



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 300 440**

(51) Int. Cl.:

A01H 5/00 (2006.01)	C12N 1/15 (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01)	C12N 1/21 (2006.01)
C12N 5/04 (2006.01)	C12N 7/01 (2006.01)
C12N 15/12 (2006.01)	C12N 15/70 (2006.01)
C12N 15/74 (2006.01)	C12N 15/80 (2006.01)
C12N 15/81 (2006.01)	C12N 15/82 (2006.01)
C07K 14/435 (2006.01)	

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **02726780 .6**

(86) Fecha de presentación : **19.04.2002**

(87) Número de publicación de la solicitud: **1385370**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **04.02.2004**

(54) Título: **Polipéptidos antimicrobianos y sus usos.**

(30) Prioridad: **20.04.2001 US 285355 P**
18.04.2002 US 125258

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.06.2008

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.06.2008

(73) Titular/es:
PIONEER HI-BRED INTERNATIONAL, Inc.
800 Capital Square, 400 Locust Street
Des Moines, Iowa 50309, US
E.I. DU PONT DE NEMOURS AND COMPANY

(72) Inventor/es: **Altier, Daniel, J.;**
Herrmann, Rafael;
Lu, Albert, L.;
McCutchen, Billy, F.;
Presnail, James, K.;
Weaver, Janine, L. y
Wong, James, F., H.

(74) Agente: **Ungría López, Javier**

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

Polipéptidos antimicrobianos y sus usos.

5 **Campo de la invención**

La invención hace referencia a la resistencia a las enfermedades de las plantas, concretamente a la resistencia a los patógenos fúngicos. Más específicamente la presente invención hace referencia al uso de polipéptidos antimicrobianos naturales aislados de insectos inducidos por patógenos de las plantas.

10 **Antecedentes de la invención**

Los organismos multicelulares producen una batería de péptidos y proteínas antimicrobianos para defenderse frente al ataque o la lesión microbianos. Muchos de estos péptidos y proteínas inducidos poseen una amplia actividad antimicrobiana frente a las bacterias Gram-positivas y/o Gram-negativas (Boman, H.G. (1995) *Annu. Rev. Immunol.* 13:61-92). Este sistema de defensas, denominado "inmunidad innata", puede representar una barrera química que despliegan los organismos para detener a los microbios peligrosos en su punto de contacto.

Los péptidos y proteínas producidos en respuesta al ataque microbiano tienden a funcionar de manera muy diferente de los antibióticos convencionales. Los antibióticos funcionan bloqueando una proteína crucial en un microbio invasor. El modo de acción de las proteínas defensivas antimicrobianas varía. En algunos casos, perforan agujeros en la membrana de un microbio y desorganizan la señalización interna del microbio. En otros casos, pueden actuar incrementando la actividad inmunitaria de la célula anfitriona.

Se han aislado diversos péptidos antimicrobianos y se han caracterizado parcialmente sus estructuras. Las defensinas, un tipo de péptidos antimicrobianos, son péptidos ricos en cisteína. Las defensinas han sido aisladas de insectos y mamíferos. Las defensinas de insectos son péptidos de 34-43 aminoácidos con tres puentes disulfuro. Son producidas por el cuerpo graso de los insectos (Hoffmann *et al.* (1992) *Immunol. Today* 13:411-15). Se ha demostrado que desorganizan la permeabilidad de la membrana citoplásmica de *Micrococcus luteus*, resultante de la formación de canales iónicos dependientes del voltaje en la membrana citoplásmica (Cociancich *et al.* (1993) *J. Biol. Chem.* 268:19239-19245).

Las tioninas son otro grupo de pequeños péptidos antimicrobianos ricos en cisteína. Se piensa que las tioninas juegan un papel en la protección de las plantas frente a la infección microbiana. Se han encontrado en endospermo de semillas, tallos, raíces, y en hojas etioladas o con estrés por patógenos de muchas especies de plantas (Bohlmann *et al.* (1991) *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42:227-240). Las tioninas presentan toxicidad contra bacterias, hongos, levaduras, e incluso diversos tipos de células de mamífero.

Las enfermedades de las plantas tienen muchas causas incluyendo hongos, virus, bacterias, y nematodos. Los hongos fitopatogénicos han producido pérdidas de rendimiento significativas en los cultivos anuales así como epidemias devastadoras. Adicionalmente, los brotes de las enfermedades de las plantas han dado como resultado fracasos catastróficos en los cultivos que han desencadenado hambrunas y han causado cambios sociales importantes.

Los métodos moleculares de protección de cultivos no solamente tienen el potencial de implementar los mecanismos novedosos para la resistencia a las enfermedades, sino que también pueden ser implementados más rápidamente que con los métodos de cría tradicionales. Por consiguiente, se necesitan métodos moleculares para proporcionar un suplemento a los métodos de cría tradicionales para proteger las plantas del ataque por patógenos. El impacto de la biotecnología sobre los agentes de control biológico en insectos de hongos hifomicetos es comentado por Hegedus *et al.* (1995) (*Biotechnology Advances*, vol. 13, núm. 3, 1995, páginas 455-490).

Los hongos patógenos de las plantas atacan a aproximadamente 300.000 especies de plantas con flores, pero una sola especie de planta puede ser anfitriona para unas pocas especies fúngicas, y la mayoría de los hongos tienen normalmente una gama de anfitrión limitada. Es por esta razón que la mejor estrategia general hasta la fecha para controlar la enfermedad fúngica de una planta haya sido utilizar cultivares resistentes seleccionados o desarrollados por los criadores de plantas. Desafortunadamente, incluso utilizando los cultivares resistentes, el potencial de graves epidemias de enfermedades de los cultivos persiste hoy en día, como evidencian los brotes de añublo de la avena Victoria y de la hoja del maíz del sur.

Por consiguiente, son deseables métodos moleculares que utilizan los mecanismos de resistencia de los insectos a las plagas de las plantas de origen natural para potenciar la resistencia de las plantas a los microbios, concretamente los hongos patogénicos.

Compendio de la invención

Se proporcionan composiciones y métodos para aumentar la resistencia a los patógenos. Las composiciones comprenden péptidos antipatogénicos o agentes de defensa que están inducidos en insectos por el contacto del insecto con un patógeno de interés. Las composiciones incluyen polipéptidos que poseen propiedades antimicrobianas, concretamente propiedades fungicidas, y las moléculas de ácido nucleico que codifican tales polipéptidos. Los métodos y las

composiciones de la presente invención encuentran uso en el impacto de los patógenos microbianos de las plantas y en la potenciación de la resistencia a la enfermedad vegetal por patógenos microbianos.

También se proporcionan los casetes de expresión que comprenden las moléculas de ácido nucleico que codifican los agentes defensivos, las secuencias de vectores, y las células anfitrionas para la expresión de los polipéptidos, y los anticuerpos para los polipéptidos. Las composiciones de la invención proporcionan adicionalmente células vegetales, plantas, y sus semillas, transformadas con las moléculas de ácido nucleico de la invención. Las plantas transgénicas de la presente invención son transformadas con una secuencia de nucleótidos de la invención y muestran un aumento de resistencia antimicrobiana a las enfermedades, concretamente resistencia a enfermedades fúngicas que disminuirá la necesidad de productos químicos agrícolas artificiales para proteger los cultivos de campo e incrementar el rendimiento de los cultivos.

Los métodos de la invención implican transformar establemente una planta con al menos un casete de expresión que comprende al menos una secuencia de nucleótidos de la invención unida operablemente a un promotor capaz de conducir la expresión de la secuencia de nucleótidos en la planta o célula vegetal. Se reconoce que resultarán útiles en la invención una variedad de promotores, cuya elección dependerá en parte de la localización del tejido deseado y del nivel de expresión de las secuencias de nucleótidos descritas y de los polipéptidos correspondientes. Se reconoce que los niveles de expresión de los agentes defensivos en la célula vegetal pueden ser controlados de manera que se logre una resistencia óptima a la enfermedad.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos del polipéptido precursor Mag1 (SEQ ID NO: 2) con la clase de proteínas inmunitarias conocidas como atacinas. El polipéptido precursor Mag1 tiene una similitud de secuencia del 78% con el polipéptido precursor E/F de la atacina (SEQ ID NO: 19, Núm. de Acceso: P01513). Las secuencias restantes son: Polipéptido precursor de Atacina A (SEQ ID NO: 17, Núm. de Acceso: P50725); polipéptido precursor de Atacina B (SEQ ID NO: 18, Núm. de Acceso: P01512); y polipéptido precursor de atacina conocido como Nuecina (SEQ ID NO: 20, Núm. de Acceso: Q26431).

Figura 2. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos del polipéptido precursor Mag1 (SEQ ID NO: 2) con secuencias polipeptídicas homólogas de la invención codificadas por ADNc aislados de genotecas de *Manduca sexta* inducidas por patógenos (SEQ ID NOS: 4, 6, 8, y 10).

Figura 3. Secuencias de aminoácidos N-terminales para los cuatro fragmentos de la digestión con Lys-C del polipéptido Mag1 (SEQ ID NO: 96, 97, 98, y 99).

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona composiciones y métodos para potenciar la resistencia a las enfermedades de las plantas por patógenos vegetales, concretamente patógenos fúngicos. Las composiciones de la invención incluyen polipéptidos y péptidos que poseen actividad antimicrobiana, concretamente actividad fungicida. Tales péptidos o polipéptidos son referidos colectivamente en la presente memoria como “agentes defensivos”. También están incluidas las moléculas de ácido nucleico que codifican tales agentes defensivos, así como las plantas transformadas con las moléculas de ácido nucleico.

La invención se refiere a composiciones y métodos para inducir resistencia en una planta a plagas vegetales. Los agentes defensivos comprenden secuencias de nucleótidos y polipéptidos derivadas de insectos. Por consiguiente, las composiciones y métodos también son útiles en la protección de las plantas frente a patógenos fúngicos, virus, nematodos, y similares.

Se proporcionan las composiciones para controlar los agentes patogénicos de las plantas, concretamente los agentes microbianos patogénicos de las plantas, más concretamente los agentes fúngicos patogénicos de las plantas. Las composiciones específicas proporcionadas incluyen polipéptidos antimicrobianos derivados de insectos, y las moléculas de ácido nucleico que codifican tales polipéptidos. Se proporcionan las plantas, las células vegetales, los tejidos vegetales y las semillas de las mismas transformadas con las secuencias de nucleótidos de la invención. Adicionalmente, se pueden utilizar las composiciones de la invención en formulaciones por sus actividades de resistencia a las enfermedades.

La presente invención proporciona moléculas de ácido nucleico aisladas que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican las secuencias de aminoácidos mostradas en los SEQ ID NOS: 101 y 103. Adicionalmente se proporcionan los polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos codificada por una molécula de ácido nucleico descrita en la presente memoria, por ejemplo, aquellas mostradas en los SEQ ID NOS: 100 y 102 y los fragmentos y variantes de las mismas.

Se proporcionan métodos para la expresión de estas secuencias en una planta anfitriona para conferir una mayor resistencia a la enfermedad de la planta anfitriona frente a los patógenos de la planta, concretamente patógenos fúngicos de la planta. Los métodos de la invención implican transformar establemente una planta con al menos un casete de expresión que comprende al menos una secuencia de nucleótidos de la invención unida operablemente a un promotor

capaz de conducir la expresión de la secuencia de nucleótidos en la célula vegetal. Se reconoce que serán útiles en la invención una variedad de promotores, cuya elección dependerá en parte del nivel deseado y de la localización de la expresión de la secuencia de nucleótidos descrita en el tejido deseado. Se reconoce que los niveles y la localización de la expresión en el tejido pueden ser controlados para modular los niveles de polipéptidos antimicrobianos en la célula vegetal para optimizar la resistencia a la enfermedad vegetal frente a un patógeno concreto.

Por “patógeno vegetal” o “plaga vegetal” se quiere significar cualquier microorganismo que pueda causar daño a una planta, por ejemplo inhibiendo o ralentizando el crecimiento de una planta, dañando los tejidos de una planta, debilitando el sistema inmunitario de una planta o la resistencia de una planta a estreses abióticos, y/o causando la muerte prematura de la planta, etc. Los patógenos de las plantas y las plagas de las plantas incluyen microbios tales como hongos, virus, bacterias, y nematodos.

Por “resistencia a una enfermedad” o “resistencia a patógenos” se quiere significar que las plantas evitan los síntomas de la enfermedad que son el resultado de las interacciones de la planta con el patógeno. Esto es, se evita que los patógenos causen enfermedades vegetales y los síntomas de enfermedad asociados, o alternatively, los síntomas de enfermedad causados por el patógeno se minimizan o se reducen. Los métodos de la invención se pueden utilizar para proteger las plantas de la enfermedad, concretamente aquellas enfermedades que están causadas por patógenos fúngicos de las plantas.

Un “agente antimicrobiano”, un “agente plaguicida”, un “agente defensivo”, y/o un “agente fungicida” actuarán de un modo similar para suprimir, controlar, y/o eliminar al patógeno invasor.

Un agente defensivo poseerá actividad defensiva. Por “actividad defensiva” se quiere significar una actividad antipatogénica, antimicrobiana, o antifúngica.

Por “composiciones antipatogénicas” se quiere significar que las composiciones de la invención tienen actividad frente a los patógenos; incluyendo hongos, microorganismos, virus, y nematodos, y de este modo son capaces de suprimir, controlar, y/o eliminar al organismo patogénico invasor. Una composición antipatogénica de la invención reducirá los síntomas de enfermedad resultantes de la sensibilización con un patógeno microbiano de al menos aproximadamente 5% a aproximadamente 50%, de al menos aproximadamente 10% a aproximadamente 60%, de al menos aproximadamente 30% a aproximadamente 70%, de al menos aproximadamente 40% a aproximadamente 80%, o de al menos aproximadamente 50% a aproximadamente 90% o más. Por tanto, los métodos de la invención se pueden utilizar para proteger organismos, concretamente plantas, de enfermedades, concretamente aquellas enfermedades que están causadas por patógenos invasores.

Los análisis que miden la actividad antipatogénica son comúnmente conocidos en la técnica, como lo son los métodos para cuantificar la resistencia a una enfermedad en las plantas después de la infección con un patógeno. Véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.614.395. Tales técnicas incluyen, medir a lo largo del tiempo, el diámetro medio de la lesión, la biomasa de patógeno, y el porcentaje global de tejidos de la planta decaídos. Por ejemplo, una planta que expresa un polipéptido antipatogénico o que tiene una composición antipatogénica aplicada a su superficie muestra una disminución de la necrosis tisular (esto es, diámetro de la lesión) o una disminución de la muerte en las plantas después de la sensibilización con el patógeno cuando se compara con una planta de control que no había sido expuesta a la composición antipatogénica. Alternativamente, se puede medir la actividad antipatogénica por medio de la disminución de la biomasa de patógeno. Por ejemplo, una planta que expresa un polipéptido antipatogénico o se expone a una composición antipatogénica es sensibilizada con un patógeno de interés. A lo largo del tiempo, se obtienen muestras de tejido de los tejidos en los que se ha inoculado el patógeno y se extrae el ARN. El porcentaje de transcrito de ARN específico del patógeno con respecto al nivel de transcrito específico de la planta permite determinar el nivel de biomasa de patógeno. Véase, por ejemplo, Thomma *et al.* (1998) Plant Biology 95:15107-15111.

Además, los análisis fungicidas *in vitro* incluyen, por ejemplo, la adición de concentraciones variables de la composición fungicida a discos de papel y la colocación de los discos sobre agar que contiene una suspensión del patógeno de interés. Tras la incubación, se desarrollan zonas de inhibición claras en torno a los discos que contienen una concentración eficaz del polipéptido fungicida (Liu *et al.* (1994) Plant Biology 91:1888-1892). Se utilizan métodos adicionales en la técnica para medir las propiedades fungicidas *in vitro* de una composición (Hu *et al.* (1997) Plant Mol. Biol. 34:949-959; Cammue *et al.* (1992) J. Biol. Chem. 267: 2228-2233; y Thevissen *et al.* (1996) J. Biol. Chem. 271:15018-15025).

Los patógenos de la invención incluyen, pero no están limitados a, virus o viroides, bacterias, insectos, nematodos, hongos, y similares. Los virus incluyen cualquier virus vegetal, por ejemplo, el virus del mosaico del tabaco o del pepino, el virus de la mancha en forma de anillo, el virus de la necrosis, el virus del mosaico enano del maíz, etc. Los patógenos fúngicos y virales específicos para los principales cultivos incluyen: Sojas: *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea*, *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium oxysporum*, *Diaporthe phaseolorum* var. *sojae* (*Phomopsis sojae*), *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora*, *Sclerotium rolfsii*, *Cercospora kikuchii*, *Cercospora sojae*, *Peronospora manshurica*, *Colletotrichum dematium* (*Colletotrichum truncatum*), *Corynespora cassicola*, *Septoria glycines*, *Phyllosticta sojicola*, *Alternaria alternata*, *Pseudomonas syringae* p.v. *glycinea*, *Xanthomonas campestris* p.v. *phaseoli*, *Microspora diffusa*, *Fusarium semitectum*, *Phialophora gregata*, Soybean mosaic virus, *Glomerella glycines*, Tobacco Ring spot virus, Tobacco Streak virus, *Phakopsora pachyrhizi*, *Pythium aphanidermatum*, *Pythium ultimum*, *Pythium debaryanum*, virus de las manchas bronceadas del Toma-

te, *Heterodera glycines* *Fusarium solani*; Canola: *Albugo candida*, *Alternaria brassicae*, *Leptosphaeria maculans*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Mycosphaerella brassicicola*, *Pythium ultimum*, *Peronospora parasitica*, *Fusarium roseum*, *Alternaria alternata*; Alfalfa: *Clavibacter michiganensis* subsp. *insidiosum*, *Pythium ultimum*, *Pythium irregulare*, *Pythium splendens*, *Pythium debaryanum*, *Pythium aphanidermatum*, *Phytophthora megasperma*, *Peronospora trifoliorum*, *Phoma medicaginis* var. *medicaginis*, *Cercospora medicaginis*, *Pseudopeziza medicaginis*, *Leptotrochila medicaginis*, *Fusarium*, *Xanthomonas campestris* p.v. *alfalfae*, *Aphanomyces euteiches*, *Stemphylium herbarum*, *Stemphylium alfalfae*; Trigo: *Pseudomonas syringae* p.v. *atrofaciens*, *Urocystis agropyri*, *Xanthomonas campestris* p.v. *translucens*, *Pseudomonas syringae* p.v. *syringae*, *Alternaria alternata*, *Cladosporium herbarum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium avenaceum*, *Fusarium culmorum*, *Ustilago tritici*, *Ascochyta tritici*, *Cephalosporium gramineum*, *Collotetrichum graminicola*, *Erysiphe graminis* f.sp. *tritici*, *Puccinia graminis* f.sp. *tritici*, *Puccinia recondita* f.sp. *tritici*, *Puccinia striiformis*, *Pyrenophora tritici-repentis*, *Septoria nodorum*, *Septoria tritici*, *Septoria avenae*, *Pseudocercospora herpotrichoides*, *Rhizoctonia solani*, *Rhizoctonia cerealis*, *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, *Pythium aphanidermatum*, *Pythium arrhenomanes*, *Pythium ultimum*, *Bipolaris sorokiniana*, Virus Enano Amarillo de la Cebada, Virus del Mosaico del Bromo, Virus del Mosaico del Trigo Transmitido por el Suelo, Virus del Mosaico Estriado del Trigo, Virus Ahusado Estriado del Trigo, Virus Estriado del Trigo Americano, *Claviceps purpurea*, *Tilletia tritici*, *Tilletia laevis*, *Ustilago tritici*, *Tilletia indica*, *Rhizoctonia solani*, *Pythium arrhenomanes*, *Pythium graminicola*, *Pythium aphanidermatum*, Virus High Plains, Virus Estriado del Trigo Europeo; Girasol: *Plasmophora halstedii*, *Sclerotinia sclerotiorum*, Aster Yellows, *Septoria helianthi*, *Phomopsis helianthi*, *Alternaria helianthi*, *Alternaria zinniae*, *Botrytis cinerea*, *Phoma macdonaldii*, *Macrophomina phaseolina*, *Erysiphe cichoracearum*, *Rhizopus oryzae*, *Rhizopus arrhizus*, *Rhizopus stolonifer*, *Puccinia helianthi*, *Verticillium dahliae*, *Erwinia carotovorum* p.v. *carotovora*, *Cephalosporium acremonium*, *Phytophthora cryptogea*, *Albugo tragopogonis*; Maíz: *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans*, *Erwinia stewartii*, *Fusarium verticilloides*, *Fusarium moniliforme*, *Gibberella zeae* (*Fusarium graminearum*), *Stenocarpella maydis* (*Diplodia maydis*), *Pythium irregulare*, *Pythium debaryanum*, *Pythium graminicola*, *Pythium splendens*, *Pythium ultimum*, *Pythium aphanidermatum*, *Aspergillus flavus*, *Bipolaris maydis* O, T (*Cochliobolus heterostrophus*), *Helminthosporium carbonum* I, II & III (*Cochliobolus carbonum*), *Exserohilum turcicum* I, II & III, *Helminthosporium pedicellatum*, *Physoderma maydis*, *Phyllosticta maydis*, *Kabatella maydis*, *Cercospora sorghi*, *Ustilago maydis*, *Puccinia sorghi*, *Puccinia polysora*, *Macrophomina phaseolina*, *Penicillium oxalicum*, *Nigrospora oryzae*, *Cladosporium herbarum*, *Curvularia lunata*, *Curvularia inaequalis*, *Curvularia pallescens*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskense*, *Trichoderma viride*, Virus del Mosaico Enano del Maíz A & B, Virus del Mosaico Estriado del Trigo, Virus Enano Clorótico del Maíz, *Claviceps sorghi*, *Pseudomonas avenae*, *Erwinia chrysanthemi* pv. *zea*, *Erwinia carotovora*, *Corn stunt spiropasma*, *Diplodia macrospora*, *Sclerophthora macrospora*, *Peronosclerospora sorghi*, *Peronosclerospora philippinensis*, *Peronosclerospora maydis*, *Peronosclerospora sacchari*, *Sphacelotheca reiliana*, *Physopella zeae*, *Cephalosporium maydis*, *Cephalosporium acremonium*, Virus del Moteado Clorótico del Maíz, Virus High Plains, Virus del Mosaico del Maíz, Virus Rayado Fino del Maíz, Virus de la Raya del Maíz, Virus de la Hoja Blanca del Maíz, Virus del Enanismo Rugoso del Maíz; Sorgo: *Exserohilum turcicum*, *Colletotrichum graminicola* (*Glomerella graminicola*), *Cercospora sorghi*, *Gloeocercospora sorghi*, *Ascochyta sorghina*, *Pseudomonas syringae* p.v. *syringae*, *Xanthomonas campestris* p.v. *holcicola*, *Pseudomonas yropogonis*, *Puccinia purpurea*, *Macrophomina phaseolina*, *Periconia circinata*, *Fusarium moniliforme*, *Alternaria alternata*, *Bipolaris sorghicola*, *Helminthosporium sorghicola*, *Curvularia lunata*, *Phoma insidiosa*, *Pseudomonas avenae* (*Pseudomonas alboprecipitans*), *Ramulispora sorghi*, *Ramulispora sorghicola*, *Phyllachara sacchari*, *Sporisorium reilianum* (*Sphacelotheca reiliana*), *Sphacelotheca cruenta*, *Sporisorium sorghi*, Mosaico de la Caña de Azúcar H, Virus del Mosaico Enano del Maíz A y B, *Claviceps sorghi*, *Rhizoctonia solani*, *Acremonium strictum*, *Sclerophthora macrospora*, *Peronosclerospora sorghi*, *Peronosclerospora philippinensis*, *Sclerospora graminicola*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium oxysporum*, *Pythium arrhenomanes*, *Pythium graminicola*; Arroz: *Magnaporthe grisea*, *Rhizoctonia solani*, etc.

Se ha demostrado que los agentes defensivos específicos de la invención tienen actividad antipatogénica frente a patógenos concretos. Se reconoce que pueden demostrar actividad otros patógenos, concretamente otros patógenos fúngicos. Algunos pueden incluso mostrar una actividad antipatogénica de amplio espectro. Se reconoce que si bien los polipéptidos antifúngicos pueden demostrar actividad contra una plaga concreta, tales agentes defensivos pueden tener actividad contra numerosos patógenos fúngicos, así como otras plagas de plantas. De este modo, una planta transformada con un agente defensivo concreto de la invención puede demostrar resistencia de amplio espectro.

En una realización de la invención, los agentes defensivos se aíslan a partir de hemolinfa de larvas de insectos inducida mediante inyección de un hongo patogénico vegetal. Los polipéptidos antimicrobianos inducidos pueden ser situados en al menos cuatro grupos de acuerdo con su homología de la secuencia de aminoácidos con clases conocidas de proteínas. Estos cuatro grupos consisten en las clases de proteínas atacina, lebecina, e inhibidores de serinaproteasa, y un grupo que no demuestra una homología sustancial con las proteínas conocidas. Los agentes defensivos potencian la resistencia a la enfermedad por patógenos fúngicos, *Magnathorpa grisea* (*M. grisea*), *Rhizoctonia solani* (*R solani*), y *Fusarium verticilloides* (*F. verticilloides*).

Las composiciones de la invención comprenden las secuencias de ácido nucleico y de aminoácidos de *Agrotis ipsilon* (gusano grasiento). Concretamente, se han identificado polipéptidos contra especies de *Fusarium* a partir de *Agrotis ipsilon*. La secuencia de nucleótidos Fus6 se muestra en los SEQ ID NOS: 100 y 102. La secuencia de aminoácidos del polipéptido Fus6 se muestra en los SEQ ID NOS: 101 y 103. La secuencia de nucleótidos mostrada en el SEQ ID NO: 102 codifica el péptido Fus6 maduro, cuya secuencia de aminoácidos se muestra en el SEQ ID NO: 103.

Los fragmentos y variantes de las secuencias de nucleótidos descritas y los polipéptidos codificados de ese modo también están abarcados por la presente invención. Por “fragmento” se quiere significar una porción de la secuen-

cia de nucleótidos o una porción de la secuencia de aminoácidos. Los fragmentos de una secuencia de nucleótidos pueden codificar fragmentos de polipéptidos que conservan la actividad biológica de la proteína natural y por tanto poseen actividad antimicrobiana y/o fungicida. Por “actividad antimicrobiana” o “actividad fungicida” se quiere significar la capacidad para suprimir, controlar y/o eliminar el microbio patológico u hongo invasor, respectivamente. Una composición de la invención que posee actividad antimicrobiana o fungicida reducirá los síntomas de la enfermedad resultante de la sensibilización microbiana o fúngica de al menos aproximadamente 5% a aproximadamente 50%, de al menos aproximadamente 10% a aproximadamente 60%, de al menos aproximadamente 30% a aproximadamente 70%, de al menos aproximadamente 40% a aproximadamente 80%, o de al menos aproximadamente 50% a aproximadamente 90% o más. Alternativamente, los fragmentos de una secuencia de nucleótidos que son útiles como sondas de hibridación generalmente no codifican proteínas fragmentadas que conservan la actividad biológica. De este modo, los fragmentos de una secuencia de nucleótidos pueden oscilar de al menos aproximadamente 20 nucleótidos, aproximadamente 50 nucleótidos, aproximadamente 100 nucleótidos, y hasta la secuencia completa de nucleótidos que codifica las proteínas de la invención.

Alternativamente, los fragmentos de una secuencia de nucleótidos de la invención pueden codificar fragmentos polipeptídicos que son antigénicos, de este modo, son capaces de lograr una respuesta inmunitaria. En la presente memoria un “polipéptido antigénico” se define como un polipéptido que es capaz de generar un anticuerpo. Los fragmentos polipeptídicos antigénicos de las secuencias de aminoácidos descritas también están abarcados por la invención.

Un fragmento nucleotídico del SEQ ID NO: 100 o 102 que codifica una porción biológicamente activa o antigénica de la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 101 o 103 codificará al menos 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, o 55 aminoácidos contiguos, hasta el número total de aminoácidos presentes en el SEQ ID NO: 101 o 103.

Una porción biológicamente activa o antigénica de una secuencia polipeptídica mostrada en el SEQ ID NO: 101 o 103, se puede preparar aislando una porción de la secuencia de nucleótidos mostrada en el SEQ ID NO: 100 o 102 que expresa la porción codificada del polipéptido (p. ej., mediante expresión recombinante *in vitro*), y evaluando la actividad de la porción codificada del polipéptido.

Alternativamente, los fragmentos de una secuencia de nucleótidos que son útiles como sondas de hibridación generalmente no codifican polipéptidos fragmentados que conservan una actividad biológica. De este modo, los fragmentos de una secuencia de nucleótidos pueden oscilar de al menos aproximadamente 25 nucleótidos, aproximadamente 30 nucleótidos, aproximadamente 50 nucleótidos, aproximadamente 100 nucleótidos, y hasta la secuencia completa de nucleótidos que codifica los polipéptidos de la invención.

Los fragmentos de la secuencia de nucleótidos mostradas en el SEQ ID NO: 100 (Fus6), desde el nucleótido 1 al 195, pueden oscilar de al menos 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 125, 150, 175, 180, 185, 190, o 195 nucleótidos contiguos, o hasta el número total de nucleótidos (358) presentes en el SEQ ID NO: 100 que codifican el SEQ ID NO: 101.

La invención abarca composiciones de ácidos nucleicos o proteínas aisladas o sustancialmente purificadas. Una molécula de ácido nucleico o proteína “aislada” o “purificada”, o una porción biológicamente activa de la misma, está sustancialmente libre de otro material celular, o medio de cultivo cuando es producida mediante mecanismos recombinantes, o sustancialmente libre de precursores químicos u otros agentes químicos cuando es sintetizada químicamente. Preferiblemente, un ácido nucleico “aislado” está libre de las secuencias (preferiblemente secuencias que codifican proteínas) que naturalmente flanquean el ácido nucleico (esto es, secuencias localizadas en los extremos 5' y 3' del ácido nucleico) en el ADN genómico del organismo del cual deriva el ácido nucleico. Por ejemplo, en diversas realizaciones, la molécula de ácido nucleico aislada puede contener menos de aproximadamente 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2 kb, 1 kb, 0,5 kb, o 0,1 kb de la secuencia de nucleótidos que flanquean naturalmente la molécula de ácido nucleico en el ADN genómico de la célula de la cual deriva el ácido nucleico.

Una proteína que está sustancialmente libre de material celular incluye preparaciones de proteína que tienen menos de aproximadamente 30%, 20%, 10%, 5%, (en peso seco) de proteína contaminante. Cuando la proteína de la invención o la porción biológicamente activa de la misma se produce recombinantemente, el medio de cultivo representa preferiblemente menos de aproximadamente 30%, 20%, 10%, o 5% (en peso seco) de precursores químicos o productos químicos distintos de la proteína de interés.

Por “variantes” se quieren significar secuencias sustancialmente similares. Para la secuencia de nucleótidos, las variantes conservativas incluyen aquellas secuencias que, debido a la degeneración del código genético, codifican la secuencia de aminoácidos de uno de los polipéptidos de la invención. Las variantes alélicas de origen natural como estas se pueden identificar con el uso de mecanismos de la biología molecular bien conocidos, como, por ejemplo, con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y las técnicas de hibridación esbozadas más abajo. La secuencia de nucleótidos variante también incluye las secuencias de nucleótidos derivadas sintéticamente, tales como las generadas, por ejemplo, utilizando la mutagénesis dirigida al sitio pero que todavía codifican un polipéptido de la invención. Generalmente, las variantes de una secuencia de nucleótidos concreta de la invención tendrán al menos una identidad de secuencia de 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o más con aquella secuencia de nucleótidos concreta determinada mediante programas de alineamiento de secuencias descritos en otra parte en la presente memoria utilizando los parámetros por defecto.

Por polipéptido “variante” se quiere significar un polipéptido derivado del polipéptido nativo por delección (también denominado truncamiento) o adición de uno o más aminoácidos al extremo N-terminal y/o C-terminal del polipéptido nativo; delección o adición de uno o más aminoácidos en uno o más sitios del polipéptido nativo; o sustitución de uno o más aminoácidos en uno o más sitios del polipéptido nativo. Los polipéptidos variantes abarcados por la presente invención son biológicamente activos, esto es, continúan poseyendo la actividad biológica deseada del polipéptido nativo, por tanto todavía continuarán poseyendo actividad antimicrobiana y/o fungicida. Tales variantes pueden resultar, por ejemplo, del polimorfismo genético o de la manipulación humana.

Las variantes biológicamente activas de un polipéptido nativo de la invención tendrán al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos para el polipéptido nativo como se determina mediante programas de alineamiento de secuencias descritos en la presente memoria en otra parte utilizando los parámetros por defecto. Una variante biológicamente activa de un polipéptido de la invención puede diferir de ese polipéptido en tan solo 1-15 restos aminoácido, tan solo 1-10, por ejemplo 6-10, tan solo 5, tan solo 4, 3, 2, o incluso 1 resto aminoácido.

La actividad biológica de los polipéptidos de la presente invención puede ser analizada mediante cualquier método conocido en la técnica (véase por ejemplo, Patente de los Estados Unidos Núm. 5.614.395; Thomma et al. (1998) *Plant Biology* 95:15107-15111; Liu et al. (1994) *Plant Biology* 91:1888-1892; Hu et al. (1997) *Plant Mol. Biol.* 34:949-959; Cammue et al. (1992) *J. Biol. Chem.* 267: 2228-2233; y Thevissen et al. (1996) *J. Biol. Chem.* 271:15018-15025).

Los polipéptidos de la invención pueden ser alterados de diferentes maneras incluyendo sustituciones, delecciones, truncamientos, e inserciones de aminoácidos. Los métodos para tales manipulaciones son generalmente conocidos en la técnica. Por ejemplo, las variantes de la secuencia de aminoácidos de la invención se pueden preparar mediante mutaciones en el ADN. Los métodos para la mutagénesis y las alteraciones de la secuencia de nucleótidos son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Kunkel (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:488-492; Kunkel et al. (1987) *Methods in Enzymol.* 154:367-382; Patente de los Estados Unidos Núm. 4.873.192; Walker y Gaastra, eds. (1983) *Techniques in Molecular Biology* (MacMillan Publishing Company, Nueva York) y las referencias allí citadas. Se pueden encontrar pautas en cuanto a las sustituciones de aminoácidos apropiadas que no afectan a la actividad biológica del polipéptido de interés en el modelo de Dayhoff et al. (1978) *Atlas of Protein Sequence and Structure* (Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D.C.). Se pueden preferir las sustituciones conservativas, tales como el intercambio de un aminoácido por otro que tenga propiedades similares.

De este modo, los genes y las secuencias de nucleótidos de la invención incluyen tanto las secuencias de origen natural como las formas mutantes. Del mismo modo, los polipéptidos de la invención abarcan tanto los polipéptidos de origen natural como las formas modificadas de los mismos. Tales variantes continuarán poseyendo la actividad antimicrobiana deseada, o en algunos casos fungicida. Obviamente, las mutaciones que se realizarán en el ADN que codifica la variante no deben situar la secuencia fuera del marco de lectura y preferiblemente no crearán regiones complementarias que pudieran producir una estructura de ARNm secundario. Véase, la Publicación de la Solicitud de Patente EP Núm. 75.444.

No se espera que las delecciones, inserciones, y sustituciones de las secuencias polipeptídicas abarcadas en la presente memoria produzcan cambios radicales en las características del polipéptido. No obstante, cuando es difícil pronosticar el efecto exacto de la sustitución, delección, o inserción antes de realizarla, un experto en la técnica apreciará que el efecto puede ser evaluado mediante análisis de escrutinio rutinarios para la actividad antimicrobiana y/o fungicida como se ha referido *supra*.

Las secuencias de nucleótidos y polipéptidos variantes también abarcan secuencias y polipéptidos derivados de un procedimiento mutagénico y recombinante tal como el barajado de ADN. Con semejante procedimiento, se pueden manipular una o más secuencias codificadoras diferentes de las moléculas de ácido nucleico descritas en el SEQ ID NO: 100 o 102 para crear nuevos polipéptidos que poseen las propiedades deseadas. De esta manera, se generan genotecas de polinucleótidos recombinantes a partir de una población de polinucleótidos de secuencia relacionada que comprende regiones de la secuencia que tienen una identidad de secuencia sustancial y puedan ser recombinadas homológicamente *in vitro* o *in vivo*. Por ejemplo, utilizando este enfoque, se pueden barajar motivos de secuencia que codifican un dominio de interés entre las moléculas de ácido nucleico de la invención y otras secuencias de nucleótidos codificadoras antimicrobianas conocidas para obtener una nueva secuencia de nucleótidos que codifican un polipéptido con una propiedad mejorada de interés, tales como mejores propiedades antimicrobianas y/o fungicidas a concentraciones de polipéptido más bajas o especificidad para los patógenos de una planta concreta. Por ejemplo, la especificidad por un patógeno fúngico de una planta concreta incluyendo, pero no limitado a, patógenos tales como *M. grisea* y *F. verticilloides*. Las estrategias para semejante barajado de ADN son conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, Stemmer (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:10747-10751; Stemmer (1994) *Nature* 370:389-391; Crameri et al. (1997) *Nature Biotech* 15:436-438; Moore et al. (1997) *J. Mol. Biol.* 272:336-347; Zhang et al. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:4504-4509; Crameri et al. (1998) *Nature* 391:288-291; y Patentes de los Estados Unidos Núms. 5.605.793 y 5.837.458.

