneradas se trasladan al invernadero. Tras un periodo de aclimatación, las plantas suficientemente crecidas se rocían con herbicidas inhibidores de HPPD como, por ejemplo, tembotriona equivalente a 100 o 200 gAl/ha complementado con sulfato de amonio y aceite de colza éster metílico. Siete días después de la aplicación de la pulverización, se 25 evalúan los síntomas debidos al tratamiento con el herbicida y se comparan con los síntomas observados en plantas de algodón de tipo silvestre sometidas al mismo tratamiento en las mismas condiciones.

#### **Ejemplo 7. Transformación de células de maíz con los genes de proteínas pesticidas descritos en el presente documento**

30 Las mazorcas de maíz se recogen mejor 8-12 días después de la polinización. Los embriones se aíslan de las mazorcas, y se prefieren los de 0,8-1,5 mm de tamaño para utilizarlos en la transformación. Los embriones se colocan con el escutelo hacia arriba en un medio de incubación adecuado, como el medio DN62A5S (3,98 g/L de sales N6; 1 mL/L (de 1000x Stock) de vitaminas N6; 800 mg/L de L-asparagina; 100 mg/L de mio-inositol; 1,4 g/L de L-prolina; 100 mg/L de casaminoácidos; 50 g/L de sacarosa; 1 mL/L (de 1 mg/mL Stock) de 2,4-D). Sin embargo, otros medios y sales distintos del DN62A5S son adecuados y conocidos en la técnica. Los embriones se incuban 35 toda la noche a 25 °C en la oscuridad. Sin embargo, no es necesario de *por sí* incubar los embriones durante la noche.

Los explantes resultantes se transfieren a cuadrados de malla (30-40 por placa), se transfieren a un medio osmótico durante unos 30-45 minutos y, a continuación, se transfieren a una placa de irradiación (véase, por ejemplo, Publicación PCT No. WO/0138514 y Patente estadounidense n.º 5.240.842).

40 Las construcciones de ADN diseñadas para los genes de la invención en células vegetales se aceleran en el tejido vegetal utilizando un acelerador de haz de aerosol, utilizando condiciones esencialmente como las descritas en Publicación PCT n.º WO/0138514. Tras la irradiación, los embriones se incuban durante unos 30 minutos en un medio osmótico y se colocan en un medio de incubación durante toda la noche a 25 °C en la oscuridad. Para evitar dañar indebidamente los explantes irradiados, se incuban durante al menos 24 horas antes de transferirlos a los 45 medios de recuperación. A continuación, los embriones se extienden en un medio para el período de recuperación, durante unos 5 días, a 25 °C en la oscuridad, y luego se transfieren a un medio de selección. Los explantes se incuban en medios de selección durante un máximo de ocho semanas, dependiendo de la naturaleza y las características de la selección concreta utilizada. Tras el periodo de selección, el callo resultante se transfiere a un medio de maduración de embriones, hasta que se observa la formación de embriones somáticos maduros. A 50 continuación, los embriones somáticos maduros resultantes se colocan bajo luz tenue y se inicia el proceso de regeneración por procedimientos conocidos en la técnica. Los brotes resultantes se dejan enraizar en medios de enraizamiento, y las plantas resultantes se transfieren a macetas de vivero y se propagan como plantas transgénicas.

#### **Materiales:**

55 Medios DN62A5S

Componente	Por litro	Fuente
Mezcla de sales basal N6 Chu (Prod. No. C 416)	3,98 g/L	Laboratorios de fitotecnología
Solución Vitamínica N6 Chu (Prod. No. C 149)	1 mL/L (de 1000x Stock)	Laboratorios de fitotecnología
L-Asparagina	800 mg/L	Laboratorios de fitotecnología
Mio-inositol	100 mg/L	Sigma
L-Prolina	1,4 g/L	Laboratorios de fitotecnología
Casaminoácidos	100 mg/L	Fisher Scientific
sacarosa	50 g/L	Laboratorios de fitotecnología
2,4-D (Prod. No. D-7299)	1 mL/L (de 1 mg/mL Stock)	Sigma

5 [0156] El pH de la solución se ajusta a pH 5,8 con 1N KOH/1N KCl, se añade Gelrite (Sigma) a una concentración de hasta 3g/L, y el medio se esteriliza en autoclave. Tras enfriar a 50°C, se añaden 2 ml/L de una solución madre de 5 mg/ml de nitrato de plata (Phytotechnology Labs).