Las secuencias de nucleótidos de la invención se pueden utilizar para aislar las correspondientes secuencias de otros organismos, concretamente otros insectos. De esta manera, se pueden utilizar métodos tales como PCR, hibridación, y similares para identificar tales secuencias basándose en su homología de secuencia con las secuencias mostradas en la presente memoria. Las secuencias aisladas basándose en su identidad de secuencia con las secuencias de nucleótidos

completas mostradas en la presente memoria o con los fragmentos de las mismas están abarcadas por la presente invención. Tales secuencias incluyen secuencias que son ortólogas de las secuencias descritas. Por “ortólogos” se quieren significar los genes derivados de un gen ancestral común y que se encuentran en especies diferentes como resultado de la especiación. Los genes encontrados en especies diferentes se consideran ortólogos cuando sus secuencias de nucleótidos y/o sus secuencias de polipéptidos codificadas comparten una identidad sustancial como se define en otra parte en la presente memoria. Las funciones de los ortólogos a menudo están muy conservadas entre especies. De este modo, las secuencias aisladas que codifican una proteína antimicrobiana y que hibridan en condiciones restrictivas con las secuencias de nucleótidos descritas en la presente memoria, o con fragmentos de las mismas, están abarcadas por la presente invención.

En un enfoque de PCR, se pueden diseñar cebadores oligonucleotídicos para su uso en reacciones de PCR para amplificar las correspondientes secuencias de ADN a partir de ADNc o de ADN genómico extraído de cualquier insecto de interés. Los métodos de diseño de cebadores de PCR y de clonación mediante PCR son generalmente conocidos en la técnica y se describen en Sambrook *et al.* (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, Nueva York). Véase también Innis *et al.*, eds. (1990) *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (Academic Press, Nueva York); Innis y Gelfand, eds. (1995) *PCR Strategies* (Academic Press, Nueva York); e Innis y Gelfand, eds. (1999) *PCR Methods Manual* (Academic Press, Nueva York). Los métodos de PCR conocidos incluyen, pero no están limitados a, métodos en los que se utilizan cebadores emparejados, cebadores anidados, cebadores específicos individuales, cebadores degenerados, cebadores específicos de los genes, cebadores específicos de los vectores, cebadores parcialmente emparejados erróneamente, y similares.

En las técnicas de hibridación, toda o parte de la secuencia de nucleótidos se utiliza como sonda que hibrida selectivamente con otras secuencias de nucleótidos correspondientes presentes en una población de fragmentos de ADN genómicos clonados o fragmentos de ADNc (esto es, genotecas genómicas o de ADNc) de un organismo seleccionado. Las sondas de hibridación pueden ser fragmentos de ADN genómico, fragmentos de ADNc, fragmentos de ARN, u otros oligonucleótidos, y pueden estar marcados con un grupo detectable tal como P³² o cualquier otro marcador detectable. De este modo, por ejemplo, se pueden elaborar sondas para la hibridación marcando los oligonucleótidos sintéticos basándose en las secuencias resistentes a enfermedades de la invención. Los métodos para la preparación de sondas para la hibridación y para la construcción de genotecas de ADNc y genómicas son generalmente conocidos en la técnica y las describen Sambrook *et al.* (1989) en *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, Nueva York).

Por ejemplo, se puede utilizar una secuencia de nucleótidos completa descrita en la presente memoria, o una o más porciones de la misma, como sonda capaz de hibridar específicamente con las correspondientes secuencias de nucleótidos y ARN mensajeros. Para obtener la hibridación específica en una variedad de condiciones, tales sondas incluyen secuencias que son únicas entre las secuencias de nucleótidos de la invención y tienen preferiblemente al menos aproximadamente 10 nucleótidos de longitud, y muy preferiblemente al menos aproximadamente 20 nucleótidos de longitud. Tales sondas se pueden utilizar para amplificar las correspondientes secuencias de un organismo seleccionado por medio de PCR. Esta técnica se puede utilizar para aislar secuencias codificadoras adicionales de un organismo deseado o como análisis de diagnóstico para determinar la presencia de las secuencias codificadoras en un organismo. Las técnicas de hibridación incluyen el escrutinio por hibridación de genotecas de ADN cultivadas en placa (ya sean placas o colonias; véase, por ejemplo, Sambrook *et al.* (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, Nueva York).

La hibridación de tales secuencias se puede llevar a cabo en condiciones muy restrictivas.

De este modo, las secuencias aisladas que codifican un polipéptido anti-microbiano y que hibridan en condiciones muy restrictivas con una secuencia descrita en la presente memoria, o con fragmentos de la misma están abarcadas por la presente invención. En la presente memoria, las condiciones muy restrictivas incluyen hibridación en formamida al 50%, NaCl 1 M, SDS al 1% a 37°C, y un lavado en 0,1X SSC de 60 a 65°C. La duración de la hibridación es generalmente menor de aproximadamente 24 horas, normalmente de aproximadamente 4 a aproximadamente 12 horas.

La especificidad es típicamente función de los lavados post-hibridación, siendo los factores críticos la fuerza iónica y la temperatura de la solución de lavado final. Para los híbridos ADN-ADN, se puede hacer una aproximación de la T_m a partir de la ecuación de Meinkoth y Wahl (1984) *Anal. Biochem.* 138:267-284: T_m = 81,5°C + 16,6 (log M) + 0,41 (%GC) - 0,61 (% form) - 500/L; donde M es la molaridad de los cationes monovalentes, %GC es el porcentaje de nucleótidos de guanosina y citosina del ADN, % form 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 (a una fuerza iónica y un pH definidos) a la cual el 0% de una secuencia diana complementaria hibrida con una sonda perfectamente emparejada. La T_m se reduce aproximadamente 1°C por cada 1% de emparejamiento erróneo. Una pauta extensiva para la hibridación de ácidos nucleicos se encuentra en Tijssen (1993) *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology Hybridization with Nucleic Acid Probes*, Parte I, Capítulo 2 (Elsevier, Nueva York); y Ausubel *et al.*, eds. (1995) *Current Protocols in Molecular Biology*, Capítulo 2 (Greene Publishing and Wiley-Interscience, Nueva York). Véase Sambrook *et al.* (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, Nueva York).

ES 2 300 440 T3

Se utilizan los siguientes términos para describir las relaciones de las secuencias entre dos o más ácidos nucleicos o polinucleótidos: (a) “secuencia de referencia”, (b) “ventana de comparación”, (c) “identidad de secuencia”, (d) “porcentaje de identidad de secuencia”, y (e) “identidad sustancial”.

- 5 (a) Según se utiliza en la presente memoria, “secuencia de referencia” es una secuencia definida utilizada como base para la comparación de secuencias. Una secuencia de referencia puede ser un subgrupo o la totalidad de una secuencia especificada; por ejemplo, un segmento de un ADNc o una secuencia génica completa, o el ADNc o la secuencia génica completa.
- 10 (b) Según se utiliza en la presente memoria, “ventana de comparación” hace referencia a un segmento contiguo y especificado de una secuencia de polinucleótidos, donde la secuencia de polinucleótidos de la ventana de comparación puede comprender adiciones o deleciones (esto es, espacios) en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o deleciones) para el alineamiento óptimo de las dos secuencias. Generalmente, la ventana de comparación tiene al menos 20 nucleótidos contiguos de longitud, y opcionalmente puede tener 30, 40, 50, 100, o más.
- 15 Los expertos en la técnica comprenden que para evitar una elevada similitud con una secuencia de referencia debido a la inclusión de espacios en la secuencia de polinucleótidos típicamente se introduce una penalidad de un espacio y se resta del número de emparejamientos. Los métodos de alineamiento de secuencias para su comparación son bien conocidos en la técnica. De este modo, la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias cualesquiera se puede completar utilizando un algoritmo matemático. Los ejemplos no limitantes de semejantes algoritmos matemáticos son el algoritmo de Myers y Miller (1988) *CABIOS* 4:11-17; el algoritmo de la homología local de Smith *et al.* (1981) *Adv. Appl. Math.* 2:482; el algoritmo del alineamiento mediante homología de Needleman y Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443-453; el método de búsqueda por similitud de Pearson y Lipman (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85:2444-2448; el algoritmo de Karlin y Altschul (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:2264, modificado como en Karlin y Altschul (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-5877. Se pueden utilizar las implementaciones por ordenador de estos algoritmos matemáticos para la comparación de secuencias para determinar la identidad de secuencia. Tales implementaciones incluyen, pero no están limitadas a: CLUSTAL en el programa PC/Gene (asequible de Intelligenetics, Mountain View, California); el programa ALIGN (Versión 2.0); el programa ALIGN PLUS (versión 3.0, copyright 1997); y GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA, y TFASTA del Wisconsin Genetics Software Package, Versión 8 (asequible de Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA). Los alineamientos utilizando estos programas se pueden realizar utilizando los parámetros por defecto. El programa CLUSTAL está bien descrito por Higgins *et al.* (1988) *Gene* 73:237-244 (1988); Higgins *et al.* (1989) *CABIOS* 5:151-153; Corpet *et al.* (1988) *Nucleic Acids Res.* 16:10881-90; Huang *et al.* (1992) *CABIOS* 8:155-65; y Pearson *et al.* (1994) *Meth. Mol. Biol.* 24:307-331. Los programas ALIGN y ALIGN PLUS se basan en el algoritmo de Myers y Miller (1988) *supra*. Se pueden utilizar una tabla de restos por peso o PAM120, una penalización de la longitud del espacio de 12, y una penalidad del espacio de 4 con el programa ALIGN cuando se comparan secuencias de aminoácidos.
- 35

Los programas BLAST de Altschul *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403 están basados en el algoritmo de Karlin y Altschul (1990) *supra*. La familia de programas BLAST que se pueden utilizar para búsquedas de similitud en bases de datos incluye: BLASTN para secuencias de nucleótidos problema frente a las secuencias de las bases de datos de nucleótidos; BLASTP para las secuencias de péptidos problema frente a las bases de datos de péptidos; BLASTX para las secuencias de nucleótidos problema frente a las secuencias de las bases de datos de proteínas; TBLASTN para las secuencias de proteínas problema frente a las secuencias de las bases de datos de nucleótidos; y TBLASTX para las secuencias de nucleótidos problema frente a las bases de datos de nucleótidos con la traducción de todas las secuencias de nucleótidos a proteínas. Las búsquedas de nucleótidos BLAST se pueden realizar con el programa BLASTN, puntuación = 100, longitud de la palabra = 12, para obtener unas secuencias de nucleótidos homólogas a la secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de la invención. Las búsquedas de proteínas BLAST se pueden realizar con el programa BLASTX, puntuación = 50, longitud de la palabra = 3, para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a una proteína o polipéptido de la invención. Para obtener alineamientos con espacios con fines comparativos, se puede utilizar Gapped BLAST (en BLAST 2.0) como describen Altschul *et al.* (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389. Alternativamente, se puede utilizar PSI-BLAST (en BLAST 2.0) para realizar una búsqueda iterada que detecta relaciones distantes entre moléculas. Véase Altschul *et al.* (1997) *supra*. Cuando se utilizan BLAST, Gapped BLAST, PSI-BLAST, se pueden utilizar los parámetros por defecto de los respectivos programas (p. ej., BLASTN para las secuencias de nucleótidos, BLASTX para las proteínas). Véase www.ncbi.nlm.nih.gov. También se puede realizar el alineamiento manualmente mediante inspección.

55

A menos que se especifique de otro modo, los valores de identidad/similitud de secuencia proporcionados en la presente memoria hacen referencia al valor obtenido utilizando GAP Versión 10 empleando los siguientes parámetros: % identidad utilizando un Peso del Espacio de 50 y un Peso de la Longitud de 3; % similitud utilizando un Peso del Espacio de 12 y un Peso de la Longitud de 4, o cualquier programa equivalente. Por “programa equivalente” se quiere significar cualquier programa de comparación de la secuencia que, para dos secuencias en cuestión cualesquiera, genera un alineamiento que tiene emparejamientos de nucleótidos o de restos aminoácido idénticos y un porcentaje de identidad de secuencia idéntico cuando se compara con el correspondiente alineamiento generado por el programa preferido.

60

En GAP se utiliza el algoritmo de Needleman y Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443-453, para encontrar el alineamiento de dos secuencias completas que maximiza el número de emparejamientos y minimiza el número de espacios. En GAP se consideran todos los posibles alineamientos y posiciones de los espacios y se crea el alineamiento con el mayor número de bases emparejadas y los mínimos espacios. Permite la provisión de una penalización de creación

65

de espacios y una penalización de la extensión de los espacios en unidades de bases emparejadas. GAP debe sacar provecho del número de penalizaciones de la creación de espacios de las parejas por cada espacio que se inserta. Si se selecciona una penalización de la extensión del espacio mayor de cero, GAP debe, además, sacar provecho para cada espacio insertado de las veces de la longitud del espacio de la penalización de la extensión del espacio. Los valores de penalización de la creación de espacios y los valores de la penalización de la extensión del espacio por defecto en la Versión 10 del Wisconsin Genetics Software Package para las secuencias de proteínas son 8 y 2, respectivamente. Para las secuencias de nucleótidos la penalización de la creación de espacios por defecto es de 50 mientras la penalización de la extensión del espacio por defecto es de 3. Las penalizaciones por creación de espacio y por extensión de espacio se pueden expresar como un número entero seleccionado del grupo de números enteros que consiste en 0 a 200. De este modo, por ejemplo, las penalizaciones por creación de espacio y por extensión de espacio pueden ser 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65 o mayores.

GAP presenta un miembro de la familia de los mejores alineamientos. Puede haber muchos miembros de esta familia, pero ningún otro miembro tiene una calidad mejor. GAP presenta cuatro figuras de mérito para los alineamientos: Calidad, Razón, Identidad, y Similitud. La Calidad es la métrica maximizada con el fin de alinear las secuencias. La Razón es la calidad dividida por el número de bases en el segmento más corto. El porcentaje de Identidad es el porcentaje de símbolos que realmente se emparejan. El porcentaje de Similitud es el porcentaje de los símbolos que son similares. Los símbolos que están atravesados a los espacios se ignoran. La similitud se puntúa cuando el valor de la matriz de puntuación para un par de símbolos es mayor o igual a 0,50, el umbral de similitud. La matriz de puntuación utilizada en la Versión 10 del Wisconsin Genetics Software Package es BLOSUM62 (véase Henikoff y Henikoff (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915).

Para los fines de la presente invención, la comparación de las secuencias de nucleótidos o polipéptidos para la determinación del porcentaje de identidad de la secuencia con las secuencias de nucleótidos o polipéptidos descritas en la presente memoria se realiza preferiblemente utilizando el programa ClustalW (Versión 1.7 o posterior) con sus parámetros por defecto o cualquier programa equivalente. Por “programa equivalente” se quiere significar cualquier programa de comparación de secuencias que, para dos secuencias cualesquiera en cuestión, genera un alineamiento que tiene emparejamientos de nucleótidos o restos aminoácido y un porcentaje de identidad de la secuencia idéntico cuando se compara con el correspondiente alineamiento generado por el programa preferido.

(c) Según se utiliza en la presente memoria, “identidad de secuencia” o “identidad” en el contexto de dos secuencias de ácido nucleico o polipéptidos hace referencia a los restos de las dos secuencias que son los mismos cuando se alinean para una máxima correspondencia a lo largo de una ventana de comparación especificada. Cuando el porcentaje de identidad de secuencia se utiliza en referencia a proteínas se reconoce que las posiciones de los restos que no son idénticas a menudo difieren por sustituciones de aminoácidos conservativas, donde los restos aminoácido están sustituidos por otros restos aminoácido con propiedades químicas similares (p. ej., carga o carácter hidrófobo) y por lo tanto no cambian las propiedades funcionales de la molécula. Cuando las secuencias difieren en sustituciones conservativas, el porcentaje de identidad de la secuencia se puede ajustar al alza para corregir la naturaleza conservativa de la sustitución. Se dice que las secuencias que difieren en tales sustituciones conservativas tienen “similitud de secuencia” o “similitud”. Los medios para realizar este ajuste son bien conocidos por los expertos en la técnica. Típicamente esto implica puntuar una sustitución conservativa como un emparejamiento erróneo parcial en lugar de completo, incrementando de ese modo el porcentaje de identidad de la secuencia. De este modo, por ejemplo, cuando se da a un aminoácido idéntico una puntuación de 1 y se da a una sustitución no conservativa una puntuación de cero, se da a una sustitución conservativa una puntuación entre cero y 1. La puntuación de las sustituciones conservativas se calcula, p. ej., como se implementa en el programa PC/GENE (Intelligenetics, Mountain View, California).

(d) Según se utiliza en la presente memoria, “porcentaje de identidad de secuencia” representa el valor determinado comparando dos secuencias alineadas óptimamente a lo largo de una ventana de comparación, donde la porción de la secuencia de polinucleótidos en la ventana de comparación puede comprender adiciones o deleciones (esto es, espacios) en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o deleciones) para un alineamiento óptimo de las dos secuencias. El porcentaje se calcula determinando el número de posiciones en las cuales existe la base del ácido nucleico o el resto aminoácido idéntico en ambas secuencias para producir el número de posiciones emparejadas, dividiendo el número de posiciones emparejadas por el número total de posiciones de la ventana de comparación, y multiplicando el resultado por cien para dar el porcentaje de identidad de la secuencia.

(e)(i) El término “identidad sustancial” de las secuencias de polinucleótidos significa que un polinucleótido comprende una secuencia que tiene una identidad de secuencia de al menos 90%, 95%, o más en comparación con una secuencia de referencia utilizando uno de los programas de alineamiento descritos utilizando los parámetros normalizados. Un experto en la técnica reconocerá que estos valores se pueden ajustar apropiadamente para determinar la correspondiente identidad de los polipéptidos codificados por dos secuencias de nucleótidos tomando en consideración la degeneración de los codones, la similitud de los aminoácidos, la posición del marco de lectura, y similares. La identidad sustancial de las secuencias de aminoácidos para estos fines representa normalmente una identidad de secuencia de al menos 90%, o 95%.

Otra indicación de que las secuencias de nucleótidos son sustancialmente idénticas es si las dos moléculas hibridan entre sí en condiciones restrictivas. Generalmente, las condiciones restrictivas se seleccionan para que sean aproximadamente 5°C más bajas que el punto de fusión térmico (T_m) de la secuencia específica a una fuerza iónica y un pH definidos. No obstante, las condiciones restrictivas abarcan temperaturas en el intervalo de aproximadamente 1°C a

aproximadamente 20°C, dependiendo del grado de restricción deseado como se califica de otro modo en la presente memoria. Los ácidos nucleicos que no hibridan entre sí en condiciones restrictivas todavía son sustancialmente idénticos si los polipéptidos que codifican son sustancialmente idénticos. Esto puede ocurrir, p. ej. cuando se crea una copia de un ácido nucleico utilizando la máxima degeneración de codones permitida por el código genético. Una indicación de que dos secuencias de ácido nucleico son sustancialmente idénticas es cuando el polipéptido codificado por el primer ácido nucleico presenta reacción inmunológica cruzada con el polipéptido codificado por el segundo ácido nucleico.

(e)(ii) El término “identidad sustancial” en el contexto de un péptido indica que un péptido comprende una secuencia con una identidad de secuencia de al menos 90%, o 95% con la secuencia de referencia a lo largo de una ventana de comparación especificada. Preferiblemente, el alineamiento óptimo se realiza utilizando el algoritmo de alineamiento por homología de Needleman y Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443-453. Una indicación de que dos secuencias peptídicas son sustancialmente idénticas es que un péptido presenta reacción inmunológica cruzada con anticuerpos originados contra el segundo péptido. De este modo, un péptido es sustancialmente idéntico a un segundo péptido, por ejemplo, cuando los dos péptidos difieren solamente por una sustitución conservativa. Los péptidos que son “sustancialmente similares” comparten secuencias como se ha observado antes excepto que las posiciones de los restos que no son idénticos pueden diferir en cambios de aminoácidos conservativos.

Las secuencias de ácido nucleico de la presente invención se pueden expresar en una célula anfitriona tal como una célula de bacteria, hongo, levadura, insecto, mamífero, o vegetal. Se espera que los expertos en la técnica sean entendidos en los numerosos sistemas de expresión disponibles para la expresión de un ácido nucleico que codifica un polipéptido de la presente invención. No se intentará describir con detalle los diversos métodos conocidos para la expresión de polipéptidos en procariotas o eucariotas.

Según se utiliza en la presente memoria, “heterólogo” en referencia a un ácido nucleico es un ácido nucleico que se origina en una especie foránea, o, si es de la misma especie, está sustancialmente modificado a partir de su forma nativa en la composición y/o locus genómico por la intervención humana deliberada. Por ejemplo, un promotor unido operablemente a un gen estructural heterólogo es de una especie diferente de la del gen estructural del cual deriva, o, si es de la misma especie, uno o ambos están modificados sustancialmente a partir de su forma original. Una proteína heteróloga se puede originar a partir de una especie foránea, o, si es de la misma especie, está sustancialmente modificada a partir de su forma original por la intervención humana deliberada.

Por “célula anfitriona” se quiere significar una célula, que comprende una secuencia de ácido nucleico heteróloga de la invención. Las células anfitrionas pueden ser células procarióticas tales como *E. coli*, o células eucarióticas tales como células de levadura, insecto, anfibio, o mamífero. Preferiblemente, las células anfitrionas son células de plantas monocotiledóneas o dicotiledóneas, concretamente células de plantas de arroz, y maíz.

Las secuencias que confieren resistencia a enfermedades de la invención se proporcionan en casetes de expresión o constructos de ADN para la expresión en la planta de interés. El casete incluirá secuencias reguladoras 5' y 3' unidas operablemente a una secuencia de nucleótidos de la invención. Por “unida operablemente” se quiere significar una unión funcional entre un promotor y una segunda secuencia, donde la secuencia promotora inicia y media la transcripción de la secuencia de nucleótidos correspondiente a la segunda secuencia. Generalmente, unido operablemente significa que las secuencias de ácido nucleico que se están uniendo son contiguas y, cuando es necesario se juntan dos regiones codificadoras de proteínas, contiguas y en el mismo marco de lectura. El casete puede contener adicionalmente al menos un gen adicional que va a ser transformado simultáneamente en el organismo. Alternativamente, el gen o los genes adicionales pueden ser proporcionados en múltiples casetes de expresión.

Semejante casete de expresión se proporciona con una pluralidad de sitios de restricción para que la inserción de la secuencia resistente a la enfermedad esté bajo la regulación transcripcional de las regiones reguladoras. El casete de expresión puede contener adicionalmente genes marcadores seleccionables.

El casete de expresión incluirá en la dirección 5'-3' de la transcripción, una región de inicio transcripcional y traduccional, una secuencia de un péptido señal, una secuencia de ADN resistente a la enfermedad de la invención, y una región de terminación transcripcional y traduccional en plantas. La región de iniciación de la transcripción, el promotor, puede ser nativa o foránea o heteróloga con respecto al anfitrión vegetal. Adicionalmente, el promotor puede ser la secuencia natural o alternativamente una secuencia sintética. Por “foráneo” se quiere significar que la región de inicio de la transcripción no se encuentra en la planta nativa en la cual se introduce la región de inicio de la transcripción. Según se utiliza en la presente memoria, un gen quimérico comprende una secuencia codificadora unida operablemente a una región de inicio de la transcripción que es heteróloga con respecto a la secuencia codificadora.

Si bien puede ser preferible expresar las secuencias utilizando promotores heterólogos, se pueden utilizar las secuencias promotoras nativas. Tales constructos variarían los niveles de expresión del ARN/proteína resistente a la enfermedad en la planta o célula vegetal. De este modo, se altera el fenotipo de la planta o célula vegetal.

La región de terminación puede ser nativa con la región de inicio de la transcripción, puede ser nativa con la secuencia de ADN unida operablemente de interés, o puede derivar de otra fuente. Las regiones de terminación convenientes son asequibles del plásmido Ti de *A. tumefaciens*, tales como las regiones de terminación de la octopina sintasa y de la nopalina sintasa. Véase también Guerineau *et al.* (1991) *Mol. Gen. Genet.* 262:141-144; Proudfoot (1991) *Cell*

64:671-674; Sanfacon *et al.* (1991) *Genes Dev.* 5:141-149; Mogen *et al.* (1990) *Plant Cell* 2:1261-1272; Munroe *et al.* (1990) *Gene* 91:151-158; Ballas *et al.* (1989) *Nucleic Acids Res.* 17:7891-7903; y Joshi *et al.* (1987) *Nucleic Acid Res.* 15:9627-9639.

5 Cuando resulta apropiado, la secuencia de nucleótidos se puede optimizar para aumentar la expresión en el anfitrión transformado. Esto es, las secuencias de nucleótidos se pueden sintetizar utilizando codones preferidos por la planta para una mejor expresión en plantas. Los métodos se encuentran disponibles en la técnica para sintetizar secuencias de nucleótidos o genes preferidos por las plantas. Véanse, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos Núms. 5.380.831, y 5.436.391, y Murray *et al.* (1989) *Nucleic Acids Res.* 17:477-498.

10 Se sabe que las modificaciones de la secuencia adicionales intensifican la expresión génica en un anfitrión celular. Estas incluyen la eliminación de secuencias que codifican señales de poliadenilación falsas, señales de sitio de empalme exón-intrón, repeticiones de tipo transposón, y otras secuencias semejantes bien caracterizadas que pueden ser perjudiciales para la expresión génica. El contenido en G-C de la secuencia se puede ajustar a la media de los niveles para un anfitrión celular dado, calculado mediante referencia a genes conocidos expresados en la célula anfitriona. Cuando es posible, la secuencia se modifica para evitar estructuras de ARNm secundario en horquilla pronosticadas.

15 En ciertas realizaciones de la invención, es deseable utilizar el péptido maduro o la secuencia de nucleótidos que codifica el péptido maduro. Dentro de la célula, se producen frecuentemente modificaciones proteolíticas de las secuencias de aminoácidos. El evento proteolítico separa aminoácidos del polipéptido precursor para producir un péptido maduro. El procesamiento proteolítico puede ser altamente específico de la secuencia. A menudo los péptidos precursores son inactivos mientras los péptidos maduros poseen la actividad deseada. De este modo, el aislamiento de un péptido basado en su actividad produce un aislamiento del péptido maduro, activo. El descubrimiento de la existencia de pre-secuencias se produce cuando se identifica la secuencia de nucleótidos que codifica el péptido maduro. El marco de lectura abierto que codifica el péptido maduro también codifica las pre-secuencias que fueron eliminadas por la célula. La maduración proteolítica de las secuencias de aminoácidos se produce en múltiples localizaciones celulares incluyendo, pero no limitadas a, retículo endoplásmico, citoplasma, mitocondria, cloroplastos, núcleo, Aparato de Golgi, y matriz extracelular. El procesamiento proteolítico de los péptidos se estudia en Creighton, T. E. (1993) *Proteins: Structures & Molecular Properties*. W. H. Freeman & Co., U.S.A y Alberts *et al* eds. (1994) *Molecular Biology of the Cell*. Garland Publishing, Inc., Nueva York. En lugar de contar con una célula anfitriona para procesar apropiadamente el polipéptido de la invención, puede ser deseable el empleo de una secuencia de nucleótidos que codifica el péptido maduro.

20 Los casetes de expresión pueden contener adicionalmente secuencias líder 5' en el constructo del casete de expresión. Tales secuencias líder pueden actuar potenciando la traducción. Los líderes de la traducción son conocidos en la técnica e incluyen: líderes de picornavirus, por ejemplo, líder EMCV (región no codificadora 5' de la Encefalomiocarditis) (Elroy-Stein *et al.* (1989) *PNAS USA* 86:6126-6130); líderes de potivirus, por ejemplo, líder TEV (Virus del Grabado del Tabaco) (Allison *et al.* (1986); líder MDMV (Virus del Mosaico Enano del Maíz); *Virology* 154:9-20), y proteína de unión a la cadena pesada de la inmunoglobulina humana (BiP), (Macejak *et al.* (1991) *Nature* 353:90-94); líder no traducido del ARNm de la proteína de la envuelta del virus del mosaico de la alfalfa (AMV RNA 4) (Jobling *et al.* (1987) *Nature* 325:622-625); líder del virus del mosaico del tabaco (TMU) (Gallie *et al.* (1989) en *Molecular Biology of RNA*, ed. Cech (Liss, Nueva York), págs. 237-256); y líder del virus del moteado clorótico del maíz (MCMV) (Lommel *et al.* (1991) *Virology* 81:382-385). Véase también, Della-Cioppa *et al.* (1987) *Plant Physiol.* 84:965-968. También se pueden utilizar otros método conocidos por potenciar la traducción, por ejemplo, intrones, y similares.

25 Los péptidos señal se pueden fusionar a la secuencia de nucleótidos resistente a la enfermedad de la invención para dirigir el transporte del producto génico expresado fuera de la célula al sitio de acción deseado en el espacio intercelular. Los ejemplos de los péptidos señal incluyen aquellos unidos de forma nativa a la proteína alfa-amilasa de la Cebada (BAA), la esporamina, la orizascistatina-I, y aquellas de las proteínas relacionadas con la patogénesis de la planta, p. ej. PR-1, PR-2 etc.

30 En la preparación del casete de expresión, se pueden manipular diversos fragmentos de ADN, con el fin de proporcionar las secuencias de ADN en la orientación apropiada y, según sea apropiado, en el marco de lectura apropiado. A este fin, se pueden emplear adaptadores o ligadores para unir los fragmentos de ADN o pueden estar implicadas otras manipulaciones para proporcionar sitios de restricción convenientes, la eliminación de ADN superfluo, la eliminación de sitios de restricción, o similares. Para este fin, pueden estar implicados la mutagénesis *in vitro*, la reparación de cebadores, la restricción, la hibridación, las re-sustituciones, p. ej. transiciones y transversiones.

35 Generalmente, el casete de expresión comprenderá un gen marcador seleccionable para la selección de células transformadas. Los genes marcadores seleccionables se utilizan para la selección de células o tejidos transformados. Los genes marcadores incluyen genes que codifican resistencia a antibióticos, tales como los que codifican la neomicina fosfotransferasa II (NEO) y la higromicina fosfotransferasa (HPT), así como los genes que confieren resistencia a compuestos herbicidas, tales como el glufosinato amonio, el bromoxinil, las imidazolinonas, y el 2,4-diclorofenoxiacetato (2,4-D), y las sulfonilureas (SU). Véase generalmente, Yarranton (1992) *Curr. Opin. Biotech* 3:506-511; Christopherson *et al.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:6314-6318; Yao *et al.* (1992) *Cell* 71:63-72; Reznikoff (1992) *Mol. Microbiol.* 6:2419-2422; Barkley *et al.* (1980) en *The Operon*, págs. 177-220; Hu *et al.* (1987) *Cell* 48:555-566; Brown *et al.* (1987) *Cell* 49:603-612; Figge *et al.* (1988) *Cell* 52:713-722; Deuschle *et al.* (1989) *Proc. Natl.*

Acad. Sci. USA 86:5400-5404; Fuerst *et al.* (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:2549-2553; Deuschle *et al.* (1990) *Science* 248:480-483; Gossen (1993) Ph. D. Thesis, Universidad de Heidelberg; Reines *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:1917-1921; Labow *et al.* (1990) *Mol. Cell. Biol.* 10:3343-3356; Zambretti *et al.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:3952-3956; Baim *et al.* (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:5072-5076; Wyborski *et al.* (1991) *Nucleic Acids Res.* 19:4647-4653; Hillenand-Wissman (1989) *Topics Mol. Struc. Biol.* 10:143-162; Degenkolb *et al.* (1991) *Antimicrob. Agents Chemother.* 35:1591-1595; Kleinschmidt *et al.* (1988) *Biochemistry* 27:1094-1104; Bonin (1993) Ph.D. Thesis, Universidad de Heidelberg; Gossen *et al.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:5547-5551; Oliva *et al.* (1992) *Antimicrob. Agents Chemother.* 36:913-919; Hlavka *et al.* (1985) *Handbook of Experimental Pharmacology*, Vol. 78 (Springer-Verlag, Berlin); Gill *et al.* (1988) *Nature* 334:721-724.

No se pretende que la lista anterior de genes marcadores seleccionables sea limitante. En la presente invención se puede utilizar cualquier gen marcador seleccionable.

Se pueden utilizar numerosos promotores en la práctica de la invención. Los promotores se pueden seleccionar basándose en el resultado deseado. Esto es, los ácidos nucleicos se pueden combinar con promotores constitutivos, preferidos por el tejido, inducibles u otros para su expresión en plantas. Tales promotores constitutivos incluyen, por ejemplo, el promotor núcleo del promotor Rsyn7 y otros promotores constitutivos descritos en la publicación WO 99/43838 y en la Patente de los Estados Unidos Núm. 6.072.050; el promotor Scp1 (Patente de los Estados Unidos 6.072.050), la actina del arroz (McElroy *et al.* (1990) *Plant Cell* 2:163-171); la ubiquitina (Christensen *et al.* (1989) *Plant Mol. Biol.* 12:619-632 y Christensen *et al.* (1992) *Plant Mol. Biol.* 18:675-689); pEMU (Last *et al.* (1991) *Theor. Appl. Genet.* 81:581-588); MAS (Velten *et al.* (1984) *EMBO J.* 3:2723-2730); el promotor ALS (Patente de los Estados Unidos Núm. 5.659.026), h2B de maíz (Solicitud PCR Núm. de Serie WO 99/43797) y similares. Otros promotores constitutivos incluyen, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos Núms. 5.608.149; 5.608.144; 5.604.121; 5.569.597; 5.466.785; 5.399.680; 5.268.463; 5.608.142; y 6.177.611.

Generalmente, será beneficioso expresar el gen a partir de un promotor inducible, concretamente a partir de un promotor inducible por patógenos. Tales promotores incluyen aquellas proteínas relacionadas con la patogénesis (proteínas PR), que son inducidas después de la infección por un patógeno; p. ej. proteínas PR, proteínas SAR, beta-1,3-glucanasa, quitinasa, etc. Véase, por ejemplo, Redolfi *et al.* (1983) *Neth. J. Plant Pathol.* 89:245-254; Uknes *et al.* (1992) *Plant Cell* 4:645-656; y Van Loon (1985) *Plant Mol. Virol.* 4:111-116. Véase también la publicación WO 99/43819.

Tienen interés los promotores que se expresan localmente en o cerca del sitio de infección del patógeno. Véase, por ejemplo, Marineau *et al.* (1987) *Plant Mol. Biol.* 9:335-342; Matton *et al.* (1989) *Molecular Plant-Microbe Interactions* 2:325-331; Somsisch *et al.* (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:2427-2430; Somsisch *et al.* (1988) *Mol. Gen. Genet.* 2:93-98; y Yang (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:14972-14977. Véase también, Chen *et al.* (1996) *Plant J.* 10:955-966; Zhang *et al.* (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:2507-2511; Warner *et al.* (1993) *Plant J.* 3:191-201; Siebertz *et al.* (1989) *Plant Cell* 1:961-968; Patente de los Estados Unidos Núm. 5.750.386 (inducible por nematodos); y las referencias allí citadas. Tiene un interés particular el promotor inducible para el gen PRms de maíz, cuya expresión está inducida por el patógeno *Fusarium moniliforme* (véase, por ejemplo, Cordero *et al.* (1992) *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 41:189-200).

Adicionalmente, puesto que los patógenos encuentran entrada en las plantas a través de las heridas o las lesiones por insectos, se puede utilizar un promotor inducible por heridas en las construcciones de la invención. Tales promotores inducibles por heridas incluyen el gen inhibidor de la proteinasa de patata (pin II) (Ryan (1990) *Ann. Rev. Phytopath.* 28:425-449; Duan *et al.* (1996) *Nature Biotechnology* 14:494-498); wun1 y wun2, Patente de los Estados Unidos Núm. 5.428.148; win1 y win2 (Stanford *et al.* (1989) *Mol. Gen. Genet.* 215:200-208); sistemina (McGurl *et al.* (1992) *Science* 225:1570-1573); WIP1 (Rohmeier *et al.* (1993) *Plant Mol. Biol.* 22:783-792; Eckelkamp *et al.* (1993) *FEBS Letters* 323:73-76); el gen MPI (Corderok *et al.* (1994) *Plant J.* 6(2):141-150); y similares.

Se pueden utilizar promotores regulados por agentes químicos para modular la expresión de un gen en una planta a través de la aplicación de un regulador químico exógeno. Dependiendo del objetivo, el promotor puede ser un promotor inducible por un agente químico, donde la aplicación del agente químico induce la expresión génica, o un promotor reprimible por un agente químico, donde la aplicación del agente químico reprime la expresión génica. Los agentes inducibles por agentes químicos son conocidos en la técnica e incluyen, pero no están limitados a, el promotor In2-2 de maíz, que es activado por antídotos de herbicidas de bencenosulfonamida, el promotor GST del maíz, que es activado por compuestos electrofílicos hidrófobos que se utilizan como herbicidas de pre-emergencia, y el promotor PR-1a del tabaco, que es activado por ácido salicílico. Otros promotores regulados por agentes químicos de interés incluyen los promotores sensibles a esteroides (véase, por ejemplo, el promotor inducible por glucocorticoides en Schemen *et al.* (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:10421-10425 y McNellis *et al.* (1998) *Plant J.* 14(2):247-257) y los promotores inducibles por tetraciclina y reprimibles por tetraciclina (véase, por ejemplo, Gatz *et al.* (1991) *Mol. Gen. Genet.* 227:229-237, y Patentes de los Estados Unidos Núms. 5.814.618 y 5.789.156).

Se pueden utilizar promotores preferidos por los tejidos para dirigir la expresión potenciada de un polipéptido antimicrobiano en un tejido vegetal concreto. Véase, por ejemplo, Yamamoto *et al.* (1997) *Plant J.* 12(2):255-265; Kawamata *et al.* (1997) *Plant Cell Physiol.* 38(7):792-803; Hansen *et al.* (1997) *Mol. Gen. Genet.* 254(3):337-343; Russell *et al.* (1997) *Transgenic Res.* 6(2):157-168; Rinehart *et al.* (1996) *Plant Physiol.* 112(3):1331-1341; Van Camp *et al.* (1996) *Plant Physiol.* 112(2):525-535; Canevascini *et al.* (1996) *Plant Physiol.* 112(2):513-524; Yamamoto *et*

al. (1994) *Plant Cell Physiol.* 35(5):773-778; Lam (1994) *Results Probl. Cell Differ.* 20:181-196; Orozco *et al.* (1993) *Plant Mol Biol.* 23(6):1129-1138; Matsuoka *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90(20):9586-9590; y Guevara-García *et al.* (1993) *Plant J.* 4(3):495-505. Tales promotores se pueden modificar, si es necesario, para una expresión débil.

5

El método de transformación/transfección no es crítico para la presente invención; en la actualidad se encuentran disponibles varios métodos de transformación o transfección. De este modo, se puede emplear cualquier método, que proporcione una transformación/transfección eficaz. Los protocolos de transformación así como los protocolos para introducir secuencias de nucleótidos en las plantas pueden variar dependiendo del tipo de planta o célula vegetal, esto es, monocotiledóneas o dicotiledóneas, buscada para la transformación. Los métodos adecuados para introducir secuencias de nucleótidos en células vegetales y su posterior inserción en el genoma de la planta incluyen la microinyección (Crossway *et al.* (1986) *Biotechniques* 4:320-334), la electroporación (Riggs *et al.* (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:5602-5606), la transformación mediada por *Agrobacterium* (Townsend *et al.*, Patente de los Estados Unidos Núm. 5.563.055; Zhao *et al.*, Patente de los Estados Unidos Núm. 5.981.840), la transferencia génica directa (Paszowski *et al.* (1984) *EMBO J.* 3:2717-2722), y la aceleración de partículas balísticas (véase, por ejemplo, Sanford *et al.*, Patente de los Estados Unidos Núm. 4.945.050; Tomes *et al.*, Patente de los Estados Unidos Núm. 5.879.918; Tomes *et al.*, Patente de los Estados Unidos Núm. 5.886.244; Bidney *et al.*, Patente de los Estados Unidos Núm. 5.932.782; Tomes *et al.* (1995) "Direct DNA Transfer into Intact Plant Cells via Microprojectile Bombardment", en *Plant Cell, Tissue, and Organ Culture: Fundamental Methods*, ed. Gamborg y Phillips (Springer-Verlag, Berlin); McCabe *et al.* (1988) *Biotechnology* 6:923-926); y la transformación *Lec1* (Publicación WO 00/28058). Véase también Weissinger *et al.* (1988) *Ann. Rev. Genet.* 22:421-477; Sanford *et al.* (1987) *Particulate Science and Technology* 5:27-37 (cebolla); Christou *et al.* (1988) *Plant Physiol.* 87:671-674 (soja); McCabe *et al.* (1988) *Bio/Technology* 6:923-926 (soja); Finer y McMullen (1991) *In Vitro Cell Dev. Biol.* 27P:175-182 (soja); Singh *et al.* (1998) *Theor. Appl. Genet.* 96:319-324 (soja); Datta *et al.* (1990) *Biotechnology* 8:736-740 (arroz); Klein *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:4305-4309 (maíz); Klein *et al.* (1988) *Biotechnology* 6:559-563 (maíz); Tomes, Patente de los Estados Unidos Núm. 5.240.855; Buising *et al.*, Patentes de los Estados Unidos Núms. 5.322.783 y 5.324.646; Tomes *et al.* (1995) "Direct DNA Transfer into Intact Plant Cells via Microprojectile Bombardment", en *Plant Cell, Tissue, and Organ Culture: Fundamental Methods*, ed. Gamborg (Springer-Verlag, Berlin) (maíz); Klein *et al.* (1988) *Plant Physiol.* 91:440-444 (maíz); Fromm *et al.* (1990) *Biotechnology* 8:833-839 (maíz); Hooykaas-Van Slogteren *et al.* (1984) *Nature* (Londres) 311:763-764; Bowen *et al.*, Patente de los Estados Unidos Núm. 5.736.369 (cereales); Bytebier *et al.* (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:5345-5349 (Liliaceae); De Wet *et al.* (1985) en *The Experimental Manipulation of Ovule Tissues*, ed. Chapman *et al.* (Longman, Nueva York), págs. 197-209 (polen); Kaeppler *et al.* (1990) *Plant Cell Reports* 9:415-418 y Kaeppler *et al.* (1992) *Theor. Appl. Genet.* 84:560-566 (transformación mediada por fibra whisker); D'Halluin *et al.* (1992) *Plant Cell* 4:1.495-1505 (electroporación); Li *et al.* (1993) *Plant Cell Reports* 12:250-255 y Christou y Ford (1995) *Annals of Botany* 75:407-413 (arroz); Osjoda *et al.* (1996) *Nature Biotechnology* 14:745-750 (maíz via *Agrobacterium tumefaciens*).

Las células que han sido transformadas se pueden hacer crecer en plantas de acuerdo con los modos convencionales. véase, por ejemplo, McCormick *et al.* (1986) *Plant Cell Reports* 5:81-84. Estas plantas se pueden hacer crecer después, y se pueden polinizar con la misma cepa transformada o con cepas diferentes, y se puede identificar el híbrido resultante que tiene una expresión constitutiva de la característica fenotípica deseada identificada. Se pueden hacer crecer dos o más generaciones para asegurarse de que la expresión constitutiva de la característica fenotípica deseada se mantiene y se hereda establemente y después se cosechan las semillas para asegurarse de que se ha logrado la expresión constitutiva de la característica fenotípica deseada.

45

Se puede utilizar la presente invención para la transformación de cualquier especie de planta, incluyendo, pero no limitadas a, monocotiledóneas y dicotiledóneas. Los ejemplos de las plantas de interés incluyen, pero no están limitados a, arroz (*Oryza sativa*), maíz (*Zea mays*), *Brassica* sp. (p. ej., *B. napus*, *B. rapa*, *B. juncea*), concretamente aquellas especies de *Brassica* útiles como fuentes de aceite de semillas, alfalfa (*Medicago sativa*), centeno (*Secale cereale*), sorgo (*Sorghum bicolor*, *Sorghum vulgare*), mijo (p. ej., mijo perla (*Pennisetum glaucum*), mijo común (*Panicum miliaceum*), mijo de cola de zorra (*Setaria italica*), mijo africano (*Eleusine coracana*)), girasol (*Helianthus annuus*), cártamo (*Carthamus tinctorius*), trigo (*Triticum aestivum*), soja (*Glycine max*), tabaco (*Nicotiana tabacum*), patata (*Solanum tuberosum*), cacahuete (*Arachis hypogaea*), algodón (*Gossypium barbadense*, *Gossypium hirsutum*), batata (*Ipomoea batatas*), yuca (*Manihot esculenta*), café (*Coffea* spp.), coco (*Cocos nucifera*), piña (*Ananas comosus*), árboles cítricos (*Citrus* spp.), cacao (*Theobroma cacao*), te (*Camellia sinensis*), banana (*Musa* spp.), aguacate (*Persea americana*), higo (*Ficus casica*), guayaba (*Psidium guajava*), mango (*Mangifera indica*), olivo (*Olea europaea*), papaya (*Carica papaya*), anacardo (*Anacardium occidentale*), macadamia (*Macadamia integrifolia*), almendra (*Prunus amygdalus*), remolacha azucarera (*Beta vulgaris*), caña de azúcar (*Saccharum* spp.), avenas, cebada, hortalizas, plantas ornamentales, y coníferas.

60

Las hortalizas incluyen tomates (*Lycopersicon esculentum*), lechuga (p. ej., *Lactuca sativa*), judías verdes (*Phaseolus vulgaris*), judías de riñón (*Phaseolus limensis*), guisantes (*Lathyrus* spp.), y miembros del género *Cucumis* tales como pepino (*C. sativus*), melón galia (*C. cantalupensis*), y melón (*C. melo*). Las ornamentales incluyen azalea (*Rhododendron* spp.), hortensia (*Macrophylla hydrangea*), hibisco (*Hibiscus rosasanensis*), rosas (*Rosa* spp.), tulipanes (*Tulipa* spp.), narcisos (*Narcissus* spp.), petunias (*Petunia hybrida*), claveles (*Dianthus caryophyllus*), flor de pascua (*Euphorbia pulcherrima*), y crisantemos. Las coníferas que se pueden emplear en la práctica de la presente invención incluyen, por ejemplo, pinos tales como el pino taeda (*Pinus taeda*), pino resinoso (*Pinus elliotii*), pino ponderosa (*Pinus ponderosa*), pino contorta (*Pinus contorta*), y pino Monterrey (*Pinus radiata*); abeto de Douglas (*Pseudotsuga*

65

menziesii); tsuga del este (*Tsuga canadensis*); abeto plateado (*Picea glauca*); secuoya (*Sequoia sempervirens*); abetos verdaderos tales como el abeto plateado del Pacífico (*Abies amabilis*) y abeto balsámico (*Abies balsamea*); y los cedros tales como cedro gigante (*Thuja plicata*) y cedro Alaska (*Chamaecyparis nootkatensis*). Preferiblemente, las plantas de la presente invención son plantas de cultivo (por ejemplo, arroz, maíz, alfalfa, girasol, *Brassica*, soja, algodón, cártamo, cacahuete, sorgo, trigo, mijo, tabaco, etc.).

Las células procarióticas se pueden utilizar como anfitriones para la expresión. Los procariotas muy frecuentemente están representados por diversas cepas de *E. coli*; no obstante, también se pueden utilizar otras cepas microbianas. Las secuencias de control procarióticas utilizadas comúnmente que se definen en la presente memoria por incluir promotores para el inicio de la transcripción, opcionalmente con un operador, junto con secuencias de unión a ribosomas, incluyen promotores utilizados comúnmente tales como los sistemas promotores de la beta lactamasa (penicilinas) y la lactosa (lac) (Chang *et al.* (1977) *Nature* 198:1056), el sistema promotor del triptófano (trp) (Goeddel *et al.* (1980) *Nucleic Acids Res.* 8:4057) y el promotor P_L derivado de lambda y el sitio de unión al ribosoma del gen N (Shimatake *et al.* (1981) *Nature* 292:128). La inclusión de marcadores de selección en los vectores de ADN transfectados en *E. coli* también resulta útil. Los ejemplos de tales marcadores incluyen genes que especifican resistencia a ampicilina, tetraciclina, o cloramfenicol.

El vector se selecciona para permitir la introducción en la célula anfitriona apropiada. Los vectores bacterianos son típicamente de origen plasmídico o de fagos. Las células bacterianas apropiadas se infectan con partículas vectoras de fagos o se transfectan con ADN de vector de fago desnudo. Si se utiliza un vector plasmídico, las células bacterianas se transfectan con el ADN del vector plasmídico. Los sistemas de expresión para expresar un polipéptido de la presente invención son asequibles utilizando *Bacillus sp.* y *Salmonella* (Palva *et al.* (1983) *Gene* 22:229-235); Mosbach *et al.* (1983) *Nature* 302:543-545).

Los expertos en la técnica conocen una variedad de sistemas de expresión eucarióticos tales como levadura, líneas celulares de insecto, células vegetales y de mamífero. Como se explica brevemente más abajo, se puede expresar un polinucleótido de la presente invención en estos sistemas eucarióticos. En algunas realizaciones, se emplean células vegetales transformadas/transfectadas, como se comenta *infra*, como sistemas de expresión para la producción de los polipéptidos de la presente invención.

Las secuencias de la presente invención también se pueden ligar a diversos vectores de expresión para su uso en la transfección de cultivos celulares, por ejemplo, de origen mamífero, insecto, o vegetal. Los cultivos celulares ilustrativos útiles para la producción de péptidos son las células de mamífero. Se han desarrollado en la técnica numerosas líneas celulares anfitrionas adecuadas capaces de expresar proteínas intactas, e incluyen las líneas celulares HEK293, BHK21, y CHO. Los vectores de expresión para estas células pueden incluir secuencias de control de la expresión, tales como un origen de replicación, un promotor (p. ej. el promotor CMV, un promotor *tk* de HSV o un promotor *pgk* (fosfogliceratoquinasa)), un intensificador (Queen *et al.* (1986) *Immunol. Rev.* 89:49), y sitios de información del procesamiento necesarios, tales como sitios de unión al ribosoma, sitios de empalme del ARN, sitios de poliadenilación (p. ej., un sitio de adición poli A del Ag T grande de SV40), y secuencias terminadoras de la transcripción. Otras células animales útiles para la producción de los polipéptidos de la presente invención son asequibles, por ejemplo, de la Colección de Cultivos Tipo Americana.

Los vectores apropiados para expresar los polipéptidos de la presente invención en células de insecto derivan normalmente del baculovirus SF9. Las líneas celulares de insecto adecuadas incluyen las líneas celulares de larvas de mosquito, gusano de seda, oruga militar, polilla y *Drosophila* tales como la línea celular de Schneider (Véase, Schneider (1987) *J. Embryol. Exp. Morphol.* 27:353-365).

Como con la levadura, cuando se emplean células anfitrionas de animales superiores o plantas, se incorporan típicamente al vector secuencias de poliadenilación o terminadoras de la transcripción. Un ejemplo de una secuencia terminadora es la secuencia de poliadenilación del gen de la hormona de crecimiento bovina. También se pueden incluir las secuencias para el empalme exacto del transcrito. Un ejemplo de una secuencia de empalme es el intrón VP1 de SV40 (Sprague *et al.* (1983) *J. Virol.* 45:773-781). Adicionalmente, se pueden incorporar al vector secuencias génicas para controlar la replicación en la célula anfitriona tales como las encontradas en los vectores de tipo virus del papiloma bovino (Saveria-Campo (1985) *DNA Cloning Vol. II a Practical Approach*, D.M. Glover, Ed., IRL Press, Arlington, Virginia, págs. 213-238).

Las células anfitrionas animales y eucarióticas inferiores (p. ej., levadura) son competentes o se vuelven competentes para la transfección mediante diversos métodos. Existen numerosos métodos bien conocidos de introducción de ADN en células animales. Estos incluyen: precipitación con fosfato de calcio, fusión de las células receptoras con protoplastos bacterianos que contienen el ADN, tratamiento de las células receptoras con liposomas que contienen el ADN, DEAE dextrina, electroporación, biobalística (bombardeo por una partícula), y micro-inyección del ADN directamente en las células. Las células transfectadas se cultivan por métodos bien conocidos en la técnica (Kuchler (1997) *Biochemical Methods in Cell Culture and Virology*, Dowden, Hutchinson y Ross, Inc.).

La síntesis de secuencias de nucleótidos heterólogas en levadura es bien conocida (Sherman *et al.* (1982) *Methods in Yeast Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory). Dos levaduras ampliamente utilizadas para la producción de proteínas eucarióticas son *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris*. Los vectores, las cepas, y los protocolos para la expresión en *Saccharomyces* y *Pichia* son conocidos en la técnica y son asequibles de proveedores comerciales (p. ej.,

Invitrogen). Los vectores adecuados tienen normalmente secuencias de control de la expresión, tales como promotores, incluyendo la 3-fosfoglicerato quinasa o la alcohol oxidasa, y un origen de replicación, secuencias terminadoras y similares según se desee.

Un polipéptido de la presente invención, una vez expresado, se puede aislar de la levadura lisando las células y aplicando técnicas de aislamiento de proteínas normalizadas a los productos lisados. El control del proceso de purificación se puede completar utilizando técnicas de transferencia Western, espectros de absorción de UV, radioinmunoanálisis, u otras técnicas de inmunoanálisis normalizadas.

La invención se refiere a un método general para identificar y elaborar composiciones antimicrobianas, concretamente composiciones antifúngicas. Los métodos implican inyectar a un insecto una suspensión de un hongo patógeno de una planta para inducir polipéptidos del insecto que poseen actividad antimicrobiana. Tales polipéptidos se aíslan de la hemolinfa del insecto utilizando una combinación de cromatografía de líquidos de alta resolución y espectrofotometría de masas.

La estrategia general para el descubrimiento de estos péptidos antimicrobianos derivados de insectos implica sensibilizar a los insectos con un patógeno vegetal seleccionado y recoger muestras de la hemolinfa y de los cuerpos grasos en diferentes momentos después de la inducción. Por ejemplo, las muestras de hemolinfa y cuerpos grasos se pueden recoger a intervalos de aproximadamente 8 horas, 16 horas, 24 horas, o 48 horas. Se reconoce que se puede utilizar cualquier método para la separación e identificación de proteínas para aislar los péptidos y las correspondientes secuencias de ácido nucleico.

Si bien no se desea estar ligado a ningún método concreto, la identificación de péptidos antimicrobianos activos contra el patógeno diana se puede lograr utilizando un enfoque de bioanálisis proteómico, genómico, y miniaturizado integrado. Este enfoque consiste en la separación de la hemolinfa aislada de insectos inducidos. Se puede utilizar cualquier método de separación incluyendo la separación mediante HPLC. Se pueden separar fracciones a partir de la separación ayudada por HPLC en fracciones de 30 segundos en un formato de placa de microtitulación, esto es, placa de microtitulación de 96 pocillos. Las fracciones recogidas de esta manera se secan y se utilizan directamente en un análisis de crecimiento fúngico (FGA) en el que las fracciones secas se resuspenden en 100 μ l de caldo de patata dextrosa de fuerza media que contiene una suspensión del patógeno fúngico diana. Las fracciones que contienen péptidos antimicrobianos se identifican en el FGA por medio de su capacidad para inhibir el crecimiento fúngico después de varias horas, generalmente 24 a 48 horas. Estas fracciones se someten a una purificación adicional con el fin de aislar péptidos individuales y el péptido específico responsable de la actividad observada se determina mediante FGA. Este péptido se secuencia N-terminalmente después y se determina su peso molecular mediante espectrometría de masas para proporcionar información para identificar el gen correspondiente a partir de los datos de la secuencia derivados de las genotecas de ADNc de insecto correspondientes. La secuencia de aminoácidos completa del péptido se determina mediante traducción de la secuencia de ácido nucleico y el péptido maduro se identifica basándose tanto en la secuencia N-terminal como en la información del peso molecular.

Los agentes defensivos de la invención abarcan los péptidos maduros activos así como las formas no procesadas o las formas prepro de los péptidos. Cuando un péptido maduro ha sido aislado, se puede obtener la secuencia prepro, o secuencia señal, por medio de numerosos mecanismos de la biología molecular general conocidos en la técnica.

Como se ha indicado, los agentes defensivos se pueden aislar de cualquier insecto de interés. Tienen un interés particular los insectos que viven en entornos severos y los insectos que son depredadores naturales de las plantas. Si bien se puede utilizar cualquier insecto, puede resultar beneficioso utilizar insectos depredadores de una planta concreta de interés. Por ejemplo, para obtener agentes defensivos para utilizar en el maíz, si bien se puede utilizar cualquier insecto, pueden ser beneficiosos los insectos depredadores del maíz.

Aunque se puede inducir un agente defensivo por medio de un patógeno concreto, se prevé que el agente defensivo puede ser eficaz contra uno o más patógenos adicionales, incluyendo, pero no limitados a, cualquiera de los patógenos enumerados antes.

Los polipéptidos se someten a ensayo en cuanto a la actividad antimicrobiana utilizando análisis *in vitro* como se describe en otra parte en la presente memoria. Los polipéptidos antimicrobianos aislados se someten a proteólisis, y se secuencian los extremos amino de los fragmentos proteolíticos resultantes. Se utilizan oligonucleótidos degenerados que codifican las etiquetas de secuencia amino terminal para identificar los ADNc que codifican el polipéptido antimicrobiano a partir de genotecas de ADNc de insecto inducidas por el correspondiente patógeno. Las moléculas de ácido nucleico que codifican los polipéptidos antimicrobianos se utilizan para la transformación de células vegetales para generar plantas con una resistencia incrementada a la enfermedad. Adicionalmente, las composiciones de la invención se pueden utilizar para generar formulaciones que poseen actividades de resistencia a enfermedades.

Se proporcionan los métodos para incrementar la resistencia a patógenos en una planta. Los métodos implican transformar establemente una planta con un constructo de ADN que comprende una secuencia de nucleótidos de un agente defensivo de la invención unido operablemente a un promotor que dirige la expresión en una planta. Tales métodos pueden encontrar uso en la agricultura concretamente al limitar el impacto de los patógenos fúngicos de las plantas sobre las plantas de cultivo. Las secuencias de nucleótidos antimicrobianas comprenden las moléculas de ácido nucleico de insecto de la invención y las variantes y fragmentos funcionales de las mismas. La elección del promotor

dependerá del ritmo y la localización deseados de la expresión de las secuencias de nucleótidos antimicrobianas. Los promotores de la invención incluyen promotores constitutivos, inducibles, y preferidos por los tejidos.

Como se ha comentado antes, las secuencias de nucleótidos de la invención codifican polipéptidos con propiedades antimicrobianas, concretamente propiedades fungicidas. Por tanto, las secuencias de la invención pueden potenciar la resistencia a las enfermedades de las plantas transgénicas desorganizando la función celular de los patógenos de las plantas, concretamente los patógenos fúngicos de las plantas. No obstante, se reconoce que la presente invención no depende del mecanismo concreto de defensa. En vez de eso, las composiciones y métodos de la invención funcionan incrementando la resistencia de la planta a los patógenos independientemente de cómo se obtiene o se incrementa esa resistencia.

Los métodos de la invención se pueden utilizar con otros métodos disponibles en la técnica para potenciar la resistencia a las enfermedades en las plantas. De un modo similar, las composiciones antimicrobianas descritas en la presente memoria se pueden utilizar solas o combinadas con otras secuencias de nucleótidos, polipéptidos, o agentes para la protección frente a las enfermedades y los patógenos de las plantas. Aunque se puede utilizar cualquiera de una variedad de segundas secuencias de nucleótidos, las realizaciones específicas de la invención abarcan aquellas segundas secuencias de nucleótidos que, cuando se expresan en una planta, ayudan a incrementar la resistencia de una planta a los patógenos.

Las proteínas, péptidos, y lisozimas que se encuentran naturalmente en los insectos (Jaynes *et al.* (1987) *Bioassays* 6:263-270), plantas (Broekaert *et al.* (1997) *Critical Reviews in Plant Sciences* 16:297-323), animales (Vunnam *et al.* (1997) *J. Péptido Res.* 49:59-66), y humanos (Mitra y Zang (1994) *Plant Physiol.* 106:977-981; Nakajima *et al.* (1997) *Plant Cell Reports* 16:674-679) también son una fuente potencial de resistencia a las enfermedades de las plantas (Ko, K. (2000) <http://www.scisoc.org/feature/BioTechnology/antimicrobial.html>). Los ejemplos de tales secuencias que confieren resistencia incluyen aquellas que codifican la Proteína Activadora de rhoGTPasa de girasol (rhoGAP), la lipoxigenasa (LOX), la Alcohol Deshidrogenasa (ADH), y la Proteína-1 Inducible por *Sclerotinia* (SCIP-1). Estas secuencias de nucleótidos potencian la resistencia a las enfermedades de las plantas por medio de la modulación del desarrollo, las rutas de desarrollo, y el sistema de defensa frente a los patógenos de las plantas. Otras proteínas de defensa de las plantas incluyen aquellas descritas en la publicación WO 99/43823 y WO 99/43821. Se reconoce que tales segundas secuencias de nucleótidos se pueden utilizar en orientación efectora o antisentido dependiendo del resultado deseado.

En una realización de la invención, los polipéptidos de la invención se pueden formular con un portador aceptable en una o varias composiciones antimicrobianas, esto es, por ejemplo, una suspensión, una solución, una emulsión, un polvo fino, un gránulo dispersable, un polvo mojable, y un producto concentrado emulsionable, un aerosol, un gránulo impregnado, un coadyuvante, o una pasta aplicable como recubrimiento, y también en encapsulaciones, por ejemplo, sustancias poliméricas.

En otra realización, los agentes defensivos comprenden los polipéptidos aislados de la invención. Los agentes defensivos de la invención encuentran uso en la descontaminación de patógenos de las plantas durante el tratamiento del grano para consumo animal o humano; durante el tratamiento de piensos, y durante el tratamiento de material vegetal para ensilaje. En esta realización, los agentes defensivos de la invención, se presentan al grano, al material vegetal para ensilaje, o al cultivo alimenticio contaminado, o durante una fase apropiada del procedimiento de tratamiento, en cantidades eficaces para la actividad anti-microbiana. Las composiciones se pueden aplicar al entorno de un patógeno vegetal, por ejemplo, mediante pulverización, atomización, espolvoreado, dispersión, recubrimiento o vertido, introducción en el suelo, introducción en el agua de riego, mediante tratamiento de las semillas, o espolvoreado en el momento en el que el patógeno vegetal ha comenzado a aparecer o antes de la aparición de las plagas como medida de protección. En la práctica de la invención, se reconoce que se puede utilizar cualquier medio para poner en contacto los polipéptidos agentes defensivos con el patógeno vegetal.

Se proporcionan los métodos para controlar los patógenos vegetales que comprenden aplicar una cantidad descontaminante de un polipéptido o una composición de la invención al entorno del patógeno vegetal. Los polipéptidos de la invención se pueden formular con un portador aceptable en una o varias composiciones que son, por ejemplo, una suspensión, una solución, una emulsión, un polvo fino, un gránulo dispersable, un polvo mojable, un producto concentrado emulsionable, un aerosol, un gránulo impregnado, un coadyuvante, una pasta aplicable como recubrimiento, y también encapsulaciones, por ejemplo, en sustancias poliméricas.

Tales composiciones descritas antes se pueden obtener mediante la adición de un agente tensioactivo, un portador inerte, un conservante, un humectante, un estimulador de la alimentación, un atrayente, un agente de encapsulación, un aglutinante, un emulsionante, un colorante, un protector de UV, un tampón, un agente fluidificante o fertilizantes, donadores de micronutrientes u otras preparaciones que influyen en el crecimiento de la planta. Se pueden combinar uno o más productos agroquímicos incluyendo, pero no limitados a, herbicidas, insecticidas, fungicidas, bactericidas, nematocidas, moluscicidas, acaricidas, reguladores del crecimiento vegetal, coadyuvantes de cultivo, y fertilizantes, con los portadores, tensioactivos, o coadyuvantes empleados de manera acostumbrada en la técnica de la formulación u otros componentes para facilitar la manipulación y aplicación del producto a micotoxinas diana concretas. Los portadores y coadyuvantes adecuados pueden ser sólidos o líquidos y corresponden a sustancias empleados normalmente en la tecnología de la formulación, p. ej., sustancias minerales naturales o regeneradas, disolventes, dispersantes, agentes humectantes, promotores de la pegajosidad, aglutinantes, o fertilizantes. Los ingredientes activos de la presente

invención se aplican normalmente en forma de composiciones y se pueden aplicar a la zona de cultivo o a la planta que se va a tratar, simultáneamente o sucesivamente, con otros compuestos. En algunas realizaciones, los métodos de aplicación del ingrediente activo de la presente invención o de una composición agroquímica de la presente invención (que contiene al menos una de las proteínas de la presente invención) son la aplicación foliar, el recubrimiento de semillas, y la aplicación al suelo.

Los agentes tensioactivos adecuados incluyen, pero no están limitados a, compuestos aniónicos tales como un carboxilato, por ejemplo, de un metal; un carboxilato de un ácido graso de cadena larga; un N-acilsarcosinato; mono o di-ésteres de ácido fosfórico con productos etoxilados alcohólicos grasos o sales de tales ésteres; sulfatos de alcoholes grasos tales como dodecilsulfato de sodio, octadecilsulfato de sodio, cetilsulfato de sodio; sulfatos de alcoholes grasos etoxilados; sulfatos de alquifenoles etoxilados; lignosulfonatos; sulfonatos de petróleo; alquilarilsulfonatos tales como alquilbenceno- sulfonatos o alquil(inferior)naftaleno-sulfonatos, p. ej., butilnaftalenosulfonato; sales de productos condensados de naftaleno sulfonado-formaldehído; sales de productos condensados de fenol sulfonado-formaldehído; sulfonatos más complejos tales como amidosulfonatos, p. ej., el producto de condensación sulfonado de ácido oleico y N-metiltaurina; o los dialquilsulfosuccinatos, p. ej., el sulfonato de sodio o succinato de dioctilo. Los agentes no iónicos incluyen los productos de condensación de ésteres de ácidos grasos, alcoholes grasos, amidas de ácidos grasos o fenoles sustituidos con alquilo o alqueno graso con óxido de etileno, ésteres grasos de éteres de alcoholes polihidroxilados, p. ej., ésteres de ácidos grasos y sorbitán, productos de condensación de tales ésteres con óxido de etileno, p. ej. ésteres de ácidos grasos y polioxietilensorbitán, copolímeros de bloques de óxido de etileno y óxido de propileno, glicoles acetilénicos tales como 2, 4, 7, 9-tetraetil-5-decino-4,7-diol, o glicoles acetilénicos etoxilados. Los ejemplos de agentes tensioactivos catiónicos incluyen, por ejemplo, una mono-, di-, o poliamina alifática tal como un acetato, naftenato, u oleato; o una amina que contiene oxígeno tal como un óxido de amina de polioxietilenaquilamina; una amina unida a una amida preparada mediante condensación de un ácido carboxílico con una di- o poliamina; o una sal de amonio cuaternario.

Los ejemplos los materiales inertes incluyen, pero no están limitados a, minerales orgánicos tales como caolín, filosilicatos, carbonatos, sulfatos, fosfatos, o materiales botánicos tales como corcho, mazorcas de maíz pulverizadas, cáscaras de cacahuetes, cáscaras de arroz, y cáscaras de nuez.

Las composiciones de la presente invención pueden estar en una forma adecuada para la aplicación directa o en forma de producto concentrado de una composición primaria, que requiere dilución con una cantidad adecuada de agua u otro diluyente antes de la aplicación. La concentración de descontaminante variará dependiendo de la naturaleza de la formulación concreta, específicamente, de si es un producto concentrado o de si se va a utilizar directamente.

En una realización adicional, las composiciones, así como los polipéptidos de la presente invención se pueden tratar antes de la formulación para prolongar la actividad cuando se aplica al entorno de un patógeno de una planta con tal que el pretratamiento no sea nocivo para la actividad. Semejante tratamiento puede ser mediante métodos químicos y/o físicos con tal que el tratamiento no afecte adversamente a las propiedades de la composición o las composiciones. Los ejemplos de los reactivos químicos incluyen, pero no están limitados a, agentes halogenantes; aldehídos tales como formaldehído y glutaraldehído; antiinfectivos, tales como cloruro de zefiran; alcoholes, tales como isopropanol y etanol; y fijadores histológicos, tales como fijador de Bouin y fijador de Helly (véase, por ejemplo, Humason (1967) *Animal Tissue Techniques* (W.H. Freeman y Co.).

En una realización de la invención, las composiciones de la invención comprenden un microbio que tiene la secuencia de nucleótidos de un agente defensivo integrada establemente. Los microbios resultantes pueden ser tratados y utilizados como pulverización microbiana. Se puede utilizar cualquier microorganismo adecuado para este fin. Véase, por ejemplo, Gaertner *et al.* (1993) en *Advanced Engineered Pesticides*, Kim (Ed.). En una realización, se introducen las secuencias de nucleótidos de la invención en microorganismos que se multiplican sobre las plantas (epífitos) para liberar los agentes defensivos en cultivos diana potenciales. Los epífitos pueden ser, por ejemplo, bacterias gram-positivas o gram-negativas.

Se reconoce adicionalmente que se pueden tratar células completas, esto es, no sometidas a lisis, del microorganismo transformado con reactivos que prolongan la actividad del polipéptido producido en el microorganismo cuando el microorganismo se aplica al entorno de una planta diana. Se puede utilizar una secuencia señal de secreción combinada con el gen de interés de manera que la enzima resultante sea secretada fuera del microorganismo para su presentación a la planta diana.

De esta manera, se puede introducir un gen que codifica un agente defensivo de la invención por medio de un vector adecuado en un anfitrión microbiano, y dicho anfitrión transformado se puede aplicar al entorno, a las plantas, o a animales. Los anfitriones de microorganismos que se sabe que ocupan la "fitosfera" (filoplano, filosfera, rizosfera, y/o rizoplano) de uno o más cultivos de interés se pueden seleccionar para la transformación. Estos microorganismos se seleccionan con el fin de que sean capaces de competir con éxito en el entorno concreto con los microorganismos de tipo salvaje, para proporcionar un mantenimiento y una expresión estables del gen que expresa el polipéptido destoxicante, y para una mejor protección de las enzimas de la invención frente a la degradación y la inactivación medioambiental.

Tales microorganismos incluyen bacterias, algas, y hongos. Son de particular interés los microorganismos, tales como las bacterias, p. ej., *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Serratia*, *Klebsiella*, *Xanthomonas*, *Streptomyces*, *Rhizobium*,

Rhodopseudomonas, *Methylius*, *Agrobacterium*, *Acetobacter*, *Lactobacillus*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Leuconostoc*, y *Alcaligenes*; los hongos, concretamente las levaduras, p. ej., *Saccharomyces*, *Pichia*, *Cryptococcus*, *Kluyveromyces*, *Sporobolomyces*, *Rhodotorula*, *Aureobasidium*, y *Gliocladium*. Son de particular interés las especies bacterianas de la fitosfera tales como *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas fluorescens*, *Serratia marcescens*, *Acetobacter xylinum*,
 5 *Agrobacteria*, *Rhodopseudomonas spheroides*, *Xanthomonas campestris*, *Rhizobium melioli*, *Alcaligenes entrophus*, *Clavibacter xyli*, y *Azotobacter vinlandii*; y especies de levadura de la fitosfera tales como *Rhodotorula rubra*, *R. glutinis*, *R. marina*, *R. aurantiaca*, *Cryptococcus albidus*, *C. diffluens*, *C. laurentii*, *Saccharomyces rosei*, *S. pretoriensis*, *S. cerevisiae*, *Sporobolomyces rosues*, *S. odoris*, *Kluyveromyces veronae*, y *Aureobasidium pullulans*.

- 10 Los procariotas ilustrativos, tanto Gram negativos como positivos, incluyen *Enterobacteriaceae*, tales como *Escherichia*, *Erwinia*, *Shigella*, *Salmonella*, y *Proteus*; *Bacillaceae*; *Rhizobiaceae*, tales como *Rhizobium*; *Spirillaceae*, tales como fotobacterias, *Zymomonas*, *Serratia*, *Aeromonas*, *Vibrio*, *Desulfovibrio*, *Spirillum*; *Lactobacillaceae*; *Pseudomonadaceae*, tales como *Pseudomonas* y *Acetobacter*; *Azotobacteraceae*; y *Nitrobacteraceae*. Entre los eucariotas se encuentran los hongos, tales como *Phycomycetes* y *Ascomycetes*, que incluyen levaduras, tales como *Saccharomyces*
 15 y *Schizosaccharomyces*; y las levaduras de *Basidiomycetes*, tales como *Rhodotorula*, *Aureobasidium*, *Sporobolomyces*, y similares.

- En una realización de la invención, se pueden utilizar los agentes defensivos de la invención como compuesto farmacéutico para el tratamiento de patógenos fúngicos y microbianos en humanos y otros animales. Las enfermedades y trastornos causados por los patógenos fúngicos y microbianos incluyen, pero no están limitados a, meningoencefalitis fúngica, infecciones fúngicas superficiales, tiña, pie de atleta, histoplasmosis, candidiasis, algodoncillo, coccidioidoma, criptococosis pulmonar, tricosporonosis, piedra, tinea nigra, queratitis fúngica, onicomicosis, tinea capitis, cromomicosis, aspergilosis, aspergilosis pulmonar endobronquial, mucormicosis, cromoblastomicosis, dermatofitosis, tinea, fusariosis, pitiriasis, micetoma, pseudallesquerasis, y esporotricosis.

- 25 Las composiciones de la invención se pueden utilizar como compuestos farmacéuticos para proporcionar tratamiento para las enfermedades y trastornos asociados con, pero no limitados a, los siguientes patógenos fúngicos: *Histoplasma capsulatum*, *Candida spp.* (*C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. glabrata*/*Torulopsis glabrata*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*), *Aspergillus fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*, *Rhizopus spp.*, *Rhizomucor spp.*, *Cunninghamella spp.*, *Apophysomyces spp.*, *Saksenaeae spp.*, *Mucor spp.*, y *Absidia spp.* La eficacia de las composiciones de la invención como tratamientos antifúngicos puede ser determinada por medio de análisis antifúngicos conocidos por los expertos en la técnica.

- Los agentes defensivos se pueden administrar a un paciente a través de numerosos medios. La administración sistémica también puede ser mediante medios transmucosales o transdérmicos. Para la administración transmucosal o transdérmica, se utilizan en la formulación penetrantes apropiados para la barrera que se va a penetrar. Tales penetrantes son generalmente conocidos en la técnica, e incluyen, por ejemplo, para la administración transmucosal, detergentes, sales biliares, y derivados de ácido fusídico. La administración transmucosal se puede lograr por medio del uso de pulverizaciones nasales o supositorios. Para la administración transdérmica, los compuestos activos se formulan en pomadas, ungüentos, geles, o cremas como es sabido generalmente en la técnica. Los compuestos también
 40 se pueden preparar en forma de supositorios (p. ej., con bases para supositorios convencionales tales como manteca de cacao y otros glicéridos) o enemas de retención para la liberación rectal.

- En una realización, los compuestos activos se preparan con portadores que protegerán el compuesto frente a la rápida eliminación del organismo, por ejemplo en forma de una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes y sistemas de liberación microencapsulados. Se pueden utilizar polímeros biodegradables, biocompatibles, tales como acetato de etilvinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, y poli(ácido láctico). Los métodos para la preparación de tales formulaciones serán evidentes para los expertos en la técnica. Los materiales también se pueden obtener comercialmente de Alza Corporation and Nova Pharmaceuticals, Inc. Las suspensiones liposomales (incluyendo los liposomas dirigidos a células infectadas con anticuerpos monoclonales para antígenos virales) también pueden ser utilizadas como portadores farmacéuticamente aceptables. Estas se pueden preparar de acuerdo con los métodos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, como se describe en la Patente de los Estados Unidos Núm. 4.522.811.