**Ejemplo 8. Transformación de genes de la invención en células vegetales mediante transformación mediada por *Agrobacterium***

10 Las espigas se recogen mejor 8-12 días después de la polinización. Los embriones se aíslan de las mazorcas, y se prefieren los de 0,8-1,5 mm de tamaño para utilizarlos en la transformación. Los embriones se colocan con el escutelo hacia arriba en un medio de incubación adecuado y se incuban toda la noche a 25 °C en la oscuridad. Sin embargo, no es necesario de *por sí* incubar los embriones durante la noche. Los embriones se ponen en contacto con una cepa de *Agrobacterium* que contenga los vectores apropiados para la transferencia mediada por plásmidos Ti durante unos 5-10 minutos y, a continuación, se siembran en medios de co-cultivo durante unos 3 días (22°C en la oscuridad). Tras el co-cultivo, los explantes se transfieren a medios de período de recuperación durante 5-10 días (a 25°C en la oscuridad). Los explantes se incuban en medios de selección durante un máximo de ocho semanas, dependiendo de la naturaleza y las características de la selección concreta utilizada. Tras el período de selección, el callo resultante se transfiere a un medio de maduración de embriones, hasta que se observa la formación de embriones somáticos maduros. A continuación, los embriones somáticos maduros resultantes se colocan bajo luz tenue y se inicia el proceso de regeneración tal y como se conoce en la técnica.

20 **Ejemplo 9. Transformación del arroz**

25 Las semillas inmaduras de arroz, que contienen embriones en la fase de desarrollo adecuada, se recogen de plantas donantes cultivadas en condiciones bien controladas en invernadero. Tras la esterilización de las semillas, se extirpan los embriones inmaduros y se preinducen en un medio sólido durante 3 días. Tras la preinducción, los embriones se sumergen durante varios minutos en una suspensión de *Agrobacterium* que alberga los vectores deseados. A continuación, los embriones se cocultivan en un medio sólido que contiene acetosiringona y se incuban en la oscuridad durante 4 días. A continuación, los explantes se transfieren a un primer medio selectivo que contiene fosfotricina como agente selectivo. Transcurridas aproximadamente 3 semanas, las escutelas con callo en desarrollo se cortaron en varios trozos más pequeños y se transfirieron al mismo medio selectivo. Los subcultivos posteriores se realizan aproximadamente cada 2 semanas. Tras cada subcultivo, los callos en crecimiento activo se cortan en trozos más pequeños y se incuban en un segundo medio selectivo. Tras varias semanas, los callos claramente resistentes a la fosfotricina se transfieren a un medio de regeneración selectivo. Las plántulas generadas se cultivan en MS de media fuerza para su elongación completa. Finalmente, las plantas se transfieren al suelo y se cultivan en el invernadero.

Todas las publicaciones y solicitudes de patentes mencionadas en la memoria descriptiva son indicativas del nivel de conocimientos de los expertos en la materia a la que pertenece esta invención.

Aunque la invención anterior se ha descrito con cierto detalle a modo de ilustración y ejemplo con fines de claridad de comprensión, será obvio que ciertos cambios y modificaciones pueden practicarse dentro del alcance de las reivindicaciones anexas.