- 55 Resulta especialmente ventajoso formular composiciones orales o parenterales en una forma de dosificación unitaria para facilitar la administración y la uniformidad de la dosificación. La forma de dosificación unitaria utilizada en la presente memoria hace referencia a unidades físicamente discretas ajustadas como formas de dosificación unitarias para el sujeto que se va a tratar conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado asociado con el portador farmacéutico requerido. Dependiendo del tipo y de la gravedad de la enfermedad, una dosificación candidato inicial para su administración al paciente es de aproximadamente 1 $\mu\text{g/kg}$ a aproximadamente 15 mg/kg (p. ej., 0,1 a 20 mg/kg) de anticuerpo, ya sea, por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas, ya sea mediante infusión continua. Una dosificación diaria típica podría oscilar entre aproximadamente 1 $\mu\text{g/kg}$ y aproximadamente 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados antes. Para las administraciones repetidas a lo largo de varios días o más, dependiendo de la condición, el tratamiento se mantiene hasta que se produce la deseada supresión de los síntomas de la enfermedad. Sin embargo, pueden resultar útiles otros regímenes de dosificación. El progreso de esta terapia es fácilmente controlado mediante mecanismos y análisis convencionales. Un régimen de dosificación ilustrativo se describe en la publicación WO 94/04188. La especificación de las formas unitarias de dosificación de la invención está dictada y depende directamente de las
 65

características únicas del compuesto activo y del efecto terapéutico concreto a obtener, y de las limitaciones inherentes de la técnica de la composición de semejante compuesto activo para el tratamiento de los individuos.

“Tratamiento” se define en la presente memoria como la aplicación o administración de un agente terapéutico a un paciente, o la aplicación o administración de un agente terapéutico a un tejido aislado o línea celular de un paciente, que tiene una enfermedad, un síntoma de enfermedad o una predisposición a una enfermedad, con el propósito de curar, sanar, aliviar, mitigar, alterar, remediar, mejorar, reformar o afectar a la enfermedad, los síntomas de la enfermedad o la predisposición hacia la enfermedad. Un “agente terapéutico” incluye, pero no está limitado a, moléculas pequeñas, péptidos, anticuerpos, ribozimas y oligonucleótidos antisentido.

Los agentes defensivos de la invención se pueden utilizar para cualquier aplicación incluyendo el recubrimiento de superficies frente los microbios diana. De esta manera, los microbios diana incluyen patógenos humanos o microorganismos. Las superficies que podrían ser recubiertas con los agentes defensivos de la invención incluyen alfombras e instalaciones médicas estériles. Se pueden utilizar polipéptidos unidos a polímeros de la invención para recubrir superficies. Los métodos para incorporar las composiciones con propiedades antimicrobianas a los polímeros son conocidos en la técnica. Véase la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.847.047.

Se puede utilizar un polipéptido aislado de la invención como inmunógeno para generar anticuerpos que se unen a agentes defensivos utilizando mecanismos normalizados para la preparación de anticuerpos policlonales y monoclonales. Se pueden utilizar los agentes defensivos completos o, alternativamente, la invención proporciona fragmentos peptídicos antigénicos de los agentes defensivos para su uso como inmunógenos. El péptido antigénico de un agente defensivo comprende al menos 8, preferiblemente 10, 15, 20, o 30 restos aminoácido de la secuencia de aminoácidos mostrada en el SEQ ID NO: 101 y abarca un epítipo de un agente defensivo de manera que un anticuerpo originado contra el péptido forma un complejo inmunitario específico con los polipéptidos antimicrobianos. Los epítipos preferidos abarcados por el péptido antigénico son las regiones de los agentes defensivos que están localizadas sobre la superficie de la proteína, p. ej., regiones hidrófilas.

Por consiguiente, otro aspecto de la invención hace referencia a anticuerpos policlonales y monoclonales anti-agente defensivo que se unen a un agente defensivo. Los anticuerpos policlonales de tipo agente defensivo se pueden preparar inmunizando un sujeto adecuado (p. ej., conejo, cabra, ratón, u otro mamífero) con un inmunógeno de tipo agente defensivo. El título de anticuerpos anti-agente defensivo en el sujeto inmunizado puede ser controlado a lo largo del tiempo mediante mecanismos normalizados, por ejemplo con un análisis de inmunoabsorción con enzima ligada (ELISA) utilizando polipéptidos antimicrobianos inmovilizados. En un momento apropiado después de la inmunización, p. ej., cuando los títulos de anticuerpo anti-agente defensivo son los más altos, se pueden obtener células productoras de anticuerpos a partir del sujeto y utilizarlas para preparar anticuerpos monoclonales mediante mecanismos normalizados, tales como la técnica del hibridoma descrita originalmente por Kohler y Milstein (1975) *Nature* 256:495-497, la técnica del hibridoma de las células B humanas (Kozbor *et al.* (1983) *Immunol. Today* 4:72), la técnica del hibridoma de EBV (Cole *et al.* (1985) en *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, ed. Reisfeld and Sell (Alan R. Liss, Inc., Nueva York, NY), págs. 77-96) o las técnicas de los triomas. La tecnología para producir hibridomas es bien conocida (véase generalmente Coligan *et al.*, eds. (1994) *Current Protocols in Immunology* (John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, NY); Galfre *et al.* (1977) *Nature* 266:55052; Kenneth (1980) en *Monoclonal Antibodies: A New Dimension In Biological Analyses* (Plenum Publishing Corp., NY; y Lemer (1981) *Yale J. Biol. Med.*, 54:387-402).

Alternativamente para preparar hibridomas que secretan anticuerpo monoclonal, se puede identificar un anticuerpo monoclonal de tipo anti-agente defensivo y aislarlo mediante escrutinio de una genoteca de inmunoglobulina combinatoria recombinante (p. ej., una genoteca de anticuerpos de presentación en fagos) con un agente defensivo para aislar de ese modo los miembros de la genoteca de inmunoglobulina que se unen al agente defensivo. Los kits para generar y escrutar las genotecas de presentación en fagos se encuentran disponibles en el mercado (p. ej., el *Pharmacia Recombinant Phage Antibody System*, Núm. de Catálogo. 27-9400-01; y el *Stratagene SurfZAP™ Phage Display Kit*, Núm. de Catálogo 240612). Adicionalmente, se pueden encontrar ejemplos de los métodos y reactivos particularmente susceptibles de uso en la generación y escrutinio de las genotecas de presentación en fagos, por ejemplo, en la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.223.409; en las Publicaciones PCT Núms. WO 92/18619; WO 91/17271; WO 92/20791; WO 92/15679; 93/01288; WO 92/01047; 92/09690; y 90/02809; Fuchs *et al.* (1991) *Bio/Technology* 9:1370-1372; Hay *et al.* (1992) *Hum. Antibod. Hybridomas* 3:81-85; Huse *et al.* (1989) *Science* 246:1275-1281; Griffiths *et al.* (1993) *EMBO J.* 12:725-734. Los anticuerpos pueden ser utilizados para identificar homólogos de los agentes defensivos de la invención.

Los siguientes ejemplos se ofrecen a modo de ilustración y no a modo de limitación.

Experimentación

Ejemplo 1

Bioanálisis de la Actividad Fungicida de Polipéptidos de Hemolinfa de *Manduca sexta*

Tras la resolución mediante cromatografía de líquidos (LC), se sometieron a análisis las fracciones que contenían polipéptido de *M. sexta* inducidos por patógenos en cuando a su actividad fungicida frente a los patógenos vegetales *M. grisea*, *R. solani*, y *F. verticilloides*. Las fracciones de la LC se liofilizaron primero en placas de microtitulación de 96 pocillos. Se añadió una suspensión de 100 µl de *M. grisea* (u otro de los patógenos mencionados), a la concentración

ES 2 300 440 T3

de análisis de crecimiento fúngico normalizada (2.500 esporas/ml), a los pocillos de la placa de microtitulación que contenían el polipéptido, y las placas se sellaron con Borden® Sealwrap®. Después se colocaron las placas a 28°C en una cámara oscura durante 24 horas. Se controló el crecimiento hifal utilizando un microscopio de disección. Se consideró que los polipéptidos contenidos en los pocillos que carecían de crecimiento hifal, o los que mostraban un crecimiento hifal reducido en comparación con los pocillos de control, poseían actividad fungicida. El crecimiento hifal se puntuó de nuevo, 48 horas después de la inoculación, para una determinación final de la actividad fungicida.

Ejemplo 2

Inducción de la Respuesta Antimicrobiana en *Manduca sexta*

Se inyectaron intersegmentalmente 20 µl de una suspensión muy concentrada de hifas y esporas de *M. grisea* raspadas de una colonia de una placa de agar a larvas de *M. sexta* en el quinto instar. Después se colocaron las larvas sobre una dieta fresca y se dejó que se recuperaran. Después de 24, 48, y 72 horas, se recogió la hemolinfa de las larvas pinchando una falsa pata utilizando tijeras quirúrgicas finas sobre una lámina de parafilm®. De esta manera se puede recoger aproximadamente 1 ml/insecto. La hemolinfa se transfirió a un matraz cónico de 50 ml y se colocó sobre hielo mientras las larvas restantes eran tratadas. Una vez que todas las larvas hubieron sido tratadas, se añadió feniltiourea a una concentración final 20 mM. También se añadió aprotinina a la muestra (concentración final 20 µg/ml). Las muestras se centrifugaron (3.000 rpm) durante 5 minutos para sedimentar las células. El sobrenadante restante (hemolinfa) se sometió a extracción en fase sólida utilizando columnas de extracción en fase sólida Supelco Discovery® DSC-18. Las columnas se acondicionaron previamente utilizando metanol del 100%, se equilibraron utilizando Disolvente A al 100% (acetonitrilo al 5%, TFA al 0,1%; 1 volumen de la columna) antes de cargar la muestra. Después de filtrar la hemolinfa (sobrenadante) a través de ella, la columna se lavó con Disolvente A antes de eluir con un volumen de la columna de 60% de Disolvente B/40% de Disolvente A (Disolvente B: acetonitrilo al 95%, TFA al 0,1%). El eluyente recogido se congela a -80°C y se liofiliza hasta sequedad. Las muestras de hemolinfa se resuspenden en un pequeño volumen de agua (normalmente 200-500 µL) y se realiza un análisis BCA para determinar la concentración de proteína. Tras la etapa de fraccionamiento en fase sólida, se fraccionan las muestras de hemolinfa mediante HPLC y se someten a ensayo mediante un bioanálisis.

La inducción de *M. sexta* con *B. bassiana* y *R. solani* se realizó de un modo similar.

Se construyeron, de acuerdo con los protocolos normalizados, genotecas de ADNc de *M. sexta* inducidas por el patógeno correspondiente (*M. grisea*; *B. bassiana*; *R. solani*). Brevemente, se aisló el ARN total de los cuerpos grasos de *M. sexta* inducido por patógenos. Se aislaron los ARNm utilizando un kit de purificación de ARNm (BRL) de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes. Las genotecas de ADNc se construyeron utilizando el kit de síntesis de ZAP-cDNA y el fagémido pBluescript (Stratagene).

Ejemplo 3

Fraccionamiento mediante HPLC de Polipéptidos de Hemolinfa de *Manduca sexta* inducida por *Magnaportha grisea*

Se fraccionó hemolinfa de larvas de *M. sexta* inducida por *M. grisea* (véase el Ejemplo 2) sobre HPLC HP-1100, utilizando una columna Vydack C4 (4,6-250 mm) (Figura 3). Se utilizó un sistema de gradientes para hacer eluir las proteínas unidas. Las condiciones del gradiente se indican más abajo. Se recogieron las fracciones a intervalos de 1 minuto en una placa de microtitulación de 96 pocillos y se analizaron en cuanto a la actividad fungicida frente a *M. grisea* (véase el Ejemplo 1).

Este protocolo también se siguió para el fraccionamiento de polipéptidos de hemolinfa de *M. sexta* inducida por *B. bassiana* y *R. solani*. El bioanálisis de la actividad fungicida (Ejemplo 1) también se llevó a cabo utilizando los patógenos vegetales *R. solani* y *F. verticilloides*.

Condiciones del Gradiente

Disolvente

Disolvente A: Acetonitrilo al 5%, TFA al 0,1%

Disolvente B: Acetonitrilo al 95%, TFA al 0,1%

Velocidad de flujo

0,6 ml/min

Gradiente

0-60% B a lo largo de 70 minutos

ES 2 300 440 T3

Ejemplo 4

Purificación con Microbore del Polipéptido Fungicida, Mag1

Después del fraccionamiento mediante HPLC, se separaron adicionalmente aquellas fracciones del Ejemplo 3 que poseen actividad fungicida (fracciones 47-52 min) por medio de Microbore-LC (Michrome Bioresources) utilizando una columna Vydack C4 (1-150 mm). Las condiciones del gradiente se indican más abajo. El eluyente de la columna se recogió de la mejor manera para la resolución de los picos con el contenido de polipéptido más alto (Figura 4): Los polipéptidos eluidos se analizaron en cuanto a la actividad fungicida frente a *M. grisea* (Véase el Ejemplo 1). La fracción de polipéptido que contenía la mayor actividad fungicida se indica con una flecha.

Condiciones del Gradiente

Disolventes

Disolvente A: Acetonitrilo al 5%, TFA al 0,1%

Disolvente B: Acetonitrilo al 95%, TFA al 0,1%

Velocidad de flujo

50 µl/min

Gradiente

5-65% disolvente B en 70 minutos

La fracción de polipéptido que contenía la mayor actividad fungicida (indicada con una flecha en la Figura 4 se resolvió adicionalmente utilizando Microbore-LC (Michrome Bioresources) sobre una columna Vydack C18 (1-150 mm) (Figura 5). Siguen las condiciones del gradiente. De nuevo las fracciones que contenían el polipéptido se analizaron en cuanto a la actividad fungicida contra *M. grisea* (Véase el Ejemplo 1). (El polipéptido purificado resultante se denominó Mag1.)

Condiciones del Gradiente

Disolventes

Disolvente A: Acetonitrilo al 5%, HFBA al 0,1%

Disolvente B: Acetonitrilo al 95%, HFBA al 0,1%

Velocidad de flujo

50 µl/min

Gradiente

5-65% disolvente B en 70 minutos

Este protocolo también se siguió para la purificación con Microbore de los polipéptidos fungicidas identificados en hemolinfa de *M. sexta* inducida por *B. bassiana* y *R. solani*. El bioanálisis para la actividad fungicida (Ejemplo 1) también se realizó utilizando los patógenos vegetales *R. solani* y *F. verticilloides*.

Ejemplo 5

Determinación del Peso Molecular de Mag1

El peso molecular del polipéptido Mag1 aislado a partir del Ejemplo 4 se determinó utilizando Cromatografía de Líquidos-Espectrofotometría de Masas (LC-MS). La masa molecular de Mag1 se determinó utilizando la espectrometría de masas por electropulverización sobre un espectrómetro de masas Micromass Platform LCZ (Micromass, Manchester, UK). Un Microbore LC (Michrom bioresources, Auburn CA) liberó la proteína y la fase móvil (acetonitrilo/agua) utilizando una columna de fase reversa. Se obtuvieron los espectros en el modo ión positivo utilizando un voltaje

ES 2 300 440 T3

capilar de 3,5 kV, un voltaje de cono de 45 V, y una temperatura de la fuente de 90°C. Los espectros se barrieron a lo largo de un intervalo de 600-3.000 a una velocidad de 3,5 s/barrido. Se determinaron las masas moleculares utilizando el algoritmo de desconvolución de máxima entropía (MaxEnt) para transformar el intervalo m/z 600-3.000 para dar un verdadero espectro de la escala de masas. El calibrado de la masa se realizó utilizando mioglobina de corazón de caballo.

Se realizó un protocolo similar para los otros polipéptidos de la invención.

Ejemplo 6

Digestión con Endoproteinasa Lys-C de Mag1

Se reconstituyó la endoproteinasa Lys-C liofilizada de calidad de secuenciación (Boehringer Mannheim) en 50 µl de agua redestilada dando como resultado una concentración de tampón de Tricina 50 mM pH 8,0, EDTA 10 mM, y 0,5 mg/ml de rafinosa. El polipéptido Mag1 del Ejemplo 4 se disolvió en tampón de digestión (Tris HCl 25 mM pH 8,5, EDTA 1 nM) hasta una razón 1:50 de Lys-C con respecto a polipéptido Mag1 en peso. Se dejó que la reacción continuara durante 20 horas a 37°C. El polipéptido digerido se fraccionó utilizando una columna C4 sobre Microbore-HPLC con un gradiente de acetonitrilo al 5-65% en TFA al 0,1% a lo largo de 70 minutos a una velocidad de flujo de 50 µl/min (Figura 6). Se recogieron cuatro fragmentos aislados y se sometieron a análisis de la secuencia N-terminal.

Se siguió un protocolo similar para la digestión de los otros polipéptidos fungicidas de la invención.

Ejemplo 7

Determinación de la Secuencia de Aminoácidos N-Terminal de los Fragmentos Polipeptídicos de Mag1

Se secuenciaron los extremos N de los fragmentos Mag1 aislados del Ejemplo 6 en un ABI Procise® 494 Protein Sequencer, que consistía en una estación de trabajo química, un sistema de análisis PTH, un control por ordenador y un soporte lógico para el reclamo de secuencias automatizado. Se utilizaron los protocolos normalizados para hacer funcionar el sistema y determinar las secuencias (véase la Figura 7).

Las secuencias de aminoácidos N-terminales de los fragmentos aislados de los otros polipéptidos de la invención se determinaron de un modo similar.

La secuencia peptídica N-terminal es crítica en la determinación del sitio de procesamiento exacto o preciso para la conversión del pro-peptido en la forma madura y activa de la proteína (como en este ejemplo, Mag1). Esto es importante en particular para las proteínas secretoras.

Se dedujo la secuencia peptídica C-terminal a partir del peso molecular generado por LC-MS de la proteína activa y del peso molecular pronosticado del mismo polipéptido codificado basándose en la secuencia de ADNc identificada (en el Ejemplo 8).

Conociendo los extremos precisos de la proteína madura, se pueden diseñar y construir moléculas de ADN que codifican la proteína madura activa completa para su expresión en plantas. Cuando es necesario, se pueden adaptar elementos de control y secuencias de redireccionamiento específicos de las plantas adicionales e incorporar en el diseño del gen con el fin de potenciar y dirigir la expresión del polipéptido maduro en plantas.

Para asegurar la especificidad y funcionalidad originales, p. ej., de la proteína Mag1 retenida en la planta, es esencial la expresión de la forma madura activa de la proteína en la planta.

Ejemplo 8

Aislamiento del Clon de ADNc que Codifica Mag1

Se cosecharon los cuerpos grasos directamente en nitrógeno líquido antes del procesamiento. El ARN total de los cuerpos grasos de *Manduca sexta* sensibilizada se preparó pulverizando el tejido con un mortero y una mano de mortero en nitrógeno líquido y lisando las células en presencia de TRIzol (Life Technologies) de acuerdo con el protocolo del fabricante. El ARN poli A(+) se purificó por afinidad con oligo(dT)-celulosa a partir del ARN total utilizando el mRNA Purification Kit (Amersham Pharmacia Biotech) siguiendo el protocolo del fabricante en preparación para la construcción de la genoteca de ADNc. Se realizaron la síntesis de la primera hebra de ADNc utilizando Superscript II (Life Technologies) y la subsiguiente síntesis de la segunda hebra, la adición del ligador, y la clonación direccional en los sitios de restricción de pBlueScript SK+ (Stratagene) de acuerdo con las instrucciones proporcionadas con el kit Stratagene cDNA (Stratagene). El ADNc se purificó utilizando una columna de ADNc (Life Technologies) inmediatamente antes de la ligación en el vector.

La secuenciación de los clones de la genoteca de ADNc se realizó utilizando el kit ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready kit con FS AmpliTaq DNA Polymerase (Perkin Elmer) y se analizaron en un ABI Model 373 Automated DNA Sequencer. La secuencia del gen Mag1 se identificó mediante secuenciación de aproximadamente 2.000 clones de la genoteca de ADNc preparada a partir del ARNm derivado de los cuerpos grasos de *M. sexta* sensibilizada. Se utilizaron las secuencias de aminoácidos derivadas de los extremos amino del péptido completo o los productos de la escisión proteolítica para comparar con la correspondiente genoteca de secuencias del clon de ADNc traducida en los seis marcos posibles. Las secuencias que contenían una identidad de 100% con las secuencias de aminoácidos N-terminales fueron completamente traducidas y sus PM se compararon con los PM de la proteína Mag1 purificada. Las secuencias con PM comparables se identificaron por codificar probablemente Mag1.

Ejemplo 9

Aislamiento del Clon de ADNc que Codifica un Polipéptido de Interés

Las etiquetas de la secuencia de aminoácidos N-terminal de un polipéptido de interés se utilizan para identificar clones de ADNc que codifican el polipéptido. Los oligonucleótidos degenerados que codifican las etiquetas de la secuencia de aminoácidos del polipéptido se utilizan como sondas para detectar los ADNc que codifican el polipéptido en una genoteca de ADNc de *M. sexta* inducida por patógenos (véase el Ejemplo 2). De esta manera se aísla y se secuencia un ADNc completo que codifica el polipéptido de interés. La secuenciación completa del clon de ADNc identificado se realiza para confirmar que codifica el polipéptido purificado. La confirmación es proporcionada por el peso molecular pronosticado del polipéptido codificado por el ADNc que es el mismo que el peso molecular del polipéptido generado mediante LC-MS.

Ejemplo 10

Construcción de Baculovirus Recombinante que Expresa Polipéptidos Fungicidas

Las secuencias de nucleótidos que codifican los polipéptidos de la invención se pueden introducir en el propio genoma del baculovirus. Para este propósito se pueden colocar las secuencias de nucleótidos bajo el control del promotor de la polihedrina, el promotor IE1, o cualquier otro de los promotores de baculovirus. El ADNc, junto con las secuencias líder apropiadas se inserta después en un vector de transferencia de baculovirus utilizando mecanismos de clonación molecular normalizados. Después de la transformación de *E. coli* DH5 α , se seleccionan las colonias aisladas y se prepara el ADN plasmídico y se analiza mediante análisis con enzimas de restricción. Las colonias que contienen el fragmento apropiado se aíslan, se propagan, y se prepara el ADN plasmídico para la co-transfección.

Ejemplo 11

Expresión de Polipéptidos Fungicidas en Células de Insecto

Los polipéptidos de la invención pueden ser expresados en células de insecto. Para este fin se propagan células de *Spodoptera frugiperda* (Sf-9 o Sf-21) en medio ExCell[®] 401 (JRH Biosciences, Lenexa, KS), o un medio similar, con un suplemento de suero bovino fetal al 3,0%. Se añade Lipofectin[®] (50 μ L a 0,1 mg/mL, Gibco/BRL) a una alícuota de 50 μ L del vector de transferencia que contiene las secuencias de nucleótidos antimicrobianas (500 ng) y AcNPV negativo para la polihedrina linealizado (2,5 μ g, ADN viral Baculogold[®], Pharmigen, San Diego, CA). Se co-transfectan células Sf-9 (monocapa de aproximadamente 50%) con la solución de ADN viral/vector de transfección. El fluido sobrenadante del experimento de co-transfección se recoge a los 5 días de la transfección y los virus recombinantes se aíslan empleando protocolos de purificación en placa normalizados, en los que solamente se seleccionan las placas positivas para la polihedrina (O'Reilly *et al.* (1992), *Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual*, W. H. Freeman and Company, Nueva York). A las células Sf-9 en placas de Petri de 35 mm (monocapa 50%) se les inoculan 100 μ L de una dilución seriada de la suspensión viral, y se recogen los fluidos sobrenadantes a los 5 días de la infección.

Con el fin de preparar cantidades más grandes de virus para su caracterización, se utilizan estos fluidos sobrenadantes para inocular cultivos de tejidos más grandes para la propagación a gran escala de los virus recombinantes. La expresión del polipéptido fungicida codificado por el baculovirus recombinante se puede confirmar utilizando un bioanálisis (tal como el que se describe en el Ejemplo 4), LC-MS, o anticuerpos.

Ejemplo 12

*Expresión de Péptidos Fungicidas en *Pichia**

Se pueden expresar las secuencias de nucleótidos que codifican los polipéptidos de la invención en *Pichia* bajo el control de un promotor constitutivo o inducible y se pueden dirigir para que permanezcan intracelulares o sean secretados al medio. Las secuencias de nucleótidos se clonan en un vector de expresión de *Pichia* utilizando mecanismos moleculares normalizados. La transformación de las cepas de *Pichia* (p. ej. X-33, GS115, SMD1168, KM71 etc-Invitrogen, Carlsbad, CA) implica la linealización del constructo y la introducción del ADN en células de *Pichia* competentes para la transformación mediante métodos químicos o mediante electroporación de acuerdo con los protocolos normalizados. Los transformantes se seleccionan por resistencia a la Zeocina o la blasticidina o por su capacidad

para crecer en medio carente de histidina. Los ensayos de expresión a pequeña escala se realizan sobre transformantes seleccionados para identificar los expresantes avanzados de los polipéptidos de la invención para un aumento a escala adicional. En un sistema inducible, por ejemplo cuando el péptido está bajo el control del promotor AOX1, los transformantes se hacen crecer en medio con glicerol como fuente de carbono y se inducen mediante crecimiento en medio que contiene metanol en lugar de glicerol. La inducción continua a lo largo de un período de 24-120 horas se logra mediante la adición de metanol (conc. final 0,5%) cada 24 horas. La expresión funcional del polipéptido se confirma mediante análisis LC-MS/purificación y bioanálisis.

Ejemplo 13

Expresión de Polipéptidos Fungicidas en Bacterias

Las secuencias de nucleótidos que codifican los polipéptidos de la invención se pueden expresar en bacterias y los polipéptidos se pueden dirigir para su expresión intracelular o extracelular. Los ADNc pueden ser clonados en un vector de expresión bacteriano adecuado (p. ej. vectores pET (Novagen, Madison, WI) bajo el control de un promotor constitutivo o inducible utilizando mecanismos de clonación molecular normalizados. El plásmido que contiene el gen de interés se introduce en células bacterianas competentes para la transformación utilizando protocolos normalizados para la transformación química o electroporación y los transformantes se seleccionan utilizando la resistencia a antibióticos. Además de las cepas de *E. coli* tradicionales utilizadas comúnmente para la transformación, se pueden utilizar cepas mutantes tales como Origami® (Novagen) que permite la formación de enlaces disulfuro, especialmente con péptidos ricos en cisteína para expresar los péptidos funcionales. Se pueden utilizar sistemas inducibles tales como las cepas de *E. coli* que portan el gen de la ARN polimerasa de T7 (lisogen lambda-DE3) en los cuales se induce la expresión del gen de interés bajo el promotor de T7 mediante la adición de IPTG durante períodos de tiempo variables. La expresión y la actividad de los polipéptidos se confirman mediante LC-MS y bioanálisis.

Ejemplo 14

Transformación de Callo Embriogénico de Arroz mediante Bombardeo y Regeneración de Plantas Transgénicas

Los cultivos de callo embriogénico derivado del escutelo de semillas en germinación sirven como material de origen para los experimentos de transformación. Este material se genera germinando semillas de arroz estériles sobre un medio de iniciación con callo (sales MS, vitaminas Nitsch y Nitsch, 1,0 mg/l de 2,4-D y AgNO₃ 10 µM) en la oscuridad a 27-28°C. El callo embriogénico que prolifera a partir del escutelo de los embriones se transfiere después a medio CM (sales N6, vitaminas Nitsch y Nitsch, 1 mg/l de 2,4-D, Chu *et al.*, 1985, *Sci. Sinica* 18:659-668). Los cultivos de callo se mantienen sobre CM por medio de un subcultivo de rutina a intervalos de dos semanas y se utiliza para la transformación a las 10 semanas del inicio.

El callo se prepara para la transformación subcultivando piezas de 0,5-1,0 mm separadas aproximadamente 1 mm, dispuestas en una zona circular de aproximadamente 4 cm de diámetro, en el centro de un círculo de papel Whatman núm. 541 colocado sobre medio CM. Las placas con callo se incuban en la oscuridad a 27-28°C durante 3-5 días. Antes del bombardeo, los filtros con callo se transfieren a CM con un suplemento de manitol 0,25 M y sorbitol 0,25 M durante 3 horas en la oscuridad. Las tapas de las placas de Petri se dejan después entreabiertas durante 20-45 minutos en una capucha estéril para permitir que la humedad del tejido se disipe.

El ADN plasmídico circular de dos plásmidos diferentes, uno que contiene el marcador seleccionable para la transformación de arroz y uno que contiene el nucleótido de la invención, se precipitan simultáneamente sobre la superficie de partículas de oro. Para completar esto, se añaden un total de 10 µg de ADN a una razón de 2:1 de rasgo:ADN marcadores seleccionables a una alícuota de 50 µl de partículas de oro resuspendidas a una concentración de 60 mg/ml. Después se añaden cloruro de calcio (50 µl de una solución 2,5 M) y espermidina (20 µl de una solución 0,1 M) a la suspensión de oro-ADN a medida que el tubo está siendo sometido a vórtice durante 3 minutos. Las partículas de oro se centrifugan en una microcentrífuga durante 1 seg y el sobrenadante se separa. Las partículas de oro se lavan después dos veces con 1 ml de etanol absoluto y después se resuspenden en 50 µl de etanol absoluto y se someten a sonicación (sonicador de baño) durante 1 segundo para dispersar las partículas de oro. La suspensión de oro se incuba a -70°C durante cinco minutos y se somete a sonicación (sonicador de baño) si se necesita dispersar las partículas. Seis microlitros de partículas de oro recubiertas con ADN se cargan después sobre discos macroportadores Mylar y se deja que el etanol se evapore.

Al final del período de secado, se coloca una placa de Petri que contiene el tejido en la cámara del PDS-1000/He. El aire de la cámara se evacúa después a un vacío de 0,94-0,97 atm. El macroportador se acelera con una onda de choque de helio utilizando una membrana de ruptura que estalla cuando la presión de He en el tubo de choque alcanza 73,49-74,85 atm. El tejido se coloca aproximadamente a 8 cm de la pantalla de detención y el callo se bombardea dos veces. Se bombardean de cinco a siete placas de esta manera con las partículas de oro recubiertas de ADN. Después del bombardeo, el tejido del callo se transfiere a medio CM sin suplemento de sorbitol o manitol.

A los 3-5 días del bombardeo el tejido de callo se transfiere a medio SM (medio CM que contiene 50 mg/l de higromicina). Para completar esto, se transfiere el tejido de callo de las placas a tubos cónicos de 50 ml estériles y se pesa. Se añade agar blando fundido a 40°C utilizando 2,5 ml de agar blando/100 mg de callo. Los grumos de callo se rompen en fragmentos de menos de 2 mm de diámetro dispensándolos repetidamente a través de una pipeta de 10

ES 2 300 440 T3

ml. Se cultivan en placa alícuotas de tres mililitros de la suspensión de callo sobre medio SM fresco y las placas se incuban en la oscuridad durante 4 semanas a 27-28°C. Después de 4 semanas, se identifican los eventos transgénicos en callos, se transfieren a placas SM frescas y se hacen crecer durante 2 semanas más en la oscuridad a 27-28°C.

- 5 El callo en crecimiento se transfiere a medio RM1 (sales MS, vitaminas Nitsch y Nitsch, sacarosa al 2%, sorbitol al 3%, gelrite al 0,4% + 50 ppm de higromicina B) durante 2 semanas en la oscuridad a 25°C. Después de 2 semanas el callo se transfiere a medio RM2 (sales MS, vitaminas Nitsch y Nitsch, sacarosa al 3%, gelrite al 0,4% + 50 ppm higromicina B) y se cultiva en placa bajo luz blanca ($\sim 40 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$) con un fotoperíodo de 12 horas a 25°C y 30-40% de humedad. Después de 2-4 semanas a la luz, el callo generalmente comienza a organizarse, y forma brotes.
- 10 Los brotes se separan del callo/medio circundante y se transfieren cuidadosamente a medio RM3 (1/2 x sales MS, vitaminas Nitsch y Nitsch, sacarosa al 1% + 50 ppm de higromicina B) en Phytatrays (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) y la incubación continúa utilizando las mismas condiciones descritas en la etapa anterior.

- 15 Las plantas se transfieren de RM3 a tiestos de 10,16 cm que contienen mezcla Metro 350 después de 2-3 semanas, cuando se ha producido un crecimiento suficiente de raíces y brotes. Las plantas se hacen crecer utilizando un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas/12 horas empleando un régimen de temperatura de día/noche de $\sim 30/18^\circ\text{C}$.

Ejemplo 15

20 *Transformación de Maíz mediante Bombardeo con Partículas y Regeneración de Plantas Transgénicas*

- Se bombardean embriones de maíz inmaduros de plantas donadoras de invernadero con un plásmido que contiene una secuencia de nucleótidos de la invención unida operablemente a un promotor de ubiquitina y el gen marcador seleccionable PAT (Wohlleben *et al.* (1988) *Gene* 70:25-37), que confiere resistencia al herbicida Bialaphos. Alternativamente, se proporciona el gen del marcador seleccionable en un plásmido separado. La transformación se realiza como sigue. Más abajo se dan las recetas de los medios.
- 25

Preparación de Tejido Diana

- 30 Las espigas se descascaran y la superficie se esteriliza en blanqueador Clorox al 30% más detergente Micro al 0,5% durante 20 minutos, y se enjuagan dos veces con agua estéril. Los embriones inmaduros se extirpan y se colocan con el eje del embrión hacia abajo (escutelo hacia arriba), 25 embriones por placa, sobre medio 560Y durante 4 horas y después se alinean en una zona diana de 2,5 cm para prepararlos para el bombardeo.

35 *Preparación del ADN*

- Se elabora un vector plasmídico que comprende la secuencia de nucleótidos de la invención unida operablemente a un promotor de ubiquitina. Este ADN plasmídico más el ADN plasmídico que contiene un marcador seleccionable PAT se hace precipitar sobre bolitas de tungsteno de $1,1 \mu\text{m}$ (diámetro medio) utilizando el procedimiento de precipitación con CaCl_2 como sigue:
- 40

100 μl de partículas de tungsteno preparadas en agua

10 μl (1 μg) de ADN en tampón Tris EDTA (1 μg ADN total)

45

100 μl de CaCl_2 2,5 M

10 μl de espermidina 0,1 M

- 50 Cada reactivo se añade sucesivamente a la suspensión de partículas de tungsteno, mientras se mantiene sobre un mezclador de vórtice de múltiples tubos. La mezcla final se somete a sonicación brevemente y se incuba sometiéndolo a vórtice constante durante 10 minutos. Después del período de precipitación, los tubos se centrifugan brevemente, se separa el líquido, se lavan con 500 ml de etanol del 100%, y se centrifugan durante 30 segundos. De nuevo se separa el líquido, y se añaden 105 μl de etanol del 100% al sedimento de partículas de tungsteno final. Para el bombardeo con
- 55 la pistola de partículas, las partículas de tungsteno/ADN se someten a sonicación brevemente y se aplican 10 μl sobre el centro de cada macroportador y se dejan secar aproximadamente 2 minutos antes del bombardeo.

Tratamiento con la Pistola de Partículas

- 60 Las placas con la muestra se bombardean al nivel núm. 4 en la pistola de partículas núm.HE34-1 o núm.HE34-2. Todas las muestras reciben un único disparo a 44,23 atm, tomándose un total de diez alícuotas de cada tubo de partículas/ADN preparadas.

Tratamiento Posterior

- 65 Tras el bombardeo, los embriones se mantienen en medio 560Y durante 2 días, después se transfieren a medio de selección 560R que contiene 3 mg/litro de Bialaphos, y se subcultivan cada 2 semanas. Después de aproximadamente 10 semanas de selección, los clones de callo resistentes a la selección se transfieren a medio 288J para iniciar la

ES 2 300 440 T3

regeneración de las plantas. Tras la maduración de los embriones somáticos (2-4 semanas), se transfieren los embriones somáticos desarrollados en los pocillos al medio para la germinación y se transfieren a la cámara de cultivo iluminada. Aproximadamente 7-10 días después, las plántulas en desarrollo se transfieren a medio sin hormonas 272V en tubos durante 7-10 días hasta que las plántulas están bien establecidas. Después se transfieren las plantas a insertos en planos (equivalentes a un tiesto de 6,35 cm) que contienen suelo para tiestos y se hacen crecer durante 1 semana en una cámara de crecimiento, con posterioridad se hacen crecer 1-2 semanas más en el invernadero, después se transfieren a tiestos 600 clásicos (7,26 litros) y se hacen crecer hasta la madurez. Las plantas se controlan y se puntúan en cuanto a la expresión de la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido fungicida de la invención, o en cuanto a la presencia del polipéptido fungicida mediante métodos inmunológicos, o en cuanto a la actividad fungicida mediante análisis conocidos en la técnica, descritos más arriba en la presente memoria.

Medios de Bombardeo y Cultivo

El medio de bombardeo (560Y) comprende 4,0 g/l de sales basales N6 (SIGMA C-1416), 1,0 ml/l de Mezcla de Vitaminas de Eriksson (1000X SIGMA-1511), 0,5 mg/l de tiamina HCl, 120,0 g/l de sacarosa, 1,0 mg/l de 2,4-D, y 2,88 g/l de L-prolina (completada hasta el volumen con H₂O D-I después del ajuste a un pH de 5,8 con KOH); 2,0 g/l de Gelrite (añadido después de completar el volumen con H₂O D-I); y 8,5 mg/l de nitrato de plata (añadido después de esterilizar el medio y enfriar a la temperatura ambiente). El medio de selección (560R) comprende 4,0 g/l de sales basales N6 (SIGMA C-1416), 1,0 ml/l de Mezcla de Vitaminas de Eriksson (1000X SIGMA-1511), 0,5 mg/l de tiamina HCl, 30,0 g/l de sacarosa, y 2,0 mg/l de 2,4-D (completado hasta el volumen con H₂O D-I después del ajuste del pH a 5,8 con KOH); 3,0 g/l de Gelrite (añadido después de completar el volumen con H₂O D-I); y 0,85 mg/l de nitrato de plata y 3,0 mg/l de Bialaphos (ambos añadidos después de esterilizar el medio y enfriar a la temperatura ambiente).

El medio de regeneración vegetal (288J) comprende 4,3 g/l de sales MS (GIBCO 11117-074), 5,0 ml/l de solución de partida de vitaminas MS (0,100 g de ácido nicotínico, 0,02 g/l de tiamina HCL, 0,10 g/l de piridoxina HCL, y 0,40 g/l de glicina completada hasta el volumen con H₂O D-I purificada) (Murashige y Skoog (1962) *Physiol. Plant.* 15:473), 100 mg/l de mio-inositol, 0,5 mg/l de zeatina, 60g/l de sacarosa, y 1,0 ml/l de ácido abscísico 0,1 mM (completado hasta el volumen con H₂O D-I purificada después de ajustar el pH a 5,6); 3,0 g/l de Gelrite (añadido después de completar el volumen con H₂O D-I); y 1,0 mg/l de ácido indolacético y 3,0 mg/l de Bialaphos (añadido después de esterilizar el medio y enfriar a 60°C). El medio sin hormona (272V) comprende 4,3 g/l de sales MS (GIBCO 11117-074), 5,0 ml/l de solución de partida de vitaminas MS (0,100 g/l de ácido nicotínico, 0,02 g/l de tiamina HCL, 0,10 g/l de piridoxina HCL, y 0,40 g/l de glicina completada hasta el volumen con H₂O D-I purificada), 0,1 g/l de mioinositol, y 40,0 g/l de sacarosa (completada hasta el volumen con H₂O D-I purificada después de ajustar el pH a 5,6); y 6 g/l de bacto-agar (añadido después de completar el volumen con H₂O D-I purificada), se esteriliza y se enfría a 60°C.

Ejemplo 16

Transformación de Maíz Mediada por Agrobacterium y Regeneración de las Plantas Transgénicas

Para la transformación de maíz mediada por *Agrobacterium* con una secuencia de nucleótidos de la invención, se emplea preferiblemente el método de Zhao (Patente de los Estados Unidos Núm. 5.981.840, y publicación de patente PCT WO98/32226. Brevemente, se aíslan del maíz los embriones inmaduros y se ponen en contacto los embriones con una suspensión de *Agrobacterium*, donde las bacterias son capaces de transferir la secuencia de nucleótidos de la invención optimizada para la planta a al menos una célula de los embriones inmaduros (etapa 1: etapa de infección). En esta etapa los embriones inmaduros se sumergen preferiblemente en una suspensión de *Agrobacterium* para el inicio de la inoculación. Los embriones se cultivan simultáneamente durante un tiempo con *Agrobacterium* (etapa 2: etapa de cultivo simultáneo). Preferiblemente los embriones inmaduros se cultivan sobre medio sólido después de la etapa de infección. Después de este período de cultivo simultáneo se contempla una etapa de “descanso” opcional. En esta etapa de descanso, se incuban los embriones en presencia de al menos un antibiótico conocido por inhibir el crecimiento de *Agrobacterium* sin la adición de un agente selectivo para los transformantes de la planta (etapa 3: etapa de descanso). Preferiblemente los embriones inmaduros se cultivan en un medio sólido con antibiótico, pero sin un agente de selección, para la eliminación de *Agrobacterium* y para una fase de descanso de las células infectadas. A continuación, los embriones inoculados se cultivan sobre medio que contiene un agente de selección y se recupera el callo transformado en crecimiento (etapa 4: etapa de selección). Preferiblemente, los embriones inmaduros se cultivan sobre un medio sólido con un agente de selección dando como resultado el crecimiento selectivo de las células transformadas. Después se regenera el callo en las plantas (etapa 5: etapa de regeneración), y preferiblemente se cultivan en medio sólido los callos desarrollados en medio selectivo para regenerar las plantas.

Ejemplo 17

Transformación de Embriones de Soja y Regeneración de las Plantas Transgénicas

Se bombardean embriones de soja con un plásmido que contiene una secuencia de nucleótidos de la invención unida operablemente a un promotor de ubiquitina como sigue. Para inducir embriones somáticos, se cultivan cotiledones de 3-5 mm de longitud disecionados de semillas inmaduras, esterilizadas en superficie del cultivar de soja A2872 en luz u oscuridad a 26°C sobre un medio de agar apropiado durante seis a siete semanas. Los embriones somáticos que

producen embriones secundarios se extirpan después y se colocan en un medio líquido adecuado. Tras la selección repetida de las agrupaciones de embriones somáticos que se multiplicaban tan pronto, embriones en fase globular, se mantienen las suspensiones como se describe más abajo.

- 5 Los cultivos en suspensión embriogénicos de soja se pueden mantener en 35 ml de medio líquido sobre un aparato de movimiento oscilatorio giratorio, 150 rpm, a 26°C con luces fluorescentes en un programa de día/noche de 16:8 horas. Los cultivos se subcultivan cada dos semanas inoculando aproximadamente 35 mg de tejido en 35 ml de medio líquido.
- 10 Los cultivos en suspensión embriogénicos de soja se pueden transformar después mediante el método del bombardeo con una pistola de partículas (Klein *et al.* (1987) *Nature* (Londres) 327:70-73, Patente de los Estados Unidos Núm. 4.945.050). Se puede utilizar un aparato Du Pont Biolistic PDS1000/HE (calibrado con helio) para estas transformaciones.
- 15 Un gen marcador seleccionable que se puede utilizar para facilitar la transformación de la soja es un transgén compuesto por un promotor 35S del Virus del Mosaico de la Coliflor (Odell *et al.* (1985) *Nature* 313:810-812), el gen de la higromicina-fosfotransferasa del plásmido pJR225 (de *E. coli*; Gritz *et al.* (1983) *Gene* 25:179-188), y el gen de la nopalina sintasa de la región 3' del ADN-T del plásmido Ti de *Agrobacterium tumefaciens*. El casete de expresión que comprende la secuencia de nucleótidos de la invención unido operablemente al promotor de la ubiquitina se puede
20 aislar como un fragmento de restricción. Este fragmento se puede insertar después en un sitio de restricción único del vector que porta el gen marcador.

- 25 A 50 µl de una suspensión de 60 mg/ml de partículas de oro de 1 µm se añaden (por orden): 5 µl de ADN (1 µg/µl), 20 µl de espermidina (0,1 M), y 50 µl de CaCl₂ (2,5 M). La preparación de partículas se agita después durante tres minutos, se centrifuga en una microcentrífuga durante 10 segundos y se separa el sobrenadante. Las partículas recubiertas con ADN se lavan después en 400 µl de etanol del 70% y se resuspenden en 40 µl de etanol anhidro. La suspensión de ADN/partículas se puede someter a sonicación tres veces por segundo cada vez. Después se cargan cinco microlitros de las partículas de oro recubiertas con ADN en cada disco de macro-portador.

- 30 Se colocan aproximadamente 300-400 mg de un cultivo en suspensión de dos semanas de edad en una placa de petri de 60x15 mm vacía y el líquido residual se separa del tejido con una pipeta. Para cada experimento de transformación, se bombardean aproximadamente 5-10 placas de tejido. La presión de ruptura de la membrana se ajusta a 74,85 atm, y la cámara se evacúa a un vacío de 0,94 atm. El tejido se coloca a aproximadamente 8,89 cm de la pantalla de retención y se bombardea tres veces. Tras el bombardeo, el tejido se puede dividir en mitades y colocar de nuevo en el líquido y
35 cultivar como se ha descrito antes.

- De cinco a siete días después del bombardeo, el medio líquido se puede cambiar por medio de nueva aportación, y de once a doce días después del bombardeo con medio de nueva aportación que contiene 50 mg/ml de higromicina. Este medio selectivo se puede renovar semanalmente. De siete a ocho semanas después del bombardeo, se puede
40 observar tejido transformado, verde que crece a partir de agrupaciones embriogénicas necróticas no transformadas. El tejido verde aislado se separa y se inocula en matraces individuales para generar nuevos cultivos en suspensión embriogénicos transformados, propagados clónicamente. Cada nueva línea se puede tratar con un evento de transformación independiente. Estas suspensiones se pueden subcultivar después y mantener en forma de agrupaciones de embriones inmaduros o regenerar en plantas completas mediante maduración y germinación de los embriones somáticos
45 individuales.

Ejemplo 18

Transformación de Tejido de Meristemo de Girasol y Regeneración de las Plantas Transgénicas

- 50 Se transforman tejidos de meristemo de girasol con un casete de expresión que contiene la secuencia de nucleótidos de la invención unida operablemente a un promotor de ubiquitina como sigue (véase también la Patente Europea Número 0486233 y Malone-Schoneberg *et al.* (1994) *Plant Science* 103:199-207). Se descascaran semillas de girasol maduras (*Helianthus annuus* L.) utilizando una trilladora de maíz. Se esterilizan las superficies de las semillas durante
55 30 minutos en una solución blanqueadora Clorox al 20% con la adición de dos gotas de Tween 20 por 50 ml de solución. Las semillas se enjuagan dos veces con agua destilada estéril.

- Se preparan explantes de eje embrionario dividido mediante una modificación de los procedimientos descritos por Schrammeijer *et al.* (Schrammeijer *et al.* (1990) *Plant Cell Rep.* 9:55-60). Las semillas se embeben en agua destilada durante 60 minutos siguiendo el procedimiento de esterilización de la superficie. Los cotiledones de cada semilla se rompen después, produciendo una fractura limpia en el plano del eje embrionario. Tras extirpar la punta de la raíz, los explantes se bisecan longitudinalmente entre las hojas primordiales. Las dos mitades se colocan, con la superficie cortada hacia arriba, sobre medio GBA que consiste en elementos minerales de Murashige y Skoog (Murashige *et al.* (1962) *Physiol. Plant.*, 15: 473-497), adiciones de vitamina de Shepard (Shepard (1980) en *Emergent Techniques for the Genetic Improvement of Crops* (Universidad de Minnesota Press, St. Paul, Minnesota), 40 mg/l sulfato de adenina, 30 g/l de sacarosa, 0,5 mg/l 16-bencil-aminopurina (BAP), 0,25 mg/l de ácido indol-3-acético (IAA), 0,1 mg/l de ácido giberélico (GA₃), pH 5,6, y 8g/l de Phytagar.
65

ES 2 300 440 T3

Los explantes se someten a bombardeo con microproyectiles antes del tratamiento de *Agrobacterium* (Bidney *et al.* (1992) *Plant Mol. Biol.* 18: 301-313). Se colocan de treinta a cuarenta explantes en un círculo en el centro de una placa de 60 x 20 mm para este tratamiento. Aproximadamente 4,7 mg de microproyectiles de tungsteno de 1,8 mm se resuspenden en 25 ml de tampón TE estéril (Tris HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) y se utilizan alícuotas de 1,5 ml por bombardeo. Cada placa se bombardea dos veces a través de una pantalla Nytex de 150 mm colocada 2 cm por encima de las muestras en un dispositivo de aceleración de partículas PDS 1000®.

La cepa de *Agrobacterium tumefaciens* desarmada EHA1 05 se utiliza en todos los experimentos de transformación. Se introduce un vector plasmídico binario que comprende el casete de expresión que contiene la secuencia de nucleótidos de la invención unida operablemente al promotor de ubiquitina en la cepa EHA105 de *Agrobacterium* por medio de congelación-descongelación como describen Holsters *et al.* (1978) *Mol. Gen. Genet.* 163:181-187. Este plásmido comprende adicionalmente un gen marcador seleccionable para kanamicina (esto es, *nptII*). Las bacterias de los experimentos de transformación vegetal se hacen crecer durante la noche (28°C y agitación continua a 100 RPM) en medio YEP líquido (10 gm/l de extracto de levadura, 10 gm/l de Bactopectona, y 5 gm/l de NaCl, pH 7,0) con los antibióticos apropiados requeridos para el mantenimiento de la cepa bacteriana y el plásmido binario. La suspensión se utiliza cuando alcanza una DO₆₀₀ de aproximadamente 0,4 a 0,8. Las células de *Agrobacterium* se sedimentan y se resuspenden a una DO₆₀₀ final de 0,5 en un medio de inoculación formado por MES 12,5 mM pH 5,7, 1 gm/l de NH₄Cl, y 0,3 gm/l de MgSO₄.

Los explantes recién bombardeados se colocan en una suspensión de *Agrobacterium*, se mezclan, y se dejan inalterados durante 30 minutos. Los explantes se transfieren después a medio GBA y se cultivan simultáneamente, con la superficie cortada hacia abajo, a 26°C y con días de 18 horas. Después de tres días de cultivo simultáneo, los explantes se transfieren a 374B (medio GBA que carece de reguladores del crecimiento y con un nivel reducido de sacarosa del 1%) con un suplemento de 250 mg/l de cefotaxima y 50 mg/l de sulfato de kanamicina. Los explantes se cultivan durante dos a cinco semanas de selección y después se transfieren a medio 374B de nueva aportación que carece de kanamicina durante una a dos semanas de desarrollo continuo. Los explantes con zonas de crecimiento con diferenciación, resistentes a los antibióticos que no han producido brotes adecuados para la extirpación se transfieren a medio GBA que contiene 250 mg/l de cefotaxima durante un segundo tratamiento de fitohormonas de 3 días. Las muestras de hojas de los brotes resistentes a kanamicina, verdes se analizan en cuanto a la presencia de NPTII mediante ELISA y en cuanto a la presencia de expresión transgénica analizando la expresión de la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido fungicida de la invención, la presencia de polipéptido fungicida mediante métodos inmunológicos, o en cuanto a la actividad fungicida mediante análisis conocidos en la técnica, descritos más arriba en la presente memoria.

Los brotes positivos para NPTII se injertan a híbrido Pioneer® 6440 en rizoma de plántula de girasol desarrollado *in vitro*. Las semillas con la superficie esterilizada se hacen germinar en medio 48-0 (sales de fuerza media de Murashige y Skoog, sacarosa al 0,5%, gelrite al 0,3%, pH 5,6) y se desarrollan en las condiciones descritas para el cultivo de explantes. La porción superior de la plántula se separa, se realiza un corte vertical a 1 cm en el hipocotilo, y el brote transformado se inserta en el corte. Se envuelve toda la zona con parafilm para asegurar el brote. Las plantas injertadas se transfieren a suelo después de una semana de cultivo *in vitro*. Los injertos en suelo se mantienen en condiciones de humedad elevada por medio de una aclimatación lenta al entorno del invernadero. Los sectores transformados de las plantas T₀ (generación parental) que maduran en el invernadero se identifican mediante ELISA para NPTII y/o mediante análisis de la actividad fungicida de los extractos de hojas mientras las semillas transgénicas cosechadas de las plantas T₀ positivas para NPTII se identifican mediante análisis de la actividad fungicida de pequeñas porciones de cotiledón sembrado seco.

Un protocolo de transformación de girasol alternativo permite la recuperación de la progenie transgénica sin utilizar una presión de selección química. Este método se utiliza generalmente en los casos en los que las secuencias de nucleótidos de la presente invención están unidas operablemente a promotores constitutivos o inducibles. Las semillas se descascaran y se esteriliza su superficie durante 20 minutos en una solución blanqueadora de Clorox al 20% con la adición de dos o tres gotas de Tween 20 por 100 ml de solución, después se enjuagan tres veces con agua destilada. Las semillas esterilizadas se embeben en la oscuridad a 26°C durante 20 horas sobre papel de filtro humedecido con agua. Los cotiledones y los radicales radiculares se separan, y los explantes del meristemo se cultivan en 374E (medio GBA que consiste en sales MS, vitaminas de Shepard, 40 mg/l de sulfato de adenina, sacarosa al 3%, 0,5 mg/l de 6-BAP, 0,25 mg/l de IAA, 0,1 mg/l de GA, y Phytagar al 0,8% a pH 5,6) durante 24 horas en la oscuridad. Las hojas primarias se separan para exponer el meristemo apical, se colocan alrededor de 40 explantes con el domo apical hacia arriba en un círculo de 2 cm en el centro de 374M (medio GBA con Phytagar al 1,2%), y después se cultivan en el medio durante 24 horas en la oscuridad.

Aproximadamente 18,8 mg de partículas de tungsteno de 1,8 µm se resuspenden en 150 µl de etanol absoluto. Tras la sonicación, se dejan caer 8 µl sobre el centro de la superficie del macroportador. Cada placa se bombardea dos veces con discos de ruptura de 44,2 atm en la primera repisa a un vacío de la pistola de helio de 26 mm de Hg.

El plásmido de interés se introduce en la cepa EHA105 de *Agrobacterium tumefaciens* por medio de congelación-descongelación como se ha descrito previamente. El sedimento de bacterias desarrolladas durante la noche a 28°C en un medio YEP líquido (10 g/l de extracto de levadura, 10 g/l de Bactopectona, y 5 g/l de NaCl, pH 7,0) en presencia de 50 µg/l de kanamicina se resuspende en un medio de inoculación (ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico 12,5 mM 2-mM, MES, 1 g/l de NH₄Cl y 0,3 g/l de MgSO₄ a pH 5,7) para alcanzar una concentración final de 4,0 a una DO 600. Los explantes bombardeados con partículas se transfieren a medio GBA (374E), y se coloca una gota de suspensión

de bacterias directamente sobre la parte superior del meristemo. Los explantes se cultivan simultáneamente en el medio durante 4 días, después de lo cual los explantes se transfieren a medio 374C (GBA con sacarosa al 1% y sin BAP, IAA, GA3 y con un suplemento de 250 µg/ml de cefotaxima). Las plántulas se cultivan en el medio durante aproximadamente dos semanas con días de 16 horas y condiciones e incubación a 26°C.

Los explantes (aproximadamente 2 cm de longitud) de dos semanas de cultivo en medio 374C se escrutan en cuanto a la expresión de la secuencia de nucleótidos de la invención o la presencia del polipéptido codificado de la invención mediante métodos inmunológicos o actividad fungicida, o similar. Tras identificar los explantes positivos, se descartan aquellos brotes que no muestran actividad fungicida, y cada explante positivo se subdivide en explantes nodales. Un explante nodal contiene al menos un nodo potencial. Los segmentos potenciales se cultivan en medio GBA durante tres a cuatro días para promover la formación de yemas auxiliares a partir de cada nodo. Después se transfieren a medio 374C y se deja que se desarrollen durante cuatro semanas más. Las yemas en desarrollo se separan y se cultivan durante cuatro semanas más en medio 374C. Las muestras de hojas reunidas de cada brote recién recuperado se escrutan de nuevo mediante el análisis de la actividad de la proteína adecuada. En este momento, los brotes positivos recuperados de un único nodo se habrán enriquecido generalmente en el sector transgénico detectado en el análisis inicial antes del cultivo nodal.

Los brotes recuperados positivos para el polipéptido fungicida de la invención se injertan en hibridoma de plántulas de girasol desarrolladas *in vitro* híbridas Pioneer 6440. Los rizomas se preparan de la siguiente manera. Se descascaran las semillas y se esteriliza su superficie durante 20 minutos en una solución blanqueadora Clorox al 20% con la adición de dos a tres gotas de Tween 20 por 100 ml of solución, y se enjuagan tres veces con agua destilada. Las semillas esterilizadas se hacen germinar sobre el filtro humedecido con agua durante tres días, después se transfieren a medio 48 (sal de fuerza media MS, sacarosa al 0,5%, gelrite al 0,3% pH 5,0) y se hacen crecer a 26°C en la oscuridad durante tres días, después se incuban en condiciones de cultivo de días de 16 horas. La porción superior de la plántula seleccionada se separa, se realiza un corte vertical en cada hipocotilo, y se inserta un brote transformado en un corte en V. La zona cortada se envuelve con parafilm. Después de una semana de cultivo en el medio, las plantas injertadas se transfieren a suelo. En las dos primeras semanas, se mantienen en condiciones de humedad elevada para aclimatarlas al entorno de un invernadero.

Ejemplo 19

Preparación de Anticuerpos

Se utilizaron métodos normalizados para la producción de anticuerpos tales como los descritos por Harlow y Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory. Específicamente, los anticuerpos para los polipéptidos de la invención se produjeron inyectando seis veces 100 microgramos de polipéptido purificado desnaturalizado en ratones blancos hembra New Zealand (Bethyl Laboratory, Montgomery, Tex.).

Después se tomaron muestras de sangre de los animales a intervalos de dos semanas. Los anticuerpos se purificaron mediante cromatografía de afinidad con antígeno inmovilizado en Affigel 15 (BioRad) como describen Harlow y Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, N.Y. La columna de afinidad se preparó con polipéptido purificado esencialmente como recomienda BioRad RTM. La detección inmunitaria de antígenos en las aplicaciones en PVDF se llevó a cabo siguiendo el protocolo de Meyer *et al.* (1988) *J. Cell. Biol.* 107:163, utilizando el kit ECL de Amersham (Arlington Heights, Ill.).

Ejemplo 20

Construcción del Vector de Transformación Fus1

Se construyó una versión sintética del gen Fus1 correspondiente al péptido maduro Fus1 con un uso no aleatorio de codones representativo de *Manduca sexta* (SEQ ID NO: 120 y SEQ ID NO: 122). La preferencia de codones seleccionada para Fus1 derivaba de la base de datos del uso de codones Kazusa (asequible de www.Kazusa.or.jp/codon/). Se añadió la secuencia señal BAA a Fus1 para facilitar la exportación fuera de la célula y al espacio intercelular (Rahmatullah RJ *et al.* (1989) *Plant Mol. Biol.* 12(1):119-121). La secuencia de aminoácidos BAA-Fus1 se muestra en el SEQ ID NO: 121 y el SEQ ID NO: 123. Se seleccionan promotores constitutivos fuertes para expresar Fus1 en tejidos susceptibles a *F. verticilloides*. BAA-Fus1 (SEQ ID NO: 120) fue subclonado con posterioridad en los sitios correspondientes de los vectores que contienen o bien el promotor de la ubiquitina de maíz:ubi-intron o bien el promotor h2B de maíz:ubi-intron (Patente de los Estados Unidos Número 6.177.611). Se colocó BAA-Fus1 detrás del promotor indicado con una secuencia 3' correspondiente al terminador pinII. Este casete está flanqueado por sitios para las enzimas de restricción no compatibles diseñados para clonar direccionalmente el casete en un plásmido binario que contiene el casete del gen marcador seleccionable 35S-PAT-35S. Se utilizaron los sitios para las enzimas de restricción para subclonar el casete promotor/intrón:BAA-Fus1:pinII ter en un plásmido binario para la transformación del maíz.

Ejemplo 21

Construcción de Vectores de Transformación Fus2

5 Se construyó una versión sintética de Fus2 conectado operablemente a un péptido señal de la alfa-amilasa de cebada (BAA) modificado con un uso no aleatorio de codones representativo de *Streptomyces coelicolor* (SEQ ID NO: 124 y SEQ ID NO: 126). Se eligió el uso de codones de *S. coelicolor* debido a su similitud global con el uso de codones observado en plantas. La preferencia de codón seleccionada para Fus2 derivaba de la base de datos de uso de codones Kazusa (asequible de www.Kazusa.or.jp/codon/). Véanse también las Tablas 1 y 2. Se añadió la secuencia señal BAA a Fus2 para facilitar la exportación de Fus2 fuera de la célula y al espacio intercelular. Se realizaron modificaciones en el extremo 3' del péptido señal para lograr una escisión del péptido señal correcta pronosticada por el programa SIGNALP (Versión 1.1) (Center for Biological Sequence Analysis, Universidad Técnica de Dinamarca). La secuencia de aminoácidos BAA-Fus2 se muestra en el SEQ ID NO: 125 y el SEQ ID NO: 127. El gen sintético se construyó utilizando una serie de oligonucleótidos complementarios solapantes que fueron hibridados juntos, tratados con Klenow para reparar los espacios, y amplificados mediante PCR utilizando cebadores correspondientes a los extremos 5' y 3' del gen sintético. Los sitios de las enzimas de restricción se incorporaron a los cebadores de la PCR para facilitar la clonación del gen. El producto de la PCR fue clonado con TOPO en pCR2.1 (Invitrogen) y su secuencia fue verificada. Con posterioridad se subclonó un fragmento de una enzima de restricción que contenía BAA-Fus2 en los correspondientes sitios de los vectores que contenían o bien el promotor de la ubiquitina de maíz:ubi-intron o bien el promotor h2B de maíz:ubi-intron. Los vectores contenían una secuencia 3' correspondiente al terminador pinII. El fragmento BAA-Fus2 se clonó entre el promotor indicado y el terminador pinII. Se eligieron los promotores constitutivos fuertes para expresar FUs2 en tejidos susceptibles a *F. verticilloides*. El casete promotor/intrón:BAA-Fus2:pinII ter está flanqueado por sitios para enzimas de restricción no compatibles diseñados para clonar direccionalmente el casete en un plásmido binario que contiene un marcador seleccionable. Los sitios de las enzimas de restricción se utilizaron para subclonar el casete promotor/intrón:BAA-Fus2:pinII ter en un plásmido binario para la transformación del maíz.

(Tabla pasa a página siguiente)

Tabla 1. <i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2) [gbct]: 6257 CDS (2043281 codones)									
campos: [tripleto] [frecuencia: por mil] ([número])									
UUU	0,4 (863)	UCU	0,6 (1266)	UAU	1,0 (1962)	UGU	0,7 (1448)		
UUC	26,0 (53065)	UCC	20,2 (41262)	UAC	19,5 (39789)	UGC	7,0 (14341)		
UUA	0,1 (128)	UCA	1,0 (2137)	UAA	0,1 (290)	UGA	2,4 (4878)		
UUG	2,4 (4935)	UCG	13,8 (28229)	UAG	0,5 (1089)	UGG	15,1 (30770)		
CUU	1,5 (3129)	CCU	1,5 (2995)	CAU	1,6 (3366)	CGU	5,5 (11183)		
CUC	36,6 (74736)	CCC	25,4 (51951)	CAC	21,5 (44018)	CGC	39,1 (79956)		
CUA	0,3 (657)	CCA	1,3 (2633)	CAA	1,3 (2593)	CGA	2,5 (5124)		
CUG	61,3 (125241)	CCG	33,6 (68652)	CAG	25,1 (51248)	CGG	32,0 (65332)		
AUU	0,6 (1228)	ACU	1,1 (2347)	AAU	0,7 (1436)	AGU	1,5 (3030)		
AUC	27,6 (56340)	ACC	39,6 (80826)	AAC	16,2 (33191)	AGC	12,3 (25187)		
AUA	0,7 (1367)	ACA	1,6 (3194)	AAA	1,0 (2041)	AGA	0,8 (1574)		

Tabla 1. (cont.) <i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2) [gbct]: 6257 CDS (2043281 codones)									
campos: [tripleto] [frecuencia: por mil] ([número])									
AUG	15,8 (32271)	ACG	18,9 (38697)	AAG	19,7 (40293)	AGG	3,7 (7488)		
GUU	1,4 (2905)	GCU	2,9 (5908)	GAU	2,9 (6024)	GGU	9,3 (18920)		
GUC	47,2 (96460)	GCC	78,6 (160548)	GAC	58,0 (118595)	GGC	61,4 (125467)		
GUA	2,7 (5416)	GCA	5,3 (10890)	GAA	8,5 (17445)	GGA	7,1 (14608)		
GUG	35,3 (72144)	GCG	49,8 (101831)	GAG	48,5 (99056)	GGG	18,2 (37288)		
GC codificante 72,38% 1ª letra GC 72,74% 2ª letra GC 51,39% 3ª letra GC 93,00%									

Tabla 2. <i>Streptomyces coelicolor</i> [gbct]: 2110 CDS (646333 codones)									
campos: [tripleto] [frecuencia: por mil] ([número])									
UUU	0,5 (329)	UCU	0,8 (496)	UAU	1,0 (676)	UGU	0,8 (517)		
UUC	25,7 (16596)	UCC	20,1 (12971)	UAC	19,4 (12521)	UGC	7,3 (4734)		
UUA	0,1 (49)	UCA	1,2 (797)	UAA	0,2 (105)	UGA	2,6 (1650)		
UUG	2,6 (1696)	UCG	13,5 (8729)	UAG	0,5 (355)	UGG	15,2 (9813)		
CUU	1,9 (1228)	CCU	1,8 (1178)	CAU	1,9 (1251)	CGU	5,6 (3602)		
CUC	36,2 (23411)	CCC	25,4 (16419)	CAC	22,6 (14594)	CGC	39,2 (25310)		
CUA	0,5 (304)	CCA	1,6 (1018)	CAA	1,7 (1076)	CGA	2,9 (1885)		
CUG	59,3 (38346)	CCC	32,7 (21145)	CAG	25,8 (16671)	CGG	31,5 (20333)		
AUU	0,8 (497)	ACU	1,4 (925)	AAU	0,8 (515)	AGU	1,6 (1023)		
AUC	27,8 (17997)	ACC	39,9 (25804)	AAC	16,2 (10447)	AGC	12,7 (8194)		
AUA	0,7 (444)	ACA	1,9 (1245)	AAA	1,3 (829)	AGA	0,8 (537)		

Tabla 2 (cont.). <i>Streptomyces coelicolor</i> [gbct]: 2110 CDS (646333 codones)									
campos: [tripleto] [frecuencia: por mil] ([número])									
AUG	16,1 (10392)	ACG	19,1 (12377)	AAG	19,8 (12795)	AGG	3,8 (2441)		
GUU	1,7 (1086)	GCU	3,8 (2429)	GAU	3,5 (2251)	GGU	9,1 (5867)		
GUC	46,3 (29904)	GCC	77,5 (50098)	GAC	58,2 (37624)	GGC	58,8 (38034)		
GUA	2,7 (1767)	GCA	6,7 (4302)	GAA	9,6 (6215)	GGA	7,3 (4689)		
GUG	33,9 (21929)	GCG	48,6 (31399)	GAG	47,9 (30970)	GGG	17,8 (11502)		
GC codificante 71,94% 1ª letra GC 72,38% 2ª letra GC 51,28% 3ª letra GC 92,14%									

Todas las publicaciones y solicitudes de patente mencionadas en la memoria son indicativas del nivel de los expertos en la técnica a la cual pertenece esta invención.

Aunque la invención anterior se ha descrito con cierto detalle a modo de ilustración y de ejemplo con la finalidad de aclarar la comprensión, será obvio que se pueden poner en práctica ciertos cambios y modificaciones dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada entre:

- (a) una secuencia de nucleótidos mostrada en el SEQ ID NO: 100 o 102;
- (b) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido mostrado en el SEQ ID NO: 101 o 103;
- (c) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene una identidad de secuencia de al menos 90% con una cualquiera de las secuencias de aminoácidos de (b), donde dicho polipéptido posee actividad defensiva antimicrobiana;
- (d) una secuencia de nucleótidos que hibrida en condiciones altamente restrictivas con una cualquiera de las secuencias de nucleótidos de (a), donde dicha secuencia de nucleótidos codifica un polipéptido que posee actividad defensiva antimicrobiana, y donde dichas condiciones altamente restrictivas incluyen hibridación en formamida al 50%, NaCl 1M, SDS al 1% a 37°C, y un lavado en 0,1 x SSC de 60 a 65°C;
- (e) una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de 99% con una secuencia de nucleótidos que codifica una cualquiera de las secuencias de aminoácidos de (b), donde dicha secuencia de nucleótidos codifica un polipéptido que posee actividad defensiva antimicrobiana;
- (f) una secuencia de nucleótidos que comprende al menos 25 nucleótidos contiguos de una cualquiera de las secuencias de nucleótidos de (a); donde dicha secuencia de nucleótidos codifica un polipéptido que posee actividad defensiva antimicrobiana; y
- (g) una secuencia de nucleótidos que consiste en un complemento de una cualquiera de las secuencias de nucleótidos de (a), (b), (c), (d), (e) o (f).

2. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1 que comprende adicionalmente secuencias de ácido nucleico vectoras.

3. Una célula anfitriona no humana diseñada para expresar el polipéptido codificado por una cualquiera de las moléculas de ácido nucleico de la reivindicación 1.

4. La célula anfitriona de la reivindicación 3, donde la célula anfitriona es una célula procariótica, fúngica, de levadura, o vegetal.

5. Un virus que comprende una molécula de ácido nucleico aislada de la reivindicación 1.

6. Un casete de expresión que comprende una molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1, donde dicho ácido nucleico está unido operablemente a un promotor que dirige la expresión en una célula vegetal.

7. Un polipéptido aislado que comprende un aminoácido seleccionado entre:

- (a) una secuencia de aminoácido de la reivindicación 1(b);
- (b) una secuencia de aminoácido que tiene una identidad de secuencia de al menos 90% con una cualquiera de las secuencias de aminoácidos de (a), donde dicho polipéptido posee actividad defensiva antimicrobiana;
- (c) una secuencia de aminoácidos que comprende al menos 35 aminoácidos contiguos de una cualquiera de las secuencias de aminoácidos de (a), donde dicho polipéptido posee actividad defensiva antimicrobiana;

8. Una composición que comprende el polipéptido aislado de la reivindicación 7.

9. Una planta transformada que comprende en su genoma al menos un casete de expresión incorporado establemente que comprende una secuencia de nucleótidos unida operablemente a un promotor que dirige la expresión en dicha célula vegetal, donde dicha secuencia de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada entre:

- (a) una secuencia de nucleótidos mostrada en la reivindicación 1(a);
- (b) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido mostrado en la reivindicación 1(b);
- (c) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene una identidad de secuencia de al menos 90% con una cualquiera de las secuencias de aminoácidos de (b), donde dicho polipéptido posee actividad defensiva antimicrobiana; y

- (d) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende al menos 35 aminoácidos contiguos de una secuencia de (b), donde dicho polipéptido posee actividad defensiva antimicrobiana.

10. El casete de expresión de la reivindicación 6 o la planta transformada de la reivindicación 9, donde dicho promotor se selecciona entre los promotores constitutivos, inducibles, y preferidos por el tejido.

11. El casete de expresión o la planta transformada de la reivindicación 10, donde dicho promotor es un promotor inducible por patógenos.

12. La planta transformada de la reivindicación 9, donde dicha planta se selecciona entre arroz, maíz, alfalfa, girasol, *Brassica*, soja, algodón, cártamo, cacahuete, sorgo, trigo, mijo, y tabaco.

13. Una semilla transformada de la planta de la reivindicación 9, que comprende dicho casete de expresión definido en la reivindicación 9.

14. Un método para potenciar la resistencia a una enfermedad en una planta frente a patógenos fúngicos, comprendiendo dicho método:

- (a) transformar una planta con al menos un casete de expresión incorporado establemente que comprende una secuencia de nucleótidos unida operablemente a un promotor que dirige la expresión en una célula de dicha planta, donde dicha secuencia de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada entre:

- (i) una secuencia de nucleótidos mostrada en la reivindicación 1(a);
- (ii) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido mostrado en la reivindicación 1(b);
- (iii) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene una identidad de secuencia de al menos 90% con una cualquiera de las secuencias de aminoácidos de (a)(ii), donde dicho polipéptido posee actividad defensiva antimicrobiana;
- (iv) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende al menos 35 aminoácidos contiguos de una cualquiera de las secuencias de (a)(ii), donde dicho polipéptido posee actividad defensiva antimicrobiana; y

- (b) determinar el nivel de aumento de la resistencia a un patógeno fúngico en dicha planta.

15. El método de la reivindicación 14, donde dicha planta se selecciona entre arroz, maíz, alfalfa, girasol, *Brassica*, soja, algodón, cártamo, cacahuete, sorgo, trigo, mijo, y tabaco.

16. El método de la reivindicación 14 o 15, donde dicha planta posee una resistencia incrementada a *Magnaportha grisea*, *Rhizoctonia solani*, o *Fusarium verticilloides*.

17. Un anticuerpo que se une selectivamente a un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende al menos 35 aminoácidos contiguos de una secuencia de aminoácidos seleccionada entre una cualquiera de las secuencias de la reivindicación 1(b).