5

## REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ácido nucleico recombinante que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene actividad plaguicida, en la que dicha secuencia de nucleótidos se selecciona del grupo que consiste en:
- 5 a) la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:3;  
 b) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:4 o SEQ ID NO:5;  
 c) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos un 96 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:4 o SEQ ID NO:5, en la que el polipéptido tiene actividad tóxica contra más de una plaga, incluidos miembros de los órdenes *Lepidoptera*, *Diptera* y *Coleoptera* o del filo *Nematoda*.
- 10 2. La molécula de ácido nucleico recombinante de la reivindicación 1, en la que dicha secuencia de nucleótidos
- i) es una secuencia sintética que ha sido diseñada para su expresión en una planta, o  
 ii) está operablemente unida a un promotor capaz de dirigir la expresión de dicha secuencia nucleotídica en una célula vegetal.
- 15 3. Un vector que comprende la molécula de ácido nucleico recombinante de la reivindicación 1, que opcionalmente comprende además una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido heterólogo.
4. Una célula huésped que contiene el ácido nucleico recombinante de la reivindicación 1, en la que el ácido nucleico recombinante se refiere a un ácido nucleico que ya no se encuentra en su entorno natural.
- 20 5. La célula huésped de la reivindicación 4 que es una célula huésped bacteriana.
6. La célula huésped de la reivindicación 4 que es una célula vegetal.
7. Una planta transgénica que comprende la célula huésped de la reivindicación 6, opcionalmente en la que dicha planta se selecciona del grupo que consiste en maíz, sorgo, trigo, col, girasol, tomate, crucíferas, pimientos, patata, algodón, arroz, soja, remolacha azucarera, caña de azúcar, tabaco, cebada y colza oleaginosa.
- 25 8. Una semilla transgénica que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1.
9. Un polipéptido recombinante con actividad insecticida, seleccionado del grupo que consiste en:
- a) un polipéptido que comprenda la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:4 o SEQ ID NO:5; y  
 b) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos un 96% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO:4 o SEQ ID NO:5, en el que el polipéptido tiene actividad tóxica contra más de una plaga, incluidos miembros de los órdenes *Lepidoptera*, *Diptera* y *Coleoptera* o del filo *Nematoda*; opcionalmente comprende además secuencias de aminoácidos heterólogas.
- 30 10. Una composición que comprende el polipéptido de la reivindicación 9.
11. La composición de la reivindicación 10, en la que dicha composición
- i) se selecciona del grupo formado por polvo, polvo fino, bolitas, gránulos, aerosol, emulsión, coloide y solución, o  
 ii) se prepara por desecación, liofilización, homogeneización, extracción, filtración, centrifugación, sedimentación o concentración de un cultivo de células bacterianas.
- 35 12. La composición de la reivindicación 10, que comprende de aproximadamente 1% a aproximadamente 99% en peso de dicho polipéptido.
- 40 13. Un procedimiento para controlar una población de plagas de lepidópteros, hemípteros, coleópteros, nematodos o dípteros que comprende el contacto de dicha población con una cantidad plaguicida eficaz del polipéptido de la reivindicación 9.
- 45 14. Un procedimiento para matar una plaga de lepidópteros, hemípteros, coleópteros, nematodos o dípteros, que comprende poner en contacto dicha plaga con, o alimentar a dicha plaga con, una cantidad plaguicida eficaz del polipéptido de la reivindicación 9.
15. Un procedimiento para producir un polipéptido con actividad pesticida, que comprende cultivar la célula huésped de la reivindicación 4 en condiciones en las que se expresa la molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido.

16. Una planta o célula vegetal que tiene incorporada de forma estable en su genoma una construcción de ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína que tiene actividad insecticida, en la que dicha secuencia de nucleótidos se selecciona del grupo que consiste en:

- 5 a) la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:3;  
 b) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:4 o SEQ ID NO:5; y  
 10 c) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 96% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:4 o SEQ ID NO:5, en la que el polipéptido tiene actividad tóxica contra más de una plaga, incluidos miembros de los órdenes *Lepidoptera*, *Diptera* y *Coleoptera* o del filo *Nematoda*.

17. Un procedimiento para proteger una planta de una plaga, que comprende expresar en una planta o en una célula de la misma una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido pesticida, en el que dicha secuencia de nucleótidos se selecciona del grupo que consiste en:

- 15 a) la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:3;  
 b) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:4 o SEQ ID NO:5; y  
 20 c) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 96% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:4 o SEQ ID NO:5, en la que el polipéptido tiene actividad tóxica contra más de una plaga, incluidos miembros de los órdenes *Lepidoptera*, *Diptera* y *Coleoptera* o del filo *Nematoda*.

18. El procedimiento de la reivindicación 17, en el que dicha planta produce un polipéptido pesticida que tiene actividad pesticida contra una plaga de lepidópteros, hemípteros, coleópteros, nematodos o dípteros.

19. Un procedimiento para aumentar el rendimiento de una planta que comprende cultivar en un campo una planta o una semilla de la misma que tiene incorporada de forma estable en su genoma una construcción de ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína que tiene actividad insecticida, en la que dicha secuencia de nucleótidos se selecciona del grupo que consiste en:

- 25 a) la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:3;  
 b) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:4 o SEQ ID NO:5; y  
 30 c) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 96% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:4 o SEQ ID NO:5, en la que el polipéptido tiene actividad tóxica contra más de una plaga, incluidos miembros de los órdenes *Lepidoptera*, *Diptera* y *Coleoptera* o del filo *Nematoda*;

35 en el que dicho campo está infestado con una plaga contra la que dicho polipéptido tiene actividad pesticida; y en el que un aumento del rendimiento comprende cualquier aumento estadísticamente significativo del rendimiento en comparación con una planta que no exprese la proteína que tiene actividad insecticida.

20. Uso del ácido nucleico de la reivindicación 1 para proteger una planta de una plaga contra la que el polipéptido codificado por dicho ácido nucleico tiene actividad pesticida.