Homología de Mag1 con atacinas conocidas

precursor atacina A	1	MFTYKLLGLVSVSASARYLVFEDLEGESYLVNQAEQVLEGEPPYENAVQLASPRVRQACQSVTLASDGS	75
precursor atacina B	(1)	-----MFAKLFLSVLLVGNRYLVVEEPGYVDQYERQPOQVWNSRVRRQACGALTINSDDGT	
precursor atacina B/F	(1)	-----MFGKIVFLLVALCAGVQSRYLIVSEPVYIIEHVEPELLASSRRVEDAHGALTILNSDGT	
bmori (neucina)	(1)	-----MSKSVALLLLCACLASGRHVPTRARRQASFTVNSDDGT	
Mag1	(1)	-----MFTKFWLVCLLVGAKARPQLGALTIFNSDDGT	
Consenso	(1)	YE L V R Q GALT NSDDGT	
precursor atacina A	76	MELGAKVPIVGENEKNVLSALCSVDINDQLAPASRGWGLALDANVNGHGLSVMKETVPGFGDRLTGGRVAVFHNDA	150
precursor atacina B	(59)	SCAVVKVPLTGNENHKFSALCSVDLTNQMLGAATAGLADANVNGHGLTILTKTHIPGFGDKMTAGKVNLEHND	
precursor atacina B/F	(61)	SCAVVKVFPAGNDKNIVSAIGSVDLTDROKLGAATAGVALDANVNGHGLSLTDTHIPGFGDKMTAGKVNLEHND	
bmori (neucina)	(39)	SCAALKVPLTGNNDKNVLSAIGSADFNDRKLSAASAGIALDANVNGHGLSLTGTRIPGFGSEOLGVGKVNLEHNN	
Mag1	(32)	SCAAVKVFPFGKNNIFSAIGADFNANHLSSATAGVALDNIIRGHGLSLTDTHIPGFGDKLTAGKINLEHNN	151
precursor atacina A	(151)	HDLSAKRFAVTKM-MPDPFPNVPENVTGCGVDYAVNRNKGASLGMAVNTPPFLDRKPYSAMENLAVERSPTTSVDENA	225
precursor atacina B	(134)	HDLSAKRFAATKN-MPNIPOVPENVTGCGVDYAVNRNKGASANANHTDFINRNDYSLGKYNLEKTPPTTSIDENA	
precursor atacina B/F	(136)	HDLTAKRFAATRN-MPDIANVPENVTGCGSIDYVNFKDKITGASASANHTDFINRNDYSLDCKNLKTKTPDTSIDENA	
bmori (neucina)	(114)	HDLSAKRFAIRMSPSAIPNAPNENVTGCGVDYAFKQKVGASLSANHSVDVINRNDYSAAGEKLNLEPSSSIDENA	
Mag1	(107)	HDLTANAFATRN-MPNIPOVPENVTGCGGLDYMFNKNKVGASLGANHTDFINRNDYSVGKLNLEFNSTSTSIDENA	
precursor atacina A	226	GFKKEDTPVPFKQWMEENFGLTFRSPGKWK	225
precursor atacina B	(225)	GNKKEDTPFFKSSWEESTSFSSFKYF----	
precursor atacina B/F	(208)	GNKKEDTPFFKSSWEESTSFSSFKYF----	
bmori Neucina)	(210)	GFKKEDTPFMKSSWEENFGFSLSKYF----	
Mag1	(189)	GFKKEDTPFYRSSWEENVGFSFKFF----	
	(181)	GFKKEDTPFMRSGWEEENMGFSLSKFF----	

FIG. 1

Homólogos de Mag1 de M. sexta inducida con patógenos

iiiglc.pk004.f3	(1)	1	--MSLSCLFLVALALVGAESRYIADDAVLPMPMSRVRPDTHTGSSVTVNSDGTSGSVKVPFPAAGDDKNVFAAIGGL	75
iiimlc.pk003.f3	(1)		-----HEDDAVFPMPMSRVRPDTHTGSSVTVNSDGTSGAIKVKVPFPAAGDDKNIVSAIGGL	
imi1c.pk002.m21	(1)		--MSLSCLLLFALALMGAESRYIADDAVFPMPMSRVRPDTHTGSSVTVNSDGTSGAIKVKVPFPAAGDDKNIVSAIGGL	
Mag1	(1)		-----MPTKPTVLLVCLLNGAKAPQQLGALTFNSDGTSGAAVKVPFPAAGDDKNIVSAIGGL	
iiiglc.pk004.f3	(74)	76	ELDKXLLK-----	150
iiimlc.pk003.f3	(54)		ELDKNLLKMSGATAGLAYDYNVNGHGATLTNTTHIPSGDKLTAAGKLVNFHNDNHNLDVKALATRTWPDIPRVPDFN	
imi1c.pk002.m21	(74)		ELDKNFKKMSGATAGLAYDYNVNRHGATLTNTTHIPSGDKLTAAGKLVNFQNDKHNPGREGVGHQGPCQXFWHAWPTS	
Mag1	(55)		ELFNANHHKLSATAGVALDNIIRGHGLSLTDTHIPGPGDKLTAAGKLVNFHNNHDLTANAFATRNMPNIPQVPNPN	
iiiglc.pk004.f3	(81)	151	-----	225
iiimlc.pk003.f3	(129)		TYGGGVDMFKDKVGASASAAHTPLFDRNDYSVGGKLVNFR-----	
imi1c.pk002.m21	(149)		-----	
Mag1	(130)		TVGGGLDYMFKNKVGASLGAATHDFINRNDYSVGGKLVNFRNPSTSLDFNAGPKKFDTPFMRSGWEPNMGFSLSK	
iiiglc.pk004.f3	(81)	226	-----	
iiimlc.pk003.f3	(170)		-----	
imi1c.pk002.m21	(149)		-----	
Mag1	(205)		PF	

FIG. 2

Secuencias peptídicas de Mag1 digerido con Lys-C

maglysc18:

1 5 10
VGASLGAAHTDF

maglysc24:

1 5 10 15
NNIFSAIGGADFNANHK

maglysc29:

1 5 10
KFDTPFMRSGWE

maglysc36:

1 5 10
LNLFHNNNHDLT

FIG. 3

ES 2 300 440 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Altier, Daniel J.
Herrmann, Rafael
Lu, Albert L.
McCutchen, Billy F.
Presnail, James K.
Weaver, Janine L.
Wong, James F. H.

<120> Péptidos Antimicrobianos y sus Usos

<130> 35718/244486

<150> 60/285,355

<151> 2001-04-20

<160> 127

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

<210> 1

<211> 766

<212> ADN

<213> *Manduca sexta*

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(621)

<400> 1

atg ttc acc aaa ttc gtc gtc ctg gtc tgt ctt ctc gtt ggt gct aag	48
Met Phe Thr Lys Phe Val Val Leu Val Cys Leu Leu Val Gly Ala Lys	
1 5 10 15	
gct cgg cct cag ctc ggc gct ctc act ttc aat tct gat ggc act tcc	96
Ala Arg Pro Gln Leu Gly Ala Leu Thr Phe Asn Ser Asp Gly Thr Ser	
20 25 30	
ggg gcg gcc gtc aaa gtt cca ttt ggt ggc aac aag aat aat ata ttt	144
Gly Ala Ala Val Lys Val Pro Phe Gly Gly Asn Lys Asn Asn Ile Phe	
35 40 45	
agt gct atc ggt ggg gct gat ttt aac gct aat cac aaa ctg agt tct	192
Ser Ala Ile Gly Gly Ala Asp Phe Asn Ala Asn His Lys Leu Ser Ser	
50 55 60	
gcg act gct gga gta gcg ctt gat aat atc cga ggt cac gga ctc agt	240
Ala Thr Ala Gly Val Ala Leu Asp Asn Ile Arg Gly His Gly Leu Ser	
65 70 75 80	
ttg acg gat acc cac atc ccc ggc ttt gga gac aag ttg acg gcg gcc	288
Leu Thr Asp Thr His Ile Pro Gly Phe Gly Asp Lys Leu Thr Ala Ala	
85 90 95	
ggc aag ttg aac ctc ttc cac aac aac aac cac gat ctg acc gcc aac	336
Gly Lys Leu Asn Leu Phe His Asn Asn Asn His Asp Leu Thr Ala Asn	
100 105 110	
gct ttc gcc acc agg aac atg ccg aac att cct cag gtt cca aac ttc	384
Ala Phe Ala Thr Arg Asn Met Pro Asn Ile Pro Gln Val Pro Asn Phe	
115 120 125	
aac acc gtt ggt ggc gga ctg gac tac atg ttc aag aac aag gtg ggc	432
Asn Thr Val Glv Gly Gly Leu Asp Tyr Met Phe Lys Asn Lys Val Gly	
130 135 140	

ES 2 300 440 T3

```

gct tca tta ggc gcc gcg cac act gac ttt atc aac cgc aac gac tac 480
Ala Ser Leu Gly Ala Ala His Thr Asp Phe Ile Asn Arg Asn Asp Tyr
145 150 155 160

tct gtg ggc ggc aag ttg aac ctg ttc cgg aac ccg agc acc tcg ctc 528
Ser Val Gly Gly Lys Leu Asn Leu Phe Arg Asn Pro Ser Thr Ser Leu
165 170 175

gac ttc aac gcc ggc ttt aag aag ttc gac acg ccc ttc atg aga tcc 576
Asp Phe Asn Ala Gly Phe Lys Lys Phe Asp Thr Pro Phe Met Arg Ser
180 185 190

ggc tgg gaa ccc aac atg ggc ttc tcc ctc tcc aag ttc ttc taa 621
Gly Trp Glu Pro Asn Met Gly Phe Ser Leu Ser Lys Phe Phe *
195 200 205

ttactttagt atatctctca gtattatgaa ttgtcttttt ttattaatgt aatccgcctt 681
ttgtaccgaa taaatatttt tatataaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 741
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaa 766

```

<210> 2

<211> 206

<212> PRT

<213> *Manduca sexta*

<400> 2

```

Met Phe Thr Lys Phe Val Val Leu Val Cys Leu Leu Val Gly Ala Lys
1 5 10 15
Ala Arg Pro Gln Leu Gly Ala Leu Thr Phe Asn Ser Asp Gly Thr Ser
20 25 30
Gly Ala Ala Val Lys Val Pro Phe Gly Gly Asn Lys Asn Asn Ile Phe
35 40 45
Ser Ala Ile Gly Gly Ala Asp Phe Asn Ala Asn His Lys Leu Ser Ser
50 55 60
Ala Thr Ala Gly Val Ala Leu Asp Asn Ile Arg Gly His Gly Leu Ser
65 70 75 80
Leu Thr Asp Thr His Ile Pro Gly Phe Gly Asp Lys Leu Thr Ala Ala
85 90 95
Gly Lys Leu Asn Leu Phe His Asn Asn Asn His Asp Leu Thr Ala Asn
100 105 110
Ala Phe Ala Thr Arg Asn Met Pro Asn Ile Pro Gln Val Pro Asn Phe
115 120 125
Asn Thr Val Gly Gly Gly Leu Asp Tyr Met Phe Lys Asn Lys Val Gly
130 135 140
Ala Ser Leu Gly Ala Ala His Thr Asp Phe Ile Asn Arg Asn Asp Tyr
145 150 155 160
Ser Val Gly Gly Lys Leu Asn Leu Phe Arg Asn Pro Ser Thr Ser Leu
165 170 175
Asp Phe Asn Ala Gly Phe Lys Lys Phe Asp Thr Pro Phe Met Arg Ser
180 185 190
Gly Trp Glu Pro Asn Met Gly Phe Ser Leu Ser Lys Phe Phe
195 200 205

```

<210> 3

<211> 760

<212> ADN

<213> *Manduca sexta*

<220>

<221> CDS

<222> (34)...(624)

<221> rasgo_misc

<222> (0)...(0)

<223> n = A, T, C o G

ES 2 300 440 T3

<400> 3

```

5      attcgggcacg aggacgatgt ggtgttcgta cca atg gtg gta tca agg gta cgg 54
          Met Val Val Ser Arg Val Arg
          1              5

10     cgc gac aca cac ggc tcg gtc acc gtc aac tcg gac ggc acc tcc gga 102
          Arg Asp Thr His Gly Ser Val Thr Val Asn Ser Asp Gly Thr Ser Gly
          10              15              20

15     gcg atc gtc aag gtg ccg ttc gca ggc gac gac aag aac atc gtc agc 150
          Ala Ile Val Lys Val Pro Phe Ala Gly Asp Asp Lys Asn Ile Val Ser
          25              30              35

20     gcc atc ggt ggc ctc gac ctc gac aag aac ctc aag atg agc ggc gcc 198
          Ala Ile Gly Gly Leu Asp Leu Asp Lys Asn Leu Lys Met Ser Gly Ala
          40              45              50              55

25     aca gcg ggc ttg gct tac gac aac gtc aat gga cac ggc gct act ctt 246
          Thr Ala Gly Leu Ala Tyr Asp Asn Val Asn Gly His Gly Ala Thr Leu
          60              65              70

30     aca aac aca cat ata ccc agc ttc ggt gac aag ctg acg gca gcc ggc 294
          Thr Asn Thr His Ile Pro Ser Phe Gly Asp Lys Leu Thr Ala Ala Gly
          75              80              85

35     aag ttg aac gtg ttc cat aac gac aac cac aac ctg gac gtg aag gcg 342
          Lys Leu Asn Val Phe His Asn Asp Asn His Asn Leu Asp Val Lys Ala
          90              95              100

40     ttg gcc acc agg acc atg ccg gat att ccg cgc gtg ccc gac ttc aac 390
          Leu Ala Thr Arg Thr Met Pro Asp Ile Pro Arg Val Pro Asp Phe Asn
          105              110              115

45     acc tac ggc ggc ggc gtc gac tac atg ttc aag gac aag gtg ggc gcg 438
          Thr Tyr Gly Gly Gly Val Asp Tyr Met Phe Lys Asp Lys Val Gly Ala
          120              125              130              135

50     tcg gcg agc gct gcg cac acg cct ctc ttc gat cgc aac gac tac tcc 486
          Ser Ala Ser Ala Ala His Thr Pro Leu Phe Asp Arg Asn Asp Tyr Ser
          140              145              150

55     gtg ggc ggc aag ctg aac ctg ttc cgt gac aag acc acc tcg ctc gac 534
          Val Gly Gly Lys Leu Asn Leu Phe Arg Asp Lys Thr Thr Ser Leu Asp
          155              160              165

60     ttc aac gcc gac tac aag aag ttc gag atg ccc aac ttc aag tcc gac 582
          Phe Asn Ala Asp Tyr Lys Lys Phe Glu Met Pro Asn Phe Lys Ser Asp
          170              175              180

65     tgg aca ccc aac atc ggc ttc tca ttc agc aag ttt tgg tag 624
          Trp Thr Pro Asn Ile Gly Phe Ser Phe Ser Lys Phe Trp *
          185              190              195

70     tttattatta tgattcaagt catccacggt ttgtacgggt gtaattaatt acgattttaa 684
          agtttaagta tttatattta aataaatatt ttggaaatna aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 744
          aaaaaaaaaa ctcgag 760

```

<210> 4

55 <211> 196

<212> PRT

<213> *Manduca sexta*

60

65

ES 2 300 440 T3

<400> 4

```

Met Val Val Ser Arg Val Arg Arg Asp Thr His Gly Ser Val Thr Val
 1          5          10          15
5  Asn Ser Asp Gly Thr Ser Gly Ala Ile Val Lys Val Pro Phe Ala Gly
    20          25          30
    Asp Asp Lys Asn Ile Val Ser Ala Ile Gly Gly Leu Asp Leu Asp Lys
      35          40          45
    Asn Leu Lys Met Ser Gly Ala Thr Ala Gly Leu Ala Tyr Asp Asn Val
      50          55          60
10  Asn Gly His Gly Ala Thr Leu Thr Asn Thr His Ile Pro Ser Phe Gly
    65          70          75          80
    Asp Lys Leu Thr Ala Ala Gly Lys Leu Asn Val Phe His Asn Asp Asn
      85          90          95
    His Asn Leu Asp Val Lys Ala Leu Ala Thr Arg Thr Met Pro Asp Ile
      100          105          110
15  Pro Arg Val Pro Asp Phe Asn Thr Tyr Gly Gly Gly Val Asp Tyr Met
    115          120          125
    Phe Lys Asp Lys Val Gly Ala Ser Ala Ser Ala Ala His Thr Pro Leu
      130          135          140
    Phe Asp Arg Asn Asp Tyr Ser Val Gly Gly Lys Leu Asn Leu Phe Arg
      145          150          155          160
20  Asp Lys Thr Thr Ser Leu Asp Phe Asn Ala Asp Tyr Lys Lys Phe Glu
      165          170          175
    Met Pro Asn Phe Lys Ser Asp Trp Thr Pro Asn Ile Gly Phe Ser Phe
      180          185          190
25  Ser Lys Phe Trp
    195

```

<210> 5

<211> 246

<212> ADN

30 <213> *Manduca sexta*

<220>

35 <221> CDS

<222> (1)...(240)

<221> rasgo_misc

40 <222> 234, 242, 243, 244, 246

<223> n = A, T, C o G

<400> 5

```

atg tcc ctg tcg tgt ctc ttc ctc gtt gcg ctg gcg ctg gtg ggc gca 48
Met Ser Leu Ser Cys Leu Phe Leu Val Ala Leu Ala Leu Val Gly Ala
 1          5          10          15

gag agc aga tac atc gcc gac gat gtg gtg ttg gta ccg atg atg gta 96
Glu Ser Arg Tyr Ile Ala Asp Asp Val Val Leu Val Pro Met Met Val
 20          25          30

tca cgg gta agg cgc gac aca cac ggc tcg gtc acc gtc aac tcg gac 144
Ser Arg Val Arg Arg Asp Thr His Gly Ser Val Thr Val Asn Ser Asp
 35          40          45

ggc acc tcc ggg agc gtc gtc aag gtg ccg ttc gca ggc gac gac aag 192
Gly Thr Ser Gly Ser Val Val Lys Val Pro Phe Ala Gly Asp Asp Lys
 50          55          60

aac gtc ttt agc gcc atc ggt ggt ctc gac ctc gat aag aan ctc aag 240
Asn Val Phe Ser Ala Ile Gly Gly Leu Asp Leu Asp Lys Xaa Leu Lys
 65          70          75          80

annngn 246

```

65 <210> 6

<211> 80

ES 2 300 440 T3

<212> PRT

<213> *Manduca sexta*

<220>

<221> VARIANTE

<222> 78

<223> Xaa = Cualquier Aminoácido

<400> 6

```

Met Ser Leu Ser Cys Leu Phe Leu Val Ala Leu Ala Leu Val Gly Ala
 1      5      10      15
Glu Ser Arg Tyr Ile Ala Asp Asp Val Val Leu Val Pro Met Met Val
 20      25      30
Ser Arg Val Arg Arg Asp Thr His Gly Ser Val Thr Val Asn Ser Asp
 35      40      45
Gly Thr Ser Gly Ser Val Val Lys Val Pro Phe Ala Gly Asp Asp Lys
 50      55      60
Asn Val Phe Ser Ala Ile Gly Gly Leu Asp Leu Asp Lys Xaa Leu Lys
 65      70      75      80

```

<210> 7

<211> 336

<212> ADN

<213> *Manduca sexta*

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(336)

<400> 7

```

ggc acg agg tcc ctg tgc tgc ctc ttg tta ttt gcg ctg gcg ctg atg 48
Gly Thr Arg Ser Leu Ser Cys Leu Leu Leu Phe Ala Leu Ala Leu Met
 1      5      10      15

ggc gcg gag agc aga ttc atc gcc gac gat gtg gtg ttc gta cca atg 96
Gly Ala Glu Ser Arg Phe Ile Ala Asp Asp Val Val Phe Val Pro Met
 20      25      30

gtg gta tca agg gta cgg cgc gac aca cac ggc tgc gtc acc gtc aac 144
Val Val Ser Arg Val Arg Arg Asp Thr His Gly Ser Val Thr Val Asn
 35      40      45

tcg gac ggc acc tcc gga gcg atc gtc aag gtg ccg ttc gca ggc gac 192
Ser Asp Gly Thr Ser Gly Ala Ile Val Lys Val Pro Phe Ala Gly Asp
 50      55      60

gac aag aac atc gtc agc gcc atc ggt ggc ctc gac ctc gac aag aac 240
Asp Lys Asn Ile Val Ser Ala Ile Gly Gly Leu Asp Leu Asp Lys Asn
 65      70      75      80

ctc aag atg agc ggc gcc aca gcg ggc ttg gct tac gac aac gtc aat 288
Leu Lys Met Ser Gly Ala Thr Ala Gly Leu Ala Tyr Asp Asn Val Asn
 85      90      95

gga cac ggc gct act ctt aca aac aca cat ata ccc aag ctt cgg tga 336
Gly His Gly Ala Thr Leu Thr Asn Thr His Ile Pro Lys Leu Arg *
 100      105      110

```

<210> 8

<211> 111

<212> PRT

<213> *Manduca sexta*

ES 2 300 440 T3

<400> 8

```

5      Gly Thr Arg Ser Leu Ser Cys Leu Leu Leu Phe Ala Leu Ala Leu Met
      1          5          10          15
      Gly Ala Glu Ser Arg Phe Ile Ala Asp Asp Val Val Phe Val Pro Met
      20          25          30
      Val Val Ser Arg Val Arg Arg Asp Thr His Gly Ser Val Thr Val Asn
      35          40          45
      Ser Asp Gly Thr Ser Gly Ala Ile Val Lys Val Pro Phe Ala Gly Asp
      50          55          60
10     Asp Lys Asn Ile Val Ser Ala Ile Gly Gly Leu Asp Leu Asp Lys Asn
      65          70          75          80
      Leu Lys Met Ser Gly Ala Thr Ala Gly Leu Ala Tyr Asp Asn Val Asn
      85          90          95
      Gly His Gly Ala Thr Leu Thr Asn Thr His Ile Pro Lys Leu Arg
      100         105         110

```

<210> 9

<211> 444

<212> ADN

20 <213> *Manduca sexta*

<220>

<221> CDS

25 <222> (1)...(444)

<221> rasgo_misc

<222> 123, 339, 421

30 <223> n = A, T, C o G

<400> 9

```

35     atg tcc ctg tcc tgc ctc ttg tta ttt gcg ctg gcg ctg atg ggc gcc 48
      Met Ser Leu Ser Cys Leu Leu Leu Phe Ala Leu Ala Leu Met Gly Ala
      1          5          10          15

      gag agc aga tac atc gct gac gat gtg gtg ttc gta ccg ata gtg gta 96
      Glu Ser Arg Tyr Ile Ala Asp Asp Val Val Phe Val Pro Ile Val Val
      20          25          30

40     tca agg gta cgg cgt gac aca cac ggn tcg gtc acc gtc aac tcg gac 144
      Ser Arg Val Arg Arg Asp Thr His Gly Ser Val Thr Val Asn Ser Asp
      35          40          45

      ggc acc tcc gga gcg atc gtc aag gtg ccg ttc gca ggc aac gac aag 192
      Gly Thr Ser Gly Ala Ile Val Lys Val Pro Phe Ala Gly Asn Asp Lys
      50          55          60

      aac atc gtc agc gcc atc ggc ggc ctc gac ctc gac aag aac ttc aag 240
      Asn Ile Val Ser Ala Ile Gly Gly Leu Asp Leu Asp Lys Asn Phe Lys
      65          70          75          80

50     atg agc ggc gcc aca gcg ggc ttg gca tac gac aac gtc aat aga cac 288
      Met Ser Gly Ala Thr Ala Gly Leu Ala Tyr Asp Asn Val Asn Arg His
      85          90          95

      ggg gct act ctt aca aac aca cat ata ccc agc ttc ggt gac aag ctg 336
      Gly Ala Thr Leu Thr Asn Thr His Ile Pro Ser Phe Gly Asp Lys Leu
      100         105         110

      acn gca acc ggc aag ttg aac gtg ttc caa aac gac aaa cac aac cct 384
      Thr Ala Thr Gly Lys Leu Asn Val Phe Gln Asn Asp Lys His Asn Pro
      115         120         125

60     gga cgt gaa ggg gtt ggg cac caa gga cca tgc caa nta ttc cac gcg 432

      Gly Arg Glu Gly Val Gly His Gln Gly Pro Cys Gln Xaa Phe His Ala
      130         135         140

65     tgg ccg act tca 444
      Trp Pro Thr Ser
      145

```

ES 2 300 440 T3

<210> 10

<211> 148

<212> PRT

5 <213> *Manduca sexta*

<220>

<221> VARIANTE

10 <222> 141

<223> Xaa = Cualquier Aminoácido

<400> 10

15

```

Met Ser Leu Ser Cys Leu Leu Leu Phe Ala Leu Ala Leu Met Gly Ala
 1      5      10      15
Glu Ser Arg Tyr Ile Ala Asp Asp Val Val Phe Val Pro Ile Val Val
 20      25      30
Ser Arg Val Arg Arg Asp Thr His Gly Ser Val Thr Val Asn Ser Asp
 35      40      45
Gly Thr Ser Gly Ala Ile Val Lys Val Pro Phe Ala Gly Asn Asp Lys
 50      55      60
Asn Ile Val Ser Ala Ile Gly Gly Leu Asp Leu Asp Lys Asn Phe Lys
 65      70      75      80
Met Ser Gly Ala Thr Ala Gly Leu Ala Tyr Asp Asn Val Asn Arg His
 85      90      95
Gly Ala Thr Leu Thr Asn Thr His Ile Pro Ser Phe Gly Asp Lys Leu
100      105      110
Thr Ala Thr Gly Lys Leu Asn Val Phe Gln Asn Asp Lys His Asn Pro
115      120      125
Gly Arg Glu Gly Val Gly His Gln Gly Pro Cys Gln Xaa Phe His Ala
130      135      140
Trp Pro Thr Ser
145

```

35

<210> 11

<211> 617

<212> ADN

40 <213> *Manduca sexta*

<220>

<221> CDS

45 <222> (28)...(456)

<400> 11

50

```

gaattcggca cgaggctacg ggctaca atg tct aag ttt ata tcc ata ctt tgt 54
                               Met Ser Lys Phe Ile Ser Ile Leu Cys
                               1           5

gtt gtc gcc tta ctg cta ata gca gaa act tat tgt tta aca agt ggt 102
Val Val Ala Leu Leu Leu Ile Ala Glu Thr Tyr Cys Leu Thr Ser Gly
10           15           20           25

gtt cgc atc ata caa ccc act tat agg cct cca ccc agg aga cct gtt 150
Val Arg Ile Ile Gln Pro Thr Tyr Arg Pro Pro Pro Arg Arg Pro Val
30           35           40

att tac aga gct gca cgc gac gct gga gat gaa ccc ttg tgg ctg tac 198
Ile Tyr Arg Ala Ala Arg Asp Ala Gly Asp Glu Pro Leu Trp Leu Tyr
45           50           55

```

65

ES 2 300 440 T3

```

    caa gga gac gac cac cct cga gcc cct tca agc ggc gac cat cct gta 246
    Gln Gly Asp Asp His Pro Arg Ala Pro Ser Ser Gly Asp His Pro Val
        60                65                70

5    ctg ccc tcg atc ata gac gat gtg aag ctg gac ccc aac agg cgg tat 294
    Leu Pro Ser Ile Ile Asp Asp Val Lys Leu Asp Pro Asn Arg Arg Tyr
        75                80                85

    gcg cgt agt gta agc gag cct tcg tca cag gag cat cat gac cgc ttt 342
    Ala Arg Ser Val Ser Glu Pro Ser Ser Gln Glu His His Asp Arg Phe
    10    90                95                100                105

    gcg agg agc ttc gac tcc cgc agc agc aag cat cac ggc ggc agt cac 390
    Ala Arg Ser Phe Asp Ser Arg Ser Ser Lys His His Gly Gly Ser His
        110                115                120

15    tcc acg tcc ggc ggc agc cgc gac act gga gct act cac ccg gga tac 438
    Ser Thr Ser Gly Gly Ser Arg Asp Thr Gly Ala Thr His Pro Gly Tyr
        125                130                135

    aat cgt cgt aac tca taa tttctcttca gtttctaaat atttttgttt 486
    Asn Arg Arg Asn Ser *
    20    140

    ctgctactaa ttttttctca tcaatattct tgtttgcttt caaatctttc attttatgat 546
    aataatatgt atactgatca ttatattgaa ataaatgatt aaattgaaa aaaaaaaaaa 606
    aaaaactcga g 617

```

```

25
    <210> 12
    <211> 142
    <212> PRT
30    <213> Manduca sexta

    <400> 12

```

```

35    Met Ser Lys Phe Ile Ser Ile Leu Cys Val Val Ala Leu Leu Leu Ile
        1         5         10        15
    Ala Glu Thr Tyr Cys Leu Thr Ser Gly Val Arg Ile Ile Gln Pro Thr
        20        25        30
40    Tyr Arg Pro Pro Pro Arg Arg Pro Val Ile Tyr Arg Ala Ala Arg Asp
        35        40        45
    Ala Gly Asp Glu Pro Leu Trp Leu Tyr Gln Gly Asp Asp His Pro Arg
        50        55        60
    Ala Pro Ser Ser Gly Asp His Pro Val Leu Pro Ser Ile Ile Asp Asp
        65        70        75        80
45    Val Lys Leu Asp Pro Asn Arg Arg Tyr Ala Arg Ser Val Ser Glu Pro
        85        90        95
    Ser Ser Gln Glu His His Asp Arg Phe Ala Arg Ser Phe Asp Ser Arg
        100       105       110
    Ser Ser Lys His His Gly Gly Ser His Ser Thr Ser Gly Gly Ser Arg
        115       120       125
50    Asp Thr Gly Ala Thr His Pro Gly Tyr Asn Arg Arg Asn Ser
        130       135       140

```

```

    <210> 13
55    <211> 370
    <212> ADN
    <213> Manduca sexta

60    <220>
    <221> CDS
    <222> (1)...(216)

```

65

ES 2 300 440 T3

<400> 13

```

5      cta tac tgt ctt ttg ttt ttg tgt ttc att act ttc tcc atg agt gaa   48

      Leu Tyr Cys Leu Leu Phe Leu Cys Phe Ile Thr Phe Ser Met Ser Glu
       1      5      10      15

10     gat ccg aga tgt tct cag ccg att gca tct ggt gtg tgc ttt gga aat   96
      Asp Pro Arg Cys Ser Gln Pro Ile Ala Ser Gly Val Cys Phe Gly Asn
              20      25      30

      att gaa aaa ttc gga tac gac atc gac gag cac aaa tgt gta cag ttc   144
      Ile Glu Lys Phe Gly Tyr Asp Ile Asp Glu His Lys Cys Val Gln Phe
              35      40      45

      gtg tac gga gga tgc ttt ggc aat gac aac caa ttc gac tcg ctt gaa   192
      Val Tyr Gly Gly Cys Phe Gly Asn Asp Asn Gln Phe Asp Ser Leu Glu
              50      55      60

20     gaa tgt caa gca gtt tgt cct taa ccattccgat gtttataaat gacgtgtata  246
      Glu Cys Gln Ala Val Cys Pro *
       65      70

25     taatgcaaga atgcattata gccaatcaat cgatttttaa tcgattcaga agccgttatc 306
      gattatgaca ttgctgtgca attttctaaa tatttaattt agtgttattc atattcactt 366
      tcaa                                           370

```

<210> 14

30 <211> 71

<212> PRT

<213> *Manduca sexta*

35 <400> 14

```

      Leu Tyr Cys Leu Leu Phe Leu Cys Phe Ile Thr Phe Ser Met Ser Glu
       1      5      10      15

40     Asp Pro Arg Cys Ser Gln Pro Ile Ala Ser Gly Val Cys Phe Gly Asn
              20      25      30

      Ile Glu Lys Phe Gly Tyr Asp Ile Asp Glu His Lys Cys Val Gln Phe
              35      40      45

      Val Tyr Gly Gly Cys Phe Gly Asn Asp Asn Gln Phe Asp Ser Leu Glu
              50      55      60

45     Glu Cys Gln Ala Val Cys Pro
       65      70

```

<210> 15

50 <211> 948

<212> ADN

<213> *Manduca sexta*

55 <220>

<221> CDS

<222> (23)...(208)

60

65

ES 2 300 440 T3

<400> 15

```

5      gaattcggca cgaggggttga ca atg aaa agc caa ttg caa atc gta ttg ttg 52
      Met Lys Ser Gln Leu Gln Ile Val Leu Leu
      1          5          10

      ttg ctg acg gtg atg ttt gca ata act tat gcc ggt tac tac aca aca 100
      Leu Leu Thr Val Met Phe Ala Ile Thr Tyr Ala Gly Tyr Tyr Thr Thr
      15          20          25

10     aca caa cgt cat ttt gca gta agc tgc agt caa gct tgt gaa tca gaa 148
      Thr Gln Arg His Phe Ala Val Ser Cys Ser Gln Ala Cys Glu Ser Glu
      30          35          40

15     gga agc aac tgt gaa ttg gtt aga agc tat gta tgg act tgc tat tgt 196
      Gly Ser Asn Cys Glu Leu Val Arg Ser Tyr Val Trp Thr Cys Tyr Cys
      45          50          55

20     tat tgt cca tga ttttggctat gtttccaaga acatagtttt attatatggt 248
      Tyr Cys Pro *
      60

      gtaacacgaa aggaaaataa ttattttact gaagaatatt ttacaagaa agaaataaga 308
      gacaagaaag aaaaaaaaaa aagacagtta tattttgtaa gaaggggacc tcgtgcatca 368
25     gaaaggaat gtagttaatc atttaaagga ctgtatatgt tttaaatttt tctcacgaaa 428
      tgaatctgaa gtgatttttc tgacgactac gaaaattgtc gcggacataa tatatatattc 488
      tgacaaatcc taatttgcac aggaatattt gaaagtggta tttaaagctta tgcactgcgc 548
      agtgtccttg tatataatca ttttactatt caagttgaat gaaacaattg aaatttgcac 608
      caaattgtgc tttgtaaate tcttatggtc acatcttacg gctgcatcat gtgtcaaccg 668
      agagatatatt tatcgtaata ttaagtctca cgctgggtgt tatgttttaa ttgttttagtg 728
30     tcattttacca agtacatctc taaatttcta gtttcagttt agatttttaa gcggaatatt 788
      ttaatctgta ataactacat atccttgaag gagtaggcag aggcgcaacg ctgcattccc 848
      ttttcgccgt gtgtattaca tcccatgata tgatgagggg cgagcctatc gccgtatcgg 908
      ggataaattc ccgattccgg gctgatactg agaagaaaaa 948

```

35 <210> 16

<211> 61

<212> PRT

40 <213> *Manduca sexta*

<400> 16

```

45     Met Lys Ser Gln Leu Gln Ile Val Leu Leu Leu Leu Thr Val Met Phe
      1          5          10          15
      Ala Ile Thr Tyr Ala Gly Tyr Tyr Thr Thr Thr Gln Arg His Phe Ala
      20          25          30
      Val Ser Cys Ser Gln Ala Cys Glu Ser Glu Gly Ser Asn Cys Glu Leu
      35          40          45
50     Val Arg Ser Tyr Val Trp Thr Cys Tyr Cys Tyr Cys Pro
      50          55          60

```

<210> 17

55 <211> 254

<212> PRT

<213> *Trichoplusia ni*

60

65

ES 2 300 440 T3

<400> 17

```

Met Phe Thr Tyr Lys Leu Ile Leu Gly Leu Val Leu Val Val Ser Ala
 1      5      10      15
5 Ser Ala Arg Tyr Leu Val Phe Glu Asp Leu Glu Gly Glu Ser Tyr Leu
 20      25      30
Val Pro Asn Gln Ala Glu Asp Glu Gln Val Leu Glu Gly Glu Pro Phe
 35      40      45
Tyr Glu Asn Ala Val Gln Leu Ala Ser Pro Arg Val Arg Arg Gln Ala
 50      55      60
10 Gln Gly Ser Val Thr Leu Asn Ser Asp Gly Ser Met Gly Leu Gly Ala
 65      70      75      80
Lys Val Pro Ile Val Gly Asn Glu Lys Asn Val Leu Ser Ala Leu Gly
 85      90      95
Ser Val Asp Leu Asn Asp Gln Leu Lys Pro Ala Ser Arg Gly Met Gly
100      105      110
15 Leu Ala Leu Asp Asn Val Asn Gly His Gly Leu Ser Val Met Lys Glu
115      120      125
Thr Val Pro Gly Phe Gly Asp Arg Leu Thr Gly Ala Gly Arg Val Asn
130      135      140
Val Phe His Asn Asp Asn His Asp Ile Ser Ala Lys Ala Phe Val Thr
145      150      155      160
20 Lys Asn Met Pro Asp Phe Pro Asn Val Pro Asn Phe Asn Thr Val Gly
165      170      175
Gly Gly Val Asp Tyr Met Tyr Lys Asn Lys Val Gly Ala Ser Leu Gly
180      185      190
Met Ala Asn Thr Pro Phe Leu Asp Arg Lys Asp Tyr Ser Ala Met Gly
195      200      205

Asn Leu Asn Val Phe Arg Ser Pro Thr Thr Ser Val Asp Phe Asn Ala
210      215      220
30 Gly Phe Lys Lys Phe Asp Thr Pro Val Phe Lys Ser Asn Trp Glu Pro
225      230      235      240
Asn Phe Gly Leu Thr Phe Ser Arg Ser Phe Gly Asn Lys Trp
245      250

```

<210> 18

35 <211> 233

<212> PRT

<213> *Hyalophora cecropia*

40 <400> 18

```

Met Phe Ala Lys Leu Phe Leu Val Ser Val Leu Leu Val Gly Val Asn
 1      5      10      15
45 Ser Arg Tyr Val Leu Val Glu Glu Pro Gly Tyr Tyr Asp Lys Gln Tyr
 20      25      30
Glu Glu Gln Pro Gln Gln Trp Val Asn Ser Arg Val Arg Arg Gln Ala
 35      40      45
Gly Ala Leu Thr Ile Asn Ser Asp Gly Thr Ser Gly Ala Val Val Lys
 50      55      60
50 Val Pro Ile Thr Gly Asn Glu Asn His Lys Phe Ser Ala Leu Gly Ser
 65      70      75      80
Val Asp Leu Thr Asn Gln Met Lys Leu Gly Ala Ala Thr Ala Gly Leu
 85      90      95
Ala Tyr Asp Asn Val Asn Gly His Gly Ala Thr Leu Thr Lys Thr His
100      105      110
55 Ile Pro Gly Phe Gly Asp Lys Met Thr Ala Ala Gly Lys Val Asn Leu
115      120      125
Phe His Asn Asp Asn His Asp Phe Ser Ala Lys Ala Phe Ala Thr Lys
130      135      140
Asn Met Pro Asn Ile Pro Gln Val Pro Asn Phe Asn Thr Val Gly Ala
145      150      155      160
60 Gly Val Asp Tyr Met Phe Lys Asp Lys Ile Gly Ala Ser Ala Asn Ala
165      170      175
Ala His Thr Asp Phe Ile Asn Arg Asn Asp Tyr Ser Leu Gly Gly Lys
180      185      190
Leu Asn Leu Phe Lys Thr Pro Thr Thr Ser Leu Asp Phe Asn Ala Gly
195      200      205
65 Trp Lys Lys Phe Asp Thr Pro Phe Phe Lys Ser Ser Trp Glu Pro Ser
210      215      220
Thr Ser Phe Ser Phe Ser Lys Tyr Phe
225      230

```

ES 2 300 440 T3

<210> 19

<211> 235

<212> PRT

5 <213> *Hyalophora cecropia*

<400> 19

```

10      Met Phe Gly Lys Ile Val Phe Leu Leu Leu Val Ala Leu Cys Ala Gly
        1           5           10           15
Val Gln Ser Arg Tyr Leu Ile Val Ser Glu Pro Val Tyr Tyr Ile Glu
        20           25           30
His Tyr Glu Glu Pro Glu Leu Leu Ala Ser Ser Arg Val Arg Arg Asp
        35           40           45
Ala His Gly Ala Leu Thr Leu Asn Ser Asp Gly Thr Ser Gly Ala Val
        50           55           60
15      Val Lys Val Pro Phe Ala Gly Asn Asp Lys Asn Ile Val Ser Ala Ile
        65           70           75           80
Gly Ser Val Asp Leu Thr Asp Arg Gln Lys Leu Gly Ala Ala Thr Ala
        85           90           95
Gly Val Ala Leu Asp Asn Ile Asn Gly His Gly Leu Ser Leu Thr Asp
        100          105          110
20      Thr His Ile Pro Gly Phe Gly Asp Lys Met Thr Ala Ala Gly Lys Val
        115          120          125
Asn Val Phe His Asn Asp Asn His Asp Ile Thr Ala Lys Ala Phe Ala
        130          135          140
25      Thr Arg Asn Met Pro Asp Ile Ala Asn Val Pro Asn Phe Asn Thr Val
        145          150          155          160
Gly Gly Gly Ile Asp Tyr Met Phe Lys Asp Lys Ile Gly Ala Ser Ala
        165          170          175
Ser Ala Ala His Thr Asp Phe Ile Asn Arg Asn Asp Tyr Ser Leu Asp
        180          185          190
30      Gly Lys Leu Asn Leu Phe Lys Thr Pro Asp Thr Ser Ile Asp Phe Asn
        195          200          205
Ala Gly Phe Lys Lys Phe Asp Thr Pro Phe Met Lys Ser Ser Trp Glu
        210          215          220
Pro Asn Phe Gly Phe Ser Leu Ser Lys Tyr Phe
        225          230          235

```

35 <210> 20

<211> 214

<212> PRT

40 <213> *Bombyx mori*

<400> 20

```

45      Met Ser Lys Ser Val Ala Leu Leu Leu Leu Cys Ala Cys Leu Ala Ser
        1           5           10           15
Gly Arg His Val Pro Thr Arg Ala Arg Arg Gln Ala Gly Ser Phe Thr
        20           25           30
Val Asn Ser Asp Gly Thr Ser Gly Ala Ala Leu Lys Val Pro Leu Thr
        35           40           45
Gly Asn Asp Lys Asn Val Leu Ser Ala Ile Gly Ser Ala Asp Phe Asn
        50           55           60
50      Asp Arg His Lys Leu Ser Ala Ala Ser Ala Gly Leu Ala Leu Asp Asn
        65           70           75           80
Val Asn Gly His Gly Leu Ser Leu Thr Gly Thr Arg Ile Pro Gly Phe
        85           90           95
Gly Glu Gln Leu Gly Val Ala Gly Lys Val Asn Leu Phe His Asn Asn
        100          105          110
55      Asn His Asp Leu Ser Ala Lys Ala Phe Ala Ile Arg Asn Ser Pro Ser
        115          120          125
Ala Ile Pro Asn Ala Pro Asn Phe Asn Thr Leu Gly Gly Gly Val Asp
        130          135          140
60      Tyr Met Phe Lys Gln Lys Val Gly Ala Ser Leu Ser Ala Ala His Ser
        145          150          155          160
Asp Val Ile Asn Arg Asn Asp Tyr Ser Ala Gly Gly Lys Leu Asn Leu
        165          170          175
Phe Arg Ser Pro Ser Ser Ser Leu Asp Phe Asn Ala Gly Phe Lys Lys
        180          185          190
65      Phe Asp Thr Pro Phe Tyr Arg Ser Ser Trp Glu Pro Asn Val Gly Phe
        195          200          205
Ser Phe Ser Lys Phe Phe
        210

```

ES 2 300 440 T3

<210> 21

<211> 326

<212> ADN

5 <213> *Manduca sexta*

<220>

<221> CDS

10 <222> (1)...(177)

<400> 21

```

15      atg agt gaa gat ccg aga tgt tct cag ccg att gca tct ggt gtg tgc   48
      Met Ser Glu Asp Pro Arg Cys Ser Gln Pro Ile Ala Ser Gly Val Cys

          1             5             10             15

20      ttt gga aat att gaa aaa ttc gga tac gac atc gac gag cac aaa tgt   96
      Phe Gly Asn Ile Glu Lys Phe Gly Tyr Asp Ile Asp Glu His Lys Cys
                20             25             30

25      gta cag ttc gtg tac gga gga tgc ttt ggc aat gat aac caa ttc gac   144
      Val Gln Phe Val Tyr Gly Gly Cys Phe Gly Asn Asp Asn Gln Phe Asp
                35             40             45

      tcg ctt gaa gaa tgt caa gca gtt tgt cct taa ccattccaat gttataaat 197
      Ser Leu Glu Glu Cys Gln Ala Val Cys Pro  *
                50             55

30      gacgtgtata taatacacac aataatcaat cgatttttaa tcgattcaga agccgttatc 257
      tattactaaa ttgctgtgca attttataaa tatttaattt agtggttatta atattcactt 317
      tcaaaaata                                     326

```

<210> 22

35 <211> 58

<212> PRT

<213> *Manduca sexta*

40 <400> 22

```

      Met Ser Glu Asp Pro Arg Cys Ser Gln Pro Ile Ala Ser Gly Val Cys
          1             5             10             15
45      Phe Gly Asn Ile Glu Lys Phe Gly Tyr Asp Ile Asp Glu His Lys Cys
                20             25             30
      Val Gln Phe Val Tyr Gly Gly Cys Phe Gly Asn Asp Asn Gln Phe Asp
                35             40             45
      Ser Leu Glu Glu Cys Gln Ala Val Cys Pro
                50             55

```

50 <210> 23

<211> 58

<212> PRT

55 <213> *Manduca sexta*

<400> 23

```

      Met Ser Glu Asp Pro Arg Cys Ser Gln Pro Ile Ala Ser Gly Val Cys
          1             5             10             15
60      Phe Gly Asn Ile Glu Lys Phe Gly Tyr Asp Ile Asp Glu His Lys Cys
                20             25             30
      Val Gln Phe Val Tyr Gly Gly Cys Phe Gly Asn Asp Asn Gln Phe Asp
                35             40             45
      Ser Leu Glu Glu Cys Gln Ala Val Cys Pro
                50             55

```

65 <210> 24

<211> 365

ES 2 300 440 T3

<212> ADN

<213> *Heliothis virescens*

5 <220>

<221> CDS

<222> (1)...(192)

10 <400> 24

```
atg aat ttc tcg cgg ata ttt ttc ttc gtg ttc gcg tgt ttg gta gca 48
Met Asn Phe Ser Arg Ile Phe Phe Phe Val Phe Ala Cys Leu Val Ala
1 5 10 15
```

```
gtg tgc agc gtg tcg gcg gcg cct gag ccg agg tgg aag gtc ttc aag 96
Val Cys Ser Val Ser Ala Ala Pro Glu Pro Arg Trp Lys Val Phe Lys
```

```
20 25 30
aaa att gag aag atg ggt cgc aac ata agg gac ggt gtc atc aaa gct 144
Lys Ile Glu Lys Met Gly Arg Asn Ile Arg Asp Gly Val Ile Lys Ala
35 40 45
```

```
gcg cca gct atc gaa gtc ctg ggc cag gct aaa gct ctt gga aaa tag 192
Ala Pro Ala Ile Glu Val Leu Gly Gln Ala Lys Ala Leu Gly Lys *
50 55 60
```

```
atcttaacta ttaaggaata acgttcaaag tattataagt gttcattacc tcgaatatca 252
aagaatatct tatgtatttt ttttttttgt aaatattttt gcgtttattt tatgtaatac 312
tcagagtgca tgcaattaaa ttgttttaaa gcgttaaaaa aaaaaaaaaa aaa 365
```

30

<210> 25

<211> 63

<212> PRT

35 <213> *Heliothis virescens*

<400> 25

```
Met Asn Phe Ser Arg Ile Phe Phe Phe Val Phe Ala Cys Leu Val Ala
1 5 10 15
Val Cys Ser Val Ser Ala Ala Pro Glu Pro Arg Trp Lys Val Phe Lys
20 25 30
Lys Ile Glu Lys Met Gly Arg Asn Ile Arg Asp Gly Val Ile Lys Ala
35 40 45
Ala Pro Ala Ile Glu Val Leu Gly Gln Ala Lys Ala Leu Gly Lys
50 55 60
```

<210> 26

<211> 63

50 <212> PRT

<213> *Heliothis virescens*

<400> 26

```
Met Asn Phe Ser Arg Ile Phe Phe Phe Val Phe Ala Cys Leu Val Ala
1 5 10 15
Val Cys Ser Val Ser Ala Ala Pro Glu Pro Arg Trp Lys Val Phe Lys
20 25 30
Lys Ile Glu Lys Met Gly Arg Asn Ile Arg Asp Gly Val Ile Lys Ala
35 40 45
Ala Pro Ala Ile Glu Val Leu Gly Gln Ala Lys Ala Leu Gly Lys
50 55 60
```

<210> 27

65 <211> 600

<212> ADN

<213> *Manduca sexta*

ES 2 300 440 T3

<220>

<221> CDS

<222> (36)...(464)

5

<400> 27

```

actagtggat cccccgggct gcaggacggg ctaca atg tct aag ttt ata tcc 53
                                     Met Ser Lys Phe Ile Ser
                                     1           5
10
ata ctt tgt gtt gtc gcc tta ctg cta ata gca gaa act tat tgt tta 101
Ile Leu Cys Val Val Ala Leu Leu Leu Ile Ala Glu Thr Tyr Cys Leu
                                     10           15           20
15
aca agt ggt gtt cgc atc ata caa ccc act tat agg cct cca ccc agg 149
Thr Ser Gly Val Arg Ile Ile Gln Pro Thr Tyr Arg Pro Pro Pro Arg
                                     25           30           35
20
aga cct gtt att tac aga gct gca cgc gac gct gga gat gaa ccc ttg 197
Arg Pro Val Ile Tyr Arg Ala Ala Arg Asp Ala Gly Asp Glu Pro Leu
                                     40           45           50
25
tgg ctg tac caa gga gac gac cac cct cga gcc cct tca agc ggc gac 245
Trp Leu Tyr Gln Gly Asp Asp His Pro Arg Ala Pro Ser Ser Gly Asp
                                     55           60           65           70
30
cat cct gta ctg ccc tcg atc ata gac gat gtg aag ctg gac ccc aac 293
His Pro Val Leu Pro Ser Ile Ile Asp Asp Val Lys Leu Asp Pro Asn
                                     75           80           85
35
agg cgg tat gcg cgt agt gta agc gag cct tcg tca cag gag cat cat 341
Arg Arg Tyr Ala Arg Ser Val Ser Glu Pro Ser Ser Gln Glu His His
                                     90           95           100
40
gac cgc ttt gcg agg agc ttc gac tcc cgc agc agc aag cat cac ggc 389
Asp Arg Phe Ala Arg Ser Phe Asp Ser Arg Ser Ser Lys His His Gly
                                     105           110           115
45
ggc agt cac tcc acg tcc ggc ggc agc cgc gac act gga gct act cac 437
Gly Ser His Ser Thr Ser Gly Gly Ser Arg Asp Thr Gly Ala Thr His
                                     120           125           130
50
tcg gga tac aat cgt cgt aac tca taa tttctcttca gtttctaaat 484
Ser Gly Tyr Asn Arg Arg Asn Ser *
                                     135           140
55
atTTTTgTtTt ctGctactaa ttttttctca tcaatattct tgtttgcttt caaatctttc 544
atTTtatgat aataatatgt atactgatca ttatattgaa ataatgatt aaattg 600

```

<210> 28

<211> 142

45

<212> PRT

<213> *Manduca sexta*

50

<400> 28

```

Met Ser Lys Phe Ile Ser Ile Leu Cys Val Val Ala Leu Leu Ile
1           5           10           15
55
Ala Glu Thr Tyr Cys Leu Thr Ser Gly Val Arg Ile Ile Gln Pro Thr
20           25           30
Tyr Arg Pro Pro Pro Arg Arg Pro Val Ile Tyr Arg Ala Ala Arg Asp
35           40           45
Ala Gly Asp Glu Pro Leu Trp Leu Tyr Gln Gly Asp Asp His Pro Arg
50           55           60
60
Ala Pro Ser Ser Gly Asp His Pro Val Leu Pro Ser Ile Ile Asp Asp
65           70           75           80
Val Lys Leu Asp Pro Asn Arg Arg Tyr Ala Arg Ser Val Ser Glu Pro
85           90           95
Ser Ser Gln Glu His His Asp Arg Phe Ala Arg Ser Phe Asp Ser Arg
100           105           110
65
Ser Ser Lys His His Gly Gly Ser His Ser Thr Ser Gly Gly Ser Arg
115           120           125
Asp Thr Gly Ala Thr His Ser Gly Tyr Asn Arg Arg Asn Ser
130           135           140

```

ES 2 300 440 T3

<210> 29

<211> 142

<212> PRT

5 <213> *Manduca sexta*

<400> 29

```

10      Met Ser Lys Phe Ile Ser Ile Leu Cys Val Val Ala Leu Leu Ile

      1           5           10           15
Ala Glu Thr Tyr Cys Leu Thr Ser Gly Val Arg Ile Ile Gln Pro Thr
      20           25           30
15 Tyr Arg Pro Pro Arg Arg Pro Val Ile Tyr Arg Ala Ala Arg Asp
      35           40           45
Ala Gly Asp Glu Pro Leu Trp Leu Tyr Gln Gly Asp Asp His Pro Arg
      50           55           60
20 Ala Pro Ser Ser Gly Asp His Pro Val Leu Pro Ser Ile Ile Asp Asp
      65           70           75           80
Val Lys Leu Asp Pro Asn Arg Arg Tyr Ala Arg Ser Val Ser Glu Pro
      85           90           95
25 Ser Ser Gln Glu His His Asp Arg Phe Ala Arg Ser Phe Asp Ser Arg
      100          105          110
Ser Ser Lys His His Gly Gly Ser His Ser Thr Ser Gly Gly Ser Arg
      115          120          125
Asp Thr Gly Ala Thr His Ser Gly Tyr Asn Arg Arg Asn Ser
      130          135          140

```

<210> 30

30 <211> 360

<212> DNA

<213> *Ostrinia nubilalis*

35 <220>

<221> CDS

<222> (1)...(201)

40 <400> 30

```

      atg aac ttc tcc aaa att ttg ttc gct gtg ttc gct atc ttc atg gct 48
Met Asn Phe Ser Lys Ile Leu Phe Ala Val Phe Ala Ile Phe Met Ala
      1           5           10           15

45 ttt gcc gcg gta tcc gct gca ccc aac cct aga tgg aat cct ttt aag 96
Phe Ala Ala Val Ser Ala Ala Pro Asn Pro Arg Trp Asn Pro Phe Lys
      20           25           30

      aaa ctg gag cgt gtg ggc cag aac atc cgt gac ggg atc atc aaa gca 144
Lys Leu Glu Arg Val Gly Gln Asn Ile Arg Asp Gly Ile Ile Lys Ala
      35           40           45

      gct cca gca gtt gca gtg gtg ggc caa gct gcc acc ata tac aag ggc 192
Ala Pro Ala Val Ala Val Val Gly Gln Ala Ala Thr Ile Tyr Lys Gly
      50           55           60

55 ggg aaa taa ataactacat catcatcatc gtcacatcatca tcatcatctg 241
Gly Lys *
      65

      tgacgccaaa agatgcttat atatgctgct ggggatatga cttcatgtgg acaagcatct 301
      ttactaactt ttgtatata attttgtacc aaaaatggta tggtaaagtt atgaaacgt 360

```

<210> 31

<211> 66

65 <212> PRT

<213> *Ostrinia nubilalis*

ES 2 300 440 T3

<400> 31

```

5      Met Asn Phe Ser Lys Ile Leu Phe Ala Val Phe Ala Ile Phe Met Ala
      1      5      10      15
      Phe Ala Ala Val Ser Ala Ala Pro Asn Pro Arg Trp Asn Pro Phe Lys
      20      25      30
      Lys Leu Glu Arg Val Gly Gln Asn Ile Arg Asp Gly Ile Ile Lys Ala
      35      40      45
      Ala Pro Ala Val Ala Val Val Gly Gln Ala Ala Thr Ile Tyr Lys Gly
10      50      55      60
      Gly Lys
      65

```

15 <210> 32

<211> 66

<212> PRT

<213> *Ostrinia nubilalis*

20

<400> 32

```

25      Met Asn Phe Ser Lys Ile Leu Phe Ala Val Phe Ala Ile Phe Met Ala
      1      5      10      15
      Phe Ala Ala Val Ser Ala Ala Pro Asn Pro Arg Trp Asn Pro Phe Lys
      20      25      30
      Lys Leu Glu Arg Val Gly Gln Asn Ile Arg Asp Gly Ile Ile Lys Ala
      35      40      45
      Ala Pro Ala Val Ala Val Val Gly Gln Ala Ala Thr Ile Tyr Lys Gly
30      50      55      60
      Gly Lys
      65

```

35 <210> 33

<211> 407

<212> DNA

<213> *Ostrinia nubilalis*

40

<220>

<221> CDS

<222> (3)...(281)

45

<221> rasgo_misc

<222> 378

<223> n = A, T, C o G

50

55

60

65

ES 2 300 440 T3

<400> 33

```

5      gg cac cag gta gtg ttg tgt tcc ctg gcc gcc gtg ctt ctg gcg ttc      47
        His Gln Val Val Leu Cys Ser Leu Ala Ala Val Leu Leu Ala Phe
        1          5          10          15

10     gtc gct gaa tcg tca gcg cag cgt ttc atc cag ccg acc tac agg ccg      95
        Val Ala Glu Ser Ser Ala Gln Arg Phe Ile Gln Pro Thr Tyr Arg Pro
        20          25          30

10     ccg cct caa cga cca ccg aag ata tac aga ctg cga aga gat gca ggc      143
        Pro Pro Gln Arg Pro Pro Lys Ile Tyr Arg Leu Arg Arg Asp Ala Gly
        35          40          45

15     gaa ccg cta tgg ctg tac caa ggt gat gat gtt cag cga gcc cca gcc      191
        Glu Pro Leu Trp Leu Tyr Gln Gly Asp Asp Val Gln Arg Ala Pro Ala
        50          55          60

20     acc ggc gac cat cct tac ctt ccg cca aac atc gac gac atc cat cta      239
        Thr Gly Asp His Pro Tyr Leu Pro Pro Asn Ile Asp Asp Ile His Leu
        65          70          75

20     gac ccc aac acc aag ata cgc tcg cag cgt cga ctc tcc tag      281
        Asp Pro Asn Thr Lys Ile Arg Ser Gln Arg Arg Leu Ser *
        80          85          90

25     cgctaagcgt ggaggaggca gccacagcac ctccagtggg aagcaaggga cactggcgca 341
        acgcaccccg ggggtacaatc ggccgcaacg cccgaangca taagattcga ccccatctcc 401
        ccggct                                     407

```

<210> 34

<211> 90

30 <212> PRT

<213> *Ostrinia nubilalis*

<400> 34

```

35
        Val Val Leu Cys Ser Leu Ala Ala Val Leu Leu Ala Phe Val Ala Glu
        1          5          10          15
        Ser Ser Ala Gln Arg Phe Ile Gln Pro Thr Tyr Arg Pro Pro Pro Gln
        20          25          30
        Arg Pro Pro Lys Ile Tyr Arg Leu Arg Arg Asp Ala Gly Glu Pro Leu
        35          40          45
        Trp Leu Tyr Gln Gly Asp Asp Val Gln Arg Ala Pro Ala Thr Gly Asp
        50          55          60
        His Pro Tyr Leu Pro Pro Asn Ile Asp Asp Ile His Leu Asp Pro Asn
        65          70          75          80
        Thr Lys Ile Arg Ser Gln Arg Arg Leu Ser
        85          90

```

<210> 35

<211> 92

50 <212> PRT

<213> *Ostrinia nubilalis*

<400> 35

```

55
        His Gln Val Val Leu Cys Ser Leu Ala Ala Val Leu Leu Ala Phe Val
        1          5          10          15
        Ala Glu Ser Ser Ala Gln Arg Phe Ile Gln Pro Thr Tyr Arg Pro Pro
        20          25          30
        Pro Gln Arg Pro Pro Lys Ile Tyr Arg Leu Arg Arg Asp Ala Gly Glu
        35          40          45
        Pro Leu Trp Leu Tyr Gln Gly Asp Asp Val Gln Arg Ala Pro Ala Thr
        50          55          60
        Gly Asp His Pro Tyr Leu Pro Pro Asn Ile Asp Asp Ile His Leu Asp
        65          70          75          80
        Pro Asn Thr Lys Ile Arg Ser Gln Arg Arg Leu Ser
        85          90

```

ES 2 300 440 T3

<210> 36

<211> 362

<212> ADN

5 <213> *Ostrinia nubilalis*

<220>

<221> CDS

10 <222> (1) ... (252)

<400> 36

```

15      atg ttc aaa tta agt ttt att att ttc atg ttg gtg gcc att gcg agc   48
      Met Phe Lys Leu Ser Phe Ile Ile Phe Met Leu Val Ala Ile Ala Ser
        1             5             10             15

      gtt tta agc agt gaa gcc cca gcc cca gac tgc acc tcg cct ctt gag   96
      Val Leu Ser Ser Glu Ala Pro Ala Pro Asp Cys Thr Ser Pro Leu Glu
        20             25             30

      acc gga cca tgc aga ggc agg aaa gtt gct ttc ggc tac gat act gac   144
      Thr Gly Pro Cys Arg Gly Arg Lys Val Ala Phe Gly Tyr Asp Thr Asp
        35             40             45

25      ttg gaa gga tgc aaa cag ttc atc tac gga gga tgt gac ggc aac ggc   192
      Leu Glu Gly Cys Lys Gln Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Asp Gly Asn Gly
        50             55             60

      aac cgt tac aac act cta gag gag tgt cag gct gct tgc gag agt gac   240

      Asn Arg Tyr Asn Thr Leu Glu Glu Cys Gln Ala Ala Cys Glu Ser Asp
        65             70             75             80

35      tgc aac aaa taa taacgaaatg caagcaatca attgggtatt tgacagcaca   292
      Cys Asn Lys *

      gtcaattgac atactttttt taaactgtca aaacgcaaca ttccctatatt ttcacatttt 352
      gcaaagtaga                                     362

```

<210> 37

<211> 83

<212> PRT

45 <213> *Ostrinia nubilalis*

<400> 37

```

50      Met Phe Lys Leu Ser Phe Ile Ile Phe Met Leu Val Ala Ile Ala Ser
        1             5             10             15
      Val Leu Ser Ser Glu Ala Pro Ala Pro Asp Cys Thr Ser Pro Leu Glu
        20             25             30
      Thr Gly Pro Cys Arg Gly Arg Lys Val Ala Phe Gly Tyr Asp Thr Asp
        35             40             45
55      Leu Glu Gly Cys Lys Gln Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Asp Gly Asn Gly
        50             55             60
      Asn Arg Tyr Asn Thr Leu Glu Glu Cys Gln Ala Ala Cys Glu Ser Asp
        65             70             75             80
60      Cys Asn Lys

```

<210> 38

<211> 83

<212> PRT

65 <213> *Ostrinia nubilalis*

ES 2 300 440 T3

<400> 38

```

Met Phe Lys Leu Ser Phe Ile Ile Phe Met Leu Val Ala Ile Ala Ser
 1          5          10          15
Val Leu Ser Ser Glu Ala Pro Ala Pro Asp Cys Thr Ser Pro Leu Glu
 20          25          30
Thr Gly Pro Cys Arg Gly Arg Lys Val Ala Phe Gly Tyr Asp Thr Asp
 35          40          45
Leu Glu Gly Cys Lys Gln Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Asp Gly Asn Gly
 50          55          60
Asn Arg Tyr Asn Thr Leu Glu Glu Cys Gln Ala Cys Glu Ser Asp
 65          70          75          80
Cys Asn Lys

```

<210> 39

15 <211> 242

<212> ADN

<213> *Ostrinia nubilalis*

20 <220>

<221> CDS

<222> (1)...(201)

25 <400> 39

```

atg aat ttc tcc aaa att ctt ttc gcg atc ttc gct tgt ttc atg gcg 48
Met Asn Phe Ser Lys Ile Leu Phe Ala Ile Phe Ala Cys Phe Met Ala
 1          5          10          15

ttc gcc gcc gtg tca gct gct cct gaa cca aga tgg aac ccg ttt aag 96
Phe Ala Ala Val Ser Ala Ala Pro Glu Pro Arg Trp Asn Pro Phe Lys
          20          25          30

aaa ctt gag cga gtg ggc cag aac atc cga gac ggc atc gtg aag gca 144
Lys Leu Glu Arg Val Gly Gln Asn Ile Arg Asp Gly Ile Val Lys Ala
          35          40          45

caa cca gct atc caa gta gtg gga gaa gcg gct aca ata tac aga ggt 192
Gln Pro Ala Ile Gln Val Val Gly Glu Ala Ala Thr Ile Tyr Arg Gly
          50          55          60

ggg aaa taa ttaccacat agcaaacatc gtctagttaa aaaatcgaat 241
Gly Lys *
65

a 242

```

<210> 40

<211> 66

50 <212> PRT

<213> *Ostrinia nubilalis*

<400> 40

```

Met Asn Phe Ser Lys Ile Leu Phe Ala Ile Phe Ala Cys Phe Met Ala
 1          5          10          15
Phe Ala Ala Val Ser Ala Ala Pro Glu Pro Arg Trp Asn Pro Phe Lys
 20          25          30
Lys Leu Glu Arg Val Gly Gln Asn Ile Arg Asp Gly Ile Val Lys Ala
 35          40          45
Gln Pro Ala Ile Gln Val Val Gly Glu Ala Ala Thr Ile Tyr Arg Gly
 50          55          60
Gly Lys
65

```

65 <210> 41

<211> 63

ES 2 300 440 T3

<212> PRT

<213> *Ostrinia nubilalis*

5 <400> 41

```

Met Asn Phe Ser Lys Ile Leu Phe Ala Ile Phe Ala Cys Phe Met Ala
1      5      10      15
Phe Ala Ala Val Ser Ala Ala Pro Glu Pro Arg Trp Asn Pro Phe Lys
20      25      30
Lys Leu Glu Arg Val Gly Gln Asn Ile Arg Asp Gly Ile Val Lys Ala
35      40      45
Gln Pro Ala Ile Gln Val Val Gly Glu Ala Ala Thr Ile Tyr Arg
50      55      60

```

<210> 42

15 <211> 471

<212> DNA

<213> *Ostrinia nubilalis*

20

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(198)

25

<400> 42

```

atg aaa ttt tca aag gtt ttc ttc gtt ttc ttc gca ttc gtg gct gcg 48
Met Lys Phe Ser Lys Val Phe Phe Val Phe Phe Ala Phe Val Ala Ala
1      5      10      15

ttt gcg acg gtc acc gct tcg cca ttc aac tta ggg aag gaa ctg gaa 96
Phe Ala Thr Val Thr Ala Ser Pro Phe Asn Leu Gly Lys Glu Leu Glu
20      25      30

gga atc ggc cag aga gtg agg gac agc atc atc agt gcc cga ccg gct 144
Gly Ile Gly Gln Arg Val Arg Asp Ser Ile Ile Ser Ala Arg Pro Ala
35      40      45

gtt gac acc atc ttg gaa gcc cag aag ata ttc aag gga ggc gac aaa 192
Val Asp Thr Ile Leu Glu Ala Gln Lys Ile Phe Lys Gly Gly Asp Lys
50      55      60

gac tga acgaaatgac gtcataattt aaatacaaatt attttttttaa gttagtttta 248
Asp *
65

caacataaaa cgtaataacc tacgtacggt tgaggaaaaa ctcattagat tattattcat 308
gtaaattatg tagattagca aaagagaatt tcaaattacc tttgtttgga actcggattc 368
tgtgatataa tatatgttta ttttaaagta tttagttgta tctattttta ttttcacagt 428
cagcacattt cctaattaat ttggaacttt gaattagagt aag 471

```

50 <210> 43

<211> 65

<212> PRT

55 <213> *Ostrinia nubilalis*

<400> 43

```

Met Lys Phe Ser Lys Val Phe Phe Val Phe Phe Ala Phe Val Ala Ala
1      5      10      15
Phe Ala Thr Val Thr Ala Ser Pro Phe Asn Leu Gly Lys Glu Leu Glu
20      25      30
Gly Ile Gly Gln Arg Val Arg Asp Ser Ile Ile Ser Ala Arg Pro Ala
35      40      45
Val Asp Thr Ile Leu Glu Ala Gln Lys Ile Phe Lys Gly Gly Asp Lys
50      55      60
Asp
65

```

ES 2 300 440 T3

<210> 44

<211> 60

<212> PRT

5 <213> *Ostrinia nubilalis*

<400> 44

```

10      Met Lys Phe Ser Lys Val Phe Phe Val Phe Phe Ala Phe Val Ala Ala
        1      5      10      15
      Phe Ala Thr Val Thr Ala Ser Pro Phe Asn Leu Gly Lys Glu Leu Glu
        20      25      30
      Gly Ile Gly Gln Arg Val Arg Asp Ser Ile Ile Ser Ala Arg Pro Ala
        35      40      45
15      Val Asp Thr Ile Leu Glu Ala Gln Lys Ile Phe Lys
        50      55      60

```

<210> 45

20 <211> 464

<212> ADN

<213> *Ostrinia nubilalis*

25 <220>

<221> CDS

<222> (1)...(464)

30 <400> 45

```

      atg caa cga gta gtg ttg tgt tcc ctg gcc gcc gtg ctc ctg gcg ttc 48
35      Met Gln Arg Val Val Leu Cys Ser Leu Ala Ala Val Leu Leu Ala Phe
        1      5      10      15

      gtc gct gaa tgc tca gcg cag cgt ttc atc cag ccg acc tac agg ccg 96
      Val Ala Glu Ser Ser Ala Gln Arg Phe Ile Gln Pro Thr Tyr Arg Pro
        20      25      30

40      ccg cct caa cga cca ccg aag ata tac aga ctg cga aga gat gca ggc 144
      Pro Pro Gln Arg Pro Pro Lys Ile Tyr Arg Leu Arg Arg Asp Ala Gly
        35      40      45

      gaa ccg cta tgg ctg tac caa ggt gat gat gtt cag cga gcg cca gcc 192
45      Glu Pro Leu Trp Leu Tyr Gln Gly Asp Asp Val Gln Arg Ala Pro Ala
        50      55      60

      acc ggt gac cac cct tac ctg ccg cca aac atc gac gac atc cat cta 240
      Thr Gly Asp His Pro Tyr Leu Pro Pro Asn Ile Asp Asp Ile His Leu
        65      70      75      80

50      gac ccc aac acc aga tac gct cgc agc gtc gac tct cct agc gct aag 288
      Asp Pro Asn Thr Arg Tyr Ala Arg Ser Val Asp Ser Pro Ser Ala Lys
        85      90      95

      cgt gga gga ggc agc cac agc acc tcc agt gga agc agg gat act ggc 336
55      Arg Gly Gly Gly Ser His Ser Thr Ser Ser Gly Ser Arg Asp Thr Gly
        100      105      110

      gcc acg cac ccc ggg tac aat cgc cgc aac gcc cga agc ata aga ttc 384
60      Ala Thr His Pro Gly Tyr Asn Arg Arg Asn Ala Arg Ser Ile Arg Phe
        115      120      125

      gac cct atc tct ccg ctg ccg tcc ccg act ttc cct aaa cca ttc gac 432
      Asp Pro His Ser Pro Leu Pro Ser Pro Thr Phe Pro Lys Pro Phe Asp
        130      135      140

65      ccg ttc aac ccc ccg cct gtt tcg ccc acc ag 464
      Pro Phe Asn Pro Arg Pro Val Ser Pro Thr
        145      150

```

ES 2 300 440 T3

<210> 46

<211> 154

<212> PRT

5 <213> *Ostrinia nubilalis*

<400> 46

```

10      Met Gln Arg Val Val Leu Cys Ser Leu Ala Ala Val Leu Leu Ala Phe
        1      5      10      15
      Val Ala Glu Ser Ser Ala Gln Arg Phe Ile Gln Pro Thr Tyr Arg Pro
        20      25      30
      Pro Pro Gln Arg Pro Pro Lys Ile Tyr Arg Leu Arg Arg Asp Ala Gly
        35      40      45
15      Glu Pro Leu Trp Leu Tyr Gln Gly Asp Asp Val Gln Arg Ala Pro Ala
        50      55      60
      Thr Gly Asp His Pro Tyr Leu Pro Pro Asn Ile Asp Asp Ile His Leu
        65      70      75      80
      Asp Pro Asn Thr Arg Tyr Ala Arg Ser Val Asp Ser Pro Ser Ala Lys
        85      90      95
20      Arg Gly Gly Gly Ser His Ser Thr Ser Ser Gly Ser Arg Asp Thr Gly
        100      105      110
      Ala Thr His Pro Gly Tyr Asn Arg Arg Asn Ala Arg Ser Ile Arg Phe
        115      120      125
      Asp Pro Ile Ser Pro Leu Pro Ser Pro Thr Phe Pro Lys Pro Phe Asp
        130      135      140
25      Pro Phe Asn Pro Arg Pro Val Ser Pro Thr
        145      150

```

<210> 47

<211> 181

<212> PRT

30 <213> *Ostrinia nubilalis*

<220>

35 <221> VARIANTE

<222> 155

<223> Xaa = Cualquier Aminoácido

40 <400> 47

```

45      Met Gln Arg Val Val Leu Cys Ser Leu Ala Ala Val Leu Leu Ala Phe
        1      5      10      15
      Val Ala Glu Ser Ser Ala Gln Arg Phe Ile Gln Pro Thr Tyr Arg Pro
        20      25      30
      Pro Pro Gln Arg Pro Pro Lys Ile Tyr Arg Leu Arg Arg Asp Ala Gly
        35      40      45
      Glu Pro Leu Trp Leu Tyr Gln Gly Asp Asp Val Gln Arg Ala Pro Ala
        50      55      60
      Thr Gly Asp His Pro Tyr Leu Pro Pro Asn Ile Asp Asp Ile His Leu
        65      70      75      80
      Asp Pro Asn Thr Arg Tyr Ala Arg Ser Val Asp Ser Pro Ser Ala Lys
        85      90      95
50      Arg Gly Gly Gly Ser His Ser Thr Ser Ser Gly Ser Arg Asp Thr Gly
        100      105      110
      Ala Thr His Pro Gly Tyr Asn Arg Arg Asn Ala Arg Ser Ile Arg Phe
        115      120      125
55      Asp Pro Ile Ser Pro Leu Pro Ser Pro Thr Phe Pro Lys Pro Phe Asp
        130      135      140
      Pro Phe Asn Pro Arg Pro Val Ser Pro Thr Xaa Pro Phe Pro Leu Tyr
        145      150      155      160
      Ala Arg Ser Arg Arg Asp Ile Gln Phe Pro Gln Lys Pro Lys His His
        165      170      175
60      Asp Ile Val Leu Thr
        180

```

<210> 48

<211> 538

65 <212> ADN

<213> *Heliothis virescens*

ES 2 300 440 T3

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(432)

5

<400> 48

```

10      atg gca aaa tcc att ttc gcg ctt gga gtt atc gca gtt ctg ttg ata 48
      Met Ala Lys Ser Ile Phe Ala Leu Gly Val Ile Ala Val Leu Leu Ile
      1          5          10          15

      aca gaa tcc aac tgt tgg aga agt gat ctc cct atc ata ctc ccg act 96
      Thr Glu Ser Asn Cys Trp Arg Ser Asp Leu Pro Ile Ile Leu Pro Thr
      20          25          30

15      tat aaa cct cct cgt acc ccg agc acc gtt att atc agg aca gta cgc 144
      Tyr Lys Pro Pro Arg Thr Pro Ser Thr Val Ile Ile Arg Thr Val Arg
      35          40          45

20      gaa gcc gga gat aaa ccg tta tgg ctc tac caa gga gac gat cac ccg 192
      Glu Ala Gly Asp Lys Pro Leu Trp Leu Tyr Gln Gly Asp Asp His Pro
      50          55          60

25      cga gcc cct tca agc ggc gat cat cct gta ctg ccc ccg atc ata gac 240
      Arg Ala Pro Ser Ser Gly Asp His Pro Val Leu Pro Pro Ile Ile Asp
      65          70          75          80

      gat gtg aaa ctg gac ccc aac aga cgg tac gcg cgt agt gtg aac gag 288
      Asp Val Lys Leu Asp Pro Asn Arg Arg Tyr Ala Arg Ser Val Asn Glu
      85          90          95

30      ccc tcg tct cag gag cat cac gaa cgc ttt gtg agg agc ttc gac tcc 336
      Pro Ser Ser Gln Glu His His Glu Arg Phe Val Arg Ser Phe Asp Ser
      100          105          110

      cgc agc agc agg cat cac ggc ggc agt cac tcc acg tcc agc ggc agc 384
      Arg Ser Ser Arg His His Gly Gly Ser His Ser Thr Ser Ser Gly Ser
      115          120          125

35      cgc gac act gga gct act cat ccg gga tac aat cgt cgt aac tca taa 432
      Arg Asp Thr Gly Ala Thr His Pro Gly Tyr Asn Arg Arg Asn Ser *
      130          135          140

40      tctgtggttt aatgtattag atatttgtgt ttaacattaa aacatttttg aaattgtcta 492
      ctggaataaaa tacatttacc tatttttaaaa aaaaaaaaaa aaaaaa 538

```

<210> 49

45 <211> 143

<212> PRT

<213> *Heliothis virescens*

50 <400> 49

```

55      Met Ala Lys Ser Ile Phe Ala Leu Gly Val Ile Ala Val Leu Leu Ile
      1          5          10          15
      Thr Glu Ser Asn Cys Trp Arg Ser Asp Leu Pro Ile Ile Leu Pro Thr
      20          25          30

      Tyr Lys Pro Pro Arg Thr Pro Ser Thr Val Ile Ile Arg Thr Val Arg
      35          40          45

      Glu Ala Gly Asp Lys Pro Leu Trp Leu Tyr Gln Gly Asp Asp His Pro
      50          55          60

60      Arg Ala Pro Ser Ser Gly Asp His Pro Val Leu Pro Pro Ile Ile Asp
      65          70          75          80
      Asp Val Lys Leu Asp Pro Asn Arg Arg Tyr Ala Arg Ser Val Asn Glu
      85          90          95
      Pro Ser Ser Gln Glu His His Glu Arg Phe Val Arg Ser Phe Asp Ser
      100          105          110
      Arg Ser Ser Arg His His Gly Gly Ser His Ser Thr Ser Ser Gly Ser
      115          120          125

65      Arg Asp Thr Gly Ala Thr His Pro Gly Tyr Asn Arg Arg Asn Ser
      130          135          140

```

ES 2 300 440 T3

<210> 50

<211> 143

<212> PRT

5 <213> *Heliothis virescens*

<400> 50

```

10      Met Ala Lys Ser Ile Phe Ala Leu Gly Val Ile Ala Val Leu Leu Ile
      1      5      10      15
      Thr Glu Ser Asn Cys Trp Arg Ser Asp Leu Pro Ile Ile Leu Pro Thr
      20      25      30
      Tyr Lys Pro Pro Arg Thr Pro Ser Thr Val Ile Ile Arg Thr Val Arg
      35      40      45
      Glu Ala Gly Asp Lys Pro Leu Trp Leu Tyr Gln Gly Asp Asp His Pro
      50      55      60
15      Arg Ala Pro Ser Ser Gly Asp His Pro Val Leu Pro Pro Ile Ile Asp
      65      70      75      80
      Asp Val Lys Leu Asp Pro Asn Arg Arg Tyr Ala Arg Ser Val Asn Glu
      85      90      95
      Pro Ser Ser Gln Glu His His Glu Arg Phe Val Arg Ser Phe Asp Ser
      100      105      110
20      Arg Ser Ser Arg His His Gly Gly Ser His Ser Thr Ser Ser Gly Ser
      115      120      125
      Arg Asp Thr Gly Ala Thr His Pro Gly Tyr Asn Arg Arg Asn Ser
      130      135      140

```

25 <210> 51

<211> 481

<212> DNA

<213> *Heliothis virescens*

30

<220>

<221> CDS

35 <222> (1)...(429)

<400> 51

```

40      atg aag tca gta ctt gta ctt tgc gtt gtt gcg gtg ttg cat acg gca 48
      Met Lys Ser Val Leu Val Leu Cys Val Val Ala Val Leu His Thr Ala
      1      5      10      15
      gca tcc tca ggc tgg aat aaa aat aat ggc ggc atc ata ctt ccg acc 96
      Ala Ser Ser Gly Trp Asn Lys Asn Asn Gly Gly Ile Ile Leu Pro Thr
      20      25      30
      ttt aga cct cca cct ata tgg cca gga att acc agg aca gta cgt gaa 144
      Phe Arg Pro Pro Ile Trp Pro Gly Ile Thr Arg Thr Val Arg Glu
      35      40      45
      gct gga gat caa cct tta tgg ctg tac caa gga gac aat cac ccg cga 192
      Ala Gly Asp Gln Pro Leu Trp Leu Tyr Gln Gly Asp Asn His Pro Arg
      50      55      60
50      gcc cct tca agc ggc gat cat cct gta ctg ccc tcg atc ata gac gat 240
      Ala Pro Ser Ser Gly Asp His Pro Val Leu Pro Ser Ile Ile Asp Asp
      65      70      75      80
      gtg aag ttg gac ccc aac agg cgg tac gtg cgt agt gtg aac gag ccg 288
      Val Lys Leu Asp Pro Asn Arg Arg Tyr Val Arg Ser Val Asn Glu Pro
      85      90      95
55      tcg tca cag gag cat cac gaa cgc ttt gtg agg agc ttc gac tcc cgc 336
      Ser Ser Gln Glu His His Glu Arg Phe Val Arg Ser Phe Asp Ser Arg
      100      105      110
      agc agc agg cat cac ggc ggc agc cac tct acg tcc agc ggc agc cgc 384
      Ser Ser Arg His His Gly Gly Ser His Ser Thr Ser Ser Gly Ser Arg
      115      120      125
60      gac act gga gct act cat ccg gga tac aat cgt cgt aac tca taa 429
      Asp Thr Gly Ala Thr His Pro Gly Tyr Asn Arg Arg Asn Ser *
      130      135      140
65      tctgtggttt aatccattag aaatttgtgt ttgtattttg ataaaaacaa tg 481

```

ES 2 300 440 T3

<210> 52

<211> 142

<212> PRT

5 <213> *Heliothis virescens*

<400> 52

```

10      Met Lys Ser Val Leu Val Leu Cys Val Val Ala Val Leu His Thr Ala
        1          5          10          15
      Ala Ser Ser Gly Trp Asn Lys Asn Asn Gly Gly Ile Ile Leu Pro Thr
        20          25          30
      Phe Arg Pro Pro Pro Ile Trp Pro Gly Ile Thr Arg Thr Val Arg Glu
        35          40          45

      Ala Gly Asp Gln Pro Leu Trp Leu Tyr Gln Gly Asp Asn His Pro Arg
        50          55          60
      Ala Pro Ser Ser Gly Asp His Pro Val Leu Pro Ser Ile Ile Asp Asp
        65          70          75          80
      Val Lys Leu Asp Pro Asn Arg Arg Tyr Val Arg Ser Val Asn Glu Pro
        85          90          95
      Ser Ser Gln Glu His His Glu Arg Phe Val Arg Ser Phe Asp Ser Arg
        100          105          110
      Ser Ser Arg His His Gly Gly Ser His Ser Thr Ser Ser Gly Ser Arg
        115          120          125
      Asp Thr Gly Ala Thr His Pro Gly Tyr Asn Arg Arg Asn Ser
        130          135          140

```

<210> 53

<211> 142

<212> PRT

<213> *Heliothis virescens*

<400> 53

```

40      Met Lys Ser Val Leu Val Leu Cys Val Val Ala Val Leu His Thr Ala
        1          5          10          15
      Ala Ser Ser Gly Trp Asn Lys Asn Asn Gly Gly Ile Ile Leu Pro Thr
        20          25          30
      Phe Arg Pro Pro Pro Ile Trp Pro Gly Ile Thr Arg Thr Val Arg Glu
        35          40          45
      Ala Gly Asp Gln Pro Leu Trp Leu Tyr Gln Gly Asp Asn His Pro Arg
        50          55          60
      Ala Pro Ser Ser Gly Asp His Pro Val Leu Pro Ser Ile Ile Asp Asp
        65          70          75          80
      Val Lys Leu Asp Pro Asn Arg Arg Tyr Val Arg Ser Val Asn Glu Pro
        85          90          95
      Ser Ser Gln Glu His His Glu Arg Phe Val Arg Ser Phe Asp Ser Arg
        100          105          110
      Ser Ser Arg His His Gly Gly Ser His Ser Thr Ser Ser Gly Ser Arg
        115          120          125
      Asp Thr Gly Ala Thr His Pro Gly Tyr Asn Arg Arg Asn Ser
        130          135          140

```

<210> 54

<211> 418

<212> ADN

60 <213> *Heliothis virescens*

<220>

<221> CDS

65 <222> (1)...(192)

ES 2 300 440 T3

<400> 54

```

5      atg aat tct aaa ata gtg att ttt ttg tgc att tgt ttt gtt ctt gtg   48
      Met Asn Ser Lys Ile Val Ile Phe Leu Cys Ile Cys Phe Val Leu Val
        1          5          10          15

10     tca acg gca acg gca tgg gat ttg ttt aaa gaa att gag gga gca ggt   96
      Ser Thr Ala Thr Ala Trp Asp Leu Phe Lys Glu Ile Glu Gly Ala Gly
        20          25          30

15     cag agg gtg cgt gat gcc atc atc agc gct ggc cct gcg gtc gac gtg   144
      Gln Arg Val Arg Asp Ala Ile Ile Ser Ala Gly Pro Ala Val Asp Val
        35          40          45

20     ctc acc aaa act aaa gga tta ttc gac agc tct gaa gaa aaa gat tag   192
      Leu Thr Lys Thr Lys Gly Leu Phe Asp Ser Ser Glu Glu Lys Asp  *
        50          55          60

      tttataataa aatgtaaact cagcttagat taggtacaga cgctagccgg tcaacgtacc 252
      aacgtctgtc aaattttacc aatcgaaactt taacctcca ctggtgtgat aaggttgaag 312
      atctattgag gaaatttgct agattgtgat ttgccaggtc gacgtgttgg tatctgtaaa 372
      tttatacttt cattaagtaa tattgtagct gtaacactga aagaac                418

```

<210> 55

<211> 57

25 <212> PRT

<213> *Heliothis virescens*

30 <400> 55

```

35      Met Asn Ser Lys Ile Val Ile Phe Leu Cys Ile Cys Phe Val Leu Val
        1          5          10          15
      Ser Thr Ala Thr Ala Trp Asp Leu Phe Lys Glu Ile Glu Gly Ala Gly
        20          25          30
      Gln Arg Val Arg Asp Ala Ile Ile Ser Ala Gly Pro Ala Val Asp Val
        35          40          45
      Leu Thr Lys Thr Lys Gly Leu Phe Asp
        50          55

```

40 <210> 56

<211> 63

<212> PRT

45 <213> *Heliothis virescens*

<400> 56

```

50      Met Asn Ser Lys Ile Val Ile Phe Leu Cys Ile Cys Phe Val Leu Val
        1          5          10          15
      Ser Thr Ala Thr Ala Trp Asp Leu Phe Lys Glu Ile Glu Gly Ala Gly
        20          25          30
      Gln Arg Val Arg Asp Ala Ile Ile Ser Ala Gly Pro Ala Val Asp Val
        35          40          45
      Leu Thr Lys Thr Lys Gly Leu Phe Asp Ser Ser Glu Glu Lys Asp
        50          55          60

```

<210> 57

<211> 275

60 <212> ADN

<213> *Heliothis virescens*

<220>

65 <221> CDS

<222> (1)...(189)

ES 2 300 440 T3

<400> 57

```

      atg aac ttc tca agg ata ttt ttc ttc gtg ttc gcg tgt ttg gta gta   48
      Met Asn Phe Ser Arg Ile Phe Phe Phe Val Phe Ala Cys Leu Val Val
5      1          5          10          15

      ctg tgc agc gtg tgc gcg gcg cct gag ccg agg tgg aag gtc ttc aag   96
      Leu Cys Ser Val Ser Ala Ala Pro Glu Pro Arg Trp Lys Val Phe Lys
          20          25          30

10     aaa att gag aag atg ggt cgc aac atc cga gac ggc atc gta aag gct   144
      Lys Ile Glu Lys Met Gly Arg Asn Ile Arg Asp Gly Ile Val Lys Ala
          35          40          45

      gga cca gcg ata gca gtt ctc ggc caa gct aaa gca tta gga taa       189
      Gly Pro Ala Ile Ala Val Leu Gly Gln Ala Lys Ala Leu Gly *
          50          55          60

      ataattattg tattattaat attaagagtt taatatctaa gtcgcattta aatactcatt 249
      ctgccataaa taaatgtatt ttaagt                                     275

```

20 <210> 58

<211> 62

<212> PRT

<213> *Heliothis virescens*

25

<400> 58

```

      Met Asn Phe Ser Arg Ile Phe Phe Phe Val Phe Ala Cys Leu Val Val
30     1          5          10          15
      Leu Cys Ser Val Ser Ala Ala Pro Glu Pro Arg Trp Lys Val Phe Lys
          20          25          30
      Lys Ile Glu Lys Met Gly Arg Asn Ile Arg Asp Gly Ile Val Lys Ala
          35          40          45
      Gly Pro Ala Ile Ala Val Leu Gly Gln Ala Lys Ala Leu Gly
          50          55          60
35

```

<210> 59

<211> 62

<212> PRT

<213> *Heliothis virescens*

40

<400> 59

```

      Met Asn Phe Ser Arg Ile Phe Phe Phe Val Phe Ala Cys Leu Val Val
45     1          5          10          15
      Leu Cys Ser Val Ser Ala Ala Pro Glu Pro Arg Trp Lys Val Phe Lys
          20          25          30
      Lys Ile Glu Lys Met Gly Arg Asn Ile Arg Asp Gly Ile Val Lys Ala
          35          40          45
      Gly Pro Ala Ile Ala Val Leu Gly Gln Ala Lys Ala Leu Gly
          50          55          60
50

```

<210> 60

<211> 397

55

<212> ADN

<213> *Helicoverpa zea*

<220>

60

<221> CDS

<222> (1)...(192)

<221> rasgo_misc

65

<222> 229, 267, 326

<223> n = A, T, C o G

ES 2 300 440 T3

<400> 60

```

5      atg aat tcc aaa att gta tta ttc ctg tgt gtt tgt ttg gtg ctt gtg   48
      Met Asn Ser Lys Ile Val Leu Phe Leu Cys Val Cys Leu Val Leu Val
      1          5          10          15

      tcg acg gca aca gca tgg gac ttc ttt aag gaa ctt gaa gga gca gga   96
      Ser Thr Ala Thr Ala Trp Asp Phe Phe Lys Glu Leu Glu Gly Ala Gly
      20          25          30

10     caa aga gtc cgc gat gct atc atc agc gct ggc cct gct gtc gac gtt   144
      Gln Arg Val Arg Asp Ala Ile Ile Ser Ala Gly Pro Ala Val Asp Val
      35          40          45

15     ctc acc aaa gct aag ggg cta tac gac agc tcc gaa gaa aaa gat tag   192
      Leu Thr Lys Ala Lys Gly Leu Tyr Asp Ser Ser Glu Glu Lys Asp  *
      50          55          60

      gatataagcc aatcaaatca tcatcatcat agtcaanaat caatcaaaat caaaactcat 252
      ttattcaaac ttggntgcaa aacaagcact tttcgaaagt caaaaaaaaaa tttacataag 312
      acagccccc aatnccgcca cccttcacca acttccttaa gttgtttttt gctggggaaa 372
20     gaaagaagtt ggcgcaacaa aacct                                     397

```

<210> 61

25 <211> 63

<212> PRT

<213> *Helicoverpa zea*

30 <400> 61

```

      Met Asn Ser Lys Ile Val Leu Phe Leu Cys Val Cys Leu Val Leu Val
      1          5          10          15
35     Ser Thr Ala Thr Ala Trp Asp Phe Phe Lys Glu Leu Glu Gly Ala Gly
      20          25          30
      Gln Arg Val Arg Asp Ala Ile Ile Ser Ala Gly Pro Ala Val Asp Val
      35          40          45
      Leu Thr Lys Ala Lys Gly Leu Tyr Asp Ser Ser Glu Glu Lys Asp
      50          55          60

```

40 <210> 62

<211> 57

<212> PRT

45 <213> *Helicoverpa zea*

<400> 62

```

50     Met Asn Ser Lys Ile Val Leu Phe Leu Cys Val Cys Leu Val Leu Val
      1          5          10          15
      Ser Thr Ala Thr Ala Trp Asp Phe Phe Lys Glu Leu Glu Gly Ala Gly
      20          25          30
      Gln Arg Val Arg Asp Ala Ile Ile Ser Ala Gly Pro Ala Val Asp Val
      35          40          45
55     Leu Thr Lys Ala Lys Gly Leu Tyr Asp
      50          55

```

<210> 63

60 <211> 263

<212> DNA

<213> *Manduca sexta*

65 <220>

<221> CDS

<222> (1)...(186)

ES 2 300 440 T3

<221> rasgo_misc

<222> 56, 65, 108, 123

<223> n = A, T, C o G

5

<400> 63

```

10      atg aac ttc tct cgc gtt ttg ttc ttc gtg ttt gct tgc gtc agc gca   48
      Met Asn Phe Ser Arg Val Leu Phe Phe Val Phe Ala Cys Val Ser Ala
        1             5             10             15

      ttc gcc gng act tca gnt gcg ccc tgt aat ccc ttt aag gaa ctg gag   96
      Phe Ala Xaa Thr Ser Xaa Ala Pro Cys Asn Pro Phe Lys Glu Leu Glu
              20             25             30

15      aga gct ggc can cga gtc cgc gac gcn gtc atc agc gcc gcg cct gca   144
      Arg Ala Gly Xaa Arg Val Arg Asp Ala Val Ile Ser Ala Ala Pro Ala
              35             40             45

20      gtc gcg acc gtc gga cag gcg gcc gcc atc gcc agc gga taa   186
      Val Ala Thr Val Gly Gln Ala Ala Ala Ile Ala Ser Gly *
              50             55             60

      taaccaatgg atgcttcact attcattatt atcataaatt atatgtgccca taccttaata 246

25      tggttcettac atttgta   263

```

<210> 64

30

<211> 61

<212> PRT

<213> *Manduca sexta*

35

<220>

<221> VARIANTE

<222> 19, 22, 36

<223> Xaa = Cualquier Aminoácido

40

<400> 64

```

45      Met Asn Phe Ser Arg Val Leu Phe Phe Val Phe Ala Cys Val Ser Ala
        1             5             10             15
      Phe Ala Xaa Thr Ser Xaa Ala Pro Cys Asn Pro Phe Lys Glu Leu Glu
              20             25             30
      Arg Ala Gly Xaa Arg Val Arg Asp Ala Val Ile Ser Ala Ala Pro Ala
              35             40             45
50      Val Ala Thr Val Gly Gln Ala Ala Ala Ile Ala Ser Gly
              50             55             60

```

<210> 65

55

<211> 61

<212> PRT

<213> *Manduca sexta*

60

<220>

<221> VARIANTE

<222> 19, 22, 36

<223> Xaa = Cualquier Aminoácido

65

ES 2 300 440 T3

<400> 65

```

5      Met Asn Phe Ser Arg Val Leu Phe Phe Val Phe Ala Cys Val Ser Ala
      1      5      10      15
      Phe Ala Xaa Thr Ser Xaa Ala Pro Cys Asn Pro Phe Lys Glu Leu Glu
      20      25      30
      Arg Ala Gly Xaa Arg Val Arg Asp Ala Val Ile Ser Ala Ala Pro Ala
      35      40      45
10     Val Ala Thr Val Gly Gln Ala Ala Ala Ile Ala Ser Gly
      50      55      60

```

<210> 66

<211> 367

<212> DNA

<213> *Manduca sexta*

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(186)

<400> 66

```

25     atg aac ttc tcc agg atc ttc ttc ttc gtc ttc gcc ttg gtt ctt ggc 48
      Met Asn Phe Ser Arg Ile Phe Phe Phe Val Phe Ala Leu Val Leu Gly
      1      5      10      15

30     atg tct gct gta tca gca gct ccc aaa tgg aag att ttt aag aaa att 96
      Met Ser Ala Val Ser Arg Ala Ala Pro Lys Trp Lys Ile Phe Lys Lys Ile
      20      25      30

35     gaa aaa gtc gga agg aac gtc cgt gat ggt att atc aaa gcg gga cca 144
      Glu Lys Val Gly Arg Asn Val Arg Asp Gly Ile Ile Lys Ala Gly Pro
      35      40      45

40     gcg ata caa gtg ctg gga cag gcg aaa gcg att gga aaa tga 186
      Ala Ile Gln Val Leu Gly Gln Ala Lys Ala Ile Gly Lys *
      50      55      60

40     agctgtattg cagtgttctt aaagtcttta ttacctcaac aaaatgccat aactgtatac 246
      tcttatagat aagtgaatca gaagaatgat ctgatgtaga gataatgaat ctgcctgtat 306
      ttctttgaat aaattaagtg aatgtaaata tttttttaaa taaataattt ttattaatct 366
      t 367

```

<210> 67

<211> 61

<212> PRT

<213> *Manduca sexta*

<400> 67

```

55     Met Asn Phe Ser Arg Ile Phe Phe Phe Val Phe Ala Leu Val Leu Gly
      1      5      10      15
      Met Ser Ala Val Ser Ala Ala Pro Lys Trp Lys Ile Phe Lys Lys Ile
      20      25      30
      Glu Lys Val Gly Arg Asn Val Arg Asp Gly Ile Ile Lys Ala Gly Pro
      35      40      45
60     Ala Ile Gln Val Leu Gly Gln Ala Lys Ala Ile Gly Lys
      50      55      60

```

<210> 68

<211> 61

<212> PRT

<213> *Manduca sexta*

ES 2 300 440 T3

<400> 68

```

Met Asn Phe Ser Arg Ile Phe Phe Phe Val Phe Ala Leu Val Leu Gly
 1           5           10           15
5 Met Ser Ala Val Ser Ala Ala Pro Lys Trp Lys Ile Phe Lys Lys Ile
 20           25           30
Glu Lys Val Gly Arg Asn Val Arg Asp Gly Ile Ile Lys Ala Gly Pro
 35           40           45
Ala Ile Gln Val Leu Gly Gln Ala Lys Ala Ile Gly Lys
 50           55           60

```

<210> 69

<211> 230

<212> ADN

15 <213> *Manduca sexta*

<220>

<221> CDS

20 <222> (1)...(135)

<400> 69

```

atg gct tca gct gca cct tgg aat ccc ttc aag gag ctg gag aga gct 48
25 Met Ala Ser Ala Ala Pro Trp Asn Pro Phe Lys Glu Leu Glu Arg Ala
 1           5           10           15

ggt cag cga gtc cgc gac gcc atc atc agc gca ggc cca gca gtc gcg 96
Gly Gln Arg Val Arg Asp Ala Ile Ile Ser Ala Gly Pro Ala Val Ala
 20           25           30

acc gtc gga cag gcg gcc gct atc gcc agg ggt ggt taa gcaacgaatg 145
Thr Val Gly Gln Ala Ala Ala Ile Ala Arg Gly Gly *
 35           40

ctttatctat gaatatgctt attaattata taagtttcat gtatctttat tacaataatg 205
atttggtata ataaacgtca ataataat 230
35

```

<210> 70

<211> 44

40 <212> PRT

<213> *Manduca sexta*

<400> 70

```

Met Ala Ser Ala Ala Pro Trp Asn Pro Phe Lys Glu Leu Glu Arg Ala
 1           5           10           15
50 Gly Gln Arg Val Arg Asp Ala Ile Ile Ser Ala Gly Pro Ala Val Ala
 20           25           30
Thr Val Gly Gln Ala Ala Ala Ile Ala Arg Gly Gly
 35           40

```

<210> 71

55 <211> 44

<212> PRT

<213> *Manduca sexta*

60 <400> 71

```

Met Ala Ser Ala Ala Pro Trp Asn Pro Phe Lys Glu Leu Glu Arg Ala
 1           5           10           15
65 Gly Gln Arg Val Arg Asp Ala Ile Ile Ser Ala Gly Pro Ala Val Ala
 20           25           30
Thr Val Gly Gln Ala Ala Ala Ile Ala Arg Gly Gly
 35           40

```

ES 2 300 440 T3

<210> 72

<211> 287

<212> ADN

5 <213> *Manduca sexta*

<220>

<221> CDS

10 <222> (25)...(287)

<400> 72

```

15      actagtggat cccccgggct gcag ggt gaa aca atc atg aaa ttg cta ctg      51
           Gly Glu Thr Ile Met Lys Leu Leu Leu
           1                      5

20      att ttg ggc gtt gcg ctg gtg ttg ctc ttt ggt gag tcc tta ggt cag      99
           Ile Leu Gly Val Ala Leu Val Leu Leu Phe Gly Glu Ser Leu Gly Gln
           10                      15                      20                      25

25      cga ttt agc cag cct acg ttc aag cta cct caa ggt aga ttg aca ctt      147
           Arg Phe Ser Gln Pro Thr Phe Lys Leu Pro Gln Gly Arg Leu Thr Leu
           30                      35                      40

30      agt cga aaa ttt agg gag tcc ggc aat gag cca cta tgg ttg tat caa      195
           Ser Arg Lys Phe Arg Glu Ser Gly Asn Glu Pro Leu Trp Leu Tyr Gln
           45                      50                      55

35      ggc gac aac ata cca aag gca cca tca act gca gaa cat ccc ttc ctt      243
           Gly Asp Asn Ile Pro Lys Ala Pro Ser Thr Ala Glu His Pro Phe Leu
           60                      65                      70

40      ccg tct ata ata gat gat gtg aag ttc aat cca gat aga aga ta      287
           Pro Ser Ile Ile Asp Asp Val Lys Phe Asn Pro Asp Arg Arg
           75                      80                      85

```

<210> 73

<211> 87

40 <212> PRT

<213> *Manduca sexta*

<400> 73

```

45      Gly Glu Thr Ile Met Lys Leu Leu Leu Ile Leu Gly Val Ala Leu Val
           1                      5                      10                      15

50      Leu Leu Phe Gly Glu Ser Leu Gly Gln Arg Phe Ser Gln Pro Thr Phe
           20                      25                      30

55      Lys Leu Pro Gln Gly Arg Leu Thr Leu Ser Arg Lys Phe Arg Glu Ser
           35                      40                      45

60      Gly Asn Glu Pro Leu Trp Leu Tyr Gln Gly Asp Asn Ile Pro Lys Ala
           50                      55                      60

65      Pro Ser Thr Ala Glu His Pro Phe Leu Pro Ser Ile Ile Asp Asp Val
           65                      70                      75                      80

           Lys Phe Asn Pro Asp Arg Arg
           85

```

<210> 74

60 <211> 87

<212> PRT

<213> *Manduca sexta*

65

ES 2 300 440 T3

<400> 74

```

      Gly Glu Thr Ile Met Lys Leu Leu Leu Ile Leu Gly Val Ala Leu Val
      1      5      10      15
5    Leu Leu Phe Gly Glu Ser Leu Gly Gln Arg Phe Ser Gln Pro Thr Phe
      20      25      30
      Lys Leu Pro Gln Gly Arg Leu Thr Leu Ser Arg Lys Phe Arg Glu Ser
      35      40      45
      Gly Asn Glu Pro Leu Trp Leu Tyr Gln Gly Asp Asn Ile Pro Lys Ala
      50      55      60
10   Pro Ser Thr Ala Glu His Pro Phe Leu Pro Ser Ile Ile Asp Asp Val
      65      70      75      80
      Lys Phe Asn Pro Asp Arg Arg
      85

```

<210> 75

<211> 220

<212> ADN

<213> *Manduca sexta*

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(192)

<400> 75

```

      atg aac ttc tcc cgc att ttc ttc ttt gtg ttc gct ctg gtc ctc agt   48
      Met Asn Phe Ser Arg Ile Phe Phe Phe Val Phe Ala Leu Val Leu Ser
      1      5      10      15
30   ctg tcg gcg gtg tcc gcg gct cct gaa ccg aaa tgg aag gtg ttt aag   96
      Leu Ser Ala Val Ser Ala Ala Pro Glu Pro Lys Trp Lys Val Phe Lys
      20      25      30
      aaa att gaa aaa atg ggc cga aat atc aga gat gga att atc aaa gct   144
      Lys Ile Glu Lys Met Gly Arg Asn Ile Arg Asp Gly Ile Ile Lys Ala
      35      40      45
      ggc cca gcg att gaa gtc ctt ggc gca gct aag gcc ata gga aag tga   192
      Gly Pro Ala Ile Glu Val Leu Gly Ala Ala Lys Ala Ile Gly Lys *
      50      55      60
      acctaattgct tccttggttag tctattttt   220

```

<210> 76

<211> 63

<212> PRT

<213> *Manduca sexta*

<400> 76

```

      Met Asn Phe Ser Arg Ile Phe Phe Phe Val Phe Ala Leu Val Leu Ser
      1      5      10      15
55   Leu Ser Ala Val Ser Ala Ala Pro Glu Pro Lys Trp Lys Val Phe Lys
      20      25      30
      Lys Ile Glu Lys Met Gly Arg Asn Ile Arg Asp Gly Ile Ile Lys Ala
      35      40      45
      Gly Pro Ala Ile Glu Val Leu Gly Ala Ala Lys Ala Ile Gly Lys
      50      55      60

```

<210> 77

<211> 63

<212> PRT

<213> *Manduca sexta*

65

ES 2 300 440 T3

<400> 77

```

Met Asn Phe Ser Arg Ile Phe Phe Phe Val Phe Ala Leu Val Leu Ser
1      5      10      15
5  Leu Ser Ala Val Ser Ala Ala Pro Glu Pro Lys Trp Lys Val Phe Lys
      20      25      30
    Lys Ile Glu Lys Met Gly Arg Asn Ile Arg Asp Gly Ile Ile Lys Ala
      35      40      45
    Gly Pro Ala Ile Glu Val Leu Gly Ala Ala Lys Ala Ile Gly Lys
      50      55      60

```

<210> 78

<211> 293

<212> ADN

15 <213> *Manduca sexta*

<220>

<221> CDS

20 <222> (1)...(279)

<400> 78

```

25  atg aat tta tta tat ttc ctt tcg ttt ctg ggc tgt att act ctc tgc 48
    Met Asn Leu Leu Tyr Phe Leu Ser Phe Leu Gly Cys Ile Thr Leu Cys
      1      5      10      15

    ttg agt gcc ggt ttg tac aaa cct cct aat aac ata gaa tct gag aac 96
    Leu Ser Ala Gly Leu Tyr Lys Pro Pro Asn Asn Ile Glu Ser Glu Asn
      20      25      30

    gaa gtt tac acc gga aat att tgc ttc ttg cca ttg gaa gtt ggg gta 144
    Glu Val Tyr Thr Gly Asn Ile Cys Phe Leu Pro Leu Glu Val Gly Val
      35      40      45

    tgc cga gct ctg ttc ttt agg tac gga tac gat cca gcg ata aag gca 192
    Cys Arg Ala Leu Phe Phe Arg Tyr Gly Tyr Asp Pro Ala Ile Lys Ala
      50      55      60

    tgc aag gaa ttc atg tac ggc ggt tgc caa ggg aac gct aac aat ttc 240
    Cys Lys Glu Phe Met Tyr Gly Gly Cys Gln Gly Asn Ala Asn Asn Phe
      65      70      75      80

    aag act tta gaa gaa tgc cag gaa gcc tgt gaa gcc taa gtacctggac 289
    Lys Thr Leu Glu Glu Cys Gln Glu Ala Cys Glu Ala *
      85      90

45  ttcg 293

```

<210> 79

<211> 92

50 <212> PRT

<213> *Manduca sexta*

<400> 79

```

55  Met Asn Leu Leu Tyr Phe Leu Ser Phe Leu Gly Cys Ile Thr Leu Cys
      1      5      10      15
60  Leu Ser Ala Gly Leu Tyr Lys Pro Pro Asn Asn Ile Glu Ser Glu Asn
      20      25      30
    Glu Val Tyr Thr Gly Asn Ile Cys Phe Leu Pro Leu Glu Val Gly Val
      35      40      45
    Cys Arg Ala Leu Phe Phe Arg Tyr Gly Tyr Asp Pro Ala Ile Lys Ala
      50      55      60
    Cys Lys Glu Phe Met Tyr Gly Gly Cys Gln Gly Asn Ala Asn Asn Phe
      65      70      75      80
    Lys Thr Leu Glu Glu Cys Gln Glu Ala Cys Glu Ala
      85      90

```

ES 2 300 440 T3

<210> 80

<211> 92

<212> PRT

5 <213> *Manduca sexta*

<400> 80

```

10      Met Asn Leu Leu Tyr Phe Leu Ser Phe Leu Gly Cys Ile Thr Leu Cys
      1      5      10      15
      Leu Ser Ala Gly Leu Tyr Lys Pro Pro Asn Asn Ile Glu Ser Glu Asn
      20      25      30
      Glu Val Tyr Thr Gly Asn Ile Cys Phe Leu Pro Leu Glu Val Gly Val
      35      40      45
      Cys Arg Ala Leu Phe Phe Arg Tyr Gly Tyr Asp Pro Ala Ile Lys Ala
      50      55      60
15      Cys Lys Glu Phe Met Tyr Gly Gly Cys Gln Gly Asn Ala Asn Asn Phe
      65      70      75      80
      Lys Thr Leu Glu Glu Cys Gln Glu Ala Cys Glu Ala
      85      90

```

<210> 81

20 <211> 489

<212> ADN

<213> *Manduca sexta*

25 <220>

<221> CDS

<222> (1)...(489)

30 <400> 81

```

      atg aaa ttg cta ctg att ttg ggc gtt gcg ctg gtg ttg ctc ttt ggt 48
      Met Lys Leu Leu Ile Leu Gly Val Ala Leu Val Leu Leu Phe Gly
      1      5      10      15
35      gag tcc tta ggt cag cga ttt agc cag cct acg ttc aag cta cct caa 96
      Glu Ser Leu Gly Gln Arg Phe Ser Gln Pro Thr Phe Lys Leu Pro Gln
      20      25      30
      ggt aga ttg aca ctt agt cga aaa ttt agg gag tcc ggc aat gag cca 144
      Gly Arg Leu Thr Leu Ser Arg Lys Phe Arg Glu Ser Gly Asn Glu Pro
      35      40      45
      cta tgg ttg tat caa ggc gac aac ata cca aag gca cca tca act gca 192
      Leu Trp Leu Tyr Gln Gly Asp Asn Ile Pro Lys Ala Pro Ser Thr Ala
      50      55      60
45      gaa cat ccc ttc ctt ccg tct ata ata gat gat gtg aag ttc aat cca 240
      Glu His Pro Phe Leu Pro Ser Ile Ile Asp Asp Val Lys Phe Asn Pro
      65      70      75      80
      gat aga aga tac gcg cgc agt ctt ggt aca cca gac cat tat cat gga 288
      Asp Arg Arg Tyr Ala Arg Ser Leu Gly Thr Pro Asp His Tyr His Gly
      85      90      95
50      ggc cgt cat tcc ata tct cga ggt agc cag agc aca gga ccg act cat 336
      Gly Arg His Ser Ile Ser Arg Gly Ser Gln Ser Thr Gly Pro Thr His
      100      105      110
      ccg ggc tat aat cgc cgt aac gcc agg agt gtc gaa acg tta gct agc 384
      Pro Gly Tyr Asn Arg Arg Asn Ala Arg Ser Val Glu Thr Leu Ala Ser
      115      120      125
      caa gaa cat cta agc agc ctg ccg atg gat agc caa gag act tta ctg 432
      Gln Glu His Leu Ser Ser Leu Pro Met Asp Ser Gln Glu Thr Leu Leu
      130      135      140
60      cgt ggc acc agg agc gtg gaa aca cta gct agt cag gaa cat cta agc 480
      Arg Gly Thr Arg Ser Val Glu Thr Leu Ala Ser Gln Glu His Leu Ser
      145      150      155      160
      agc ctg ccg 489
      Ser Leu Pro

```

65

ES 2 300 440 T3

<210> 82

<211> 163

<212> PRT

5 <213> *Manduca sexta*

<400> 82

```

10      Met Lys Leu Leu Leu Ile Leu Gly Val Ala Leu Val Leu Leu Phe Gly
        1          5          10          15
        Glu Ser Leu Gly Gln Arg Phe Ser Gln Pro Thr Phe Lys Leu Pro Gln
        20          25          30
        Gly Arg Leu Thr Leu Ser Arg Lys Phe Arg Glu Ser Gly Asn Glu Pro
        35          40          45
15      Leu Trp Leu Tyr Gln Gly Asp Asn Ile Pro Lys Ala Pro Ser Thr Ala
        50          55          60
        Glu His Pro Phe Leu Pro Ser Ile Ile Asp Asp Val Lys Phe Asn Pro
        65          70          75          80
        Asp Arg Arg Tyr Ala Arg Ser Leu Gly Thr Pro Asp His Tyr His Gly
        85          90          95
20      Gly Arg His Ser Ile Ser Arg Gly Ser Gln Ser Thr Gly Pro Thr His
        100          105          110
        Pro Gly Tyr Asn Arg Arg Asn Ala Arg Ser Val Glu Thr Leu Ala Ser
        115          120          125
        Gln Glu His Leu Ser Ser Leu Pro Met Asp Ser Gln Glu Thr Leu Leu
        130          135          140
25      Arg Gly Thr Arg Ser Val Glu Thr Leu Ala Ser Gln Glu His Leu Ser
        145          150          155          160
        Ser Leu Pro

```

<210> 83

30 <211> 165

<212> PRT

<213> *Manduca sexta*

35 <400> 83

```

40      Met Lys Leu Leu Leu Ile Leu Gly Val Ala Leu Val Leu Leu Phe Gly
        1          5          10          15
        Glu Ser Leu Gly Gln Arg Phe Ser Gln Pro Thr Phe Lys Leu Pro Gln
        20          25          30
        Gly Arg Leu Thr Leu Ser Arg Lys Phe Arg Glu Ser Gly Asn Glu Pro
        35          40          45
        Leu Trp Leu Tyr Gln Gly Asp Asn Ile Pro Lys Ala Pro Ser Thr Ala
        50          55          60
        Glu His Pro Phe Leu Pro Ser Ile Ile Asp Asp Val Lys Phe Asn Pro
        65          70          75          80
        Asp Arg Arg Tyr Ala Arg Ser Leu Gly Thr Pro Asp His Tyr His Gly
        85          90          95
45      Gly Arg His Ser Ile Ser Arg Gly Ser Gln Ser Thr Gly Pro Thr His
        100          105          110
        Pro Gly Tyr Asn Arg Arg Asn Ala Arg Ser Val Glu Thr Leu Ala Ser
        115          120          125
        Gln Glu His Leu Ser Ser Leu Pro Met Asp Ser Gln Glu Thr Leu Leu
        130          135          140
50      Arg Gly Thr Arg Ser Val Glu Thr Leu Ala Ser Gln Glu His Leu Ser
        145          150          155          160
        Ser Leu Pro Met Asp
        165
55

```

<210> 84

<211> 475

60 <212> ADN

<213> *Manduca sexta*

<220>

65 <221> CDS

<222> (2)...(475)

ES 2 300 440 T3

<221> rasgo_misc

<222> 12, 13, 14

<223> n = A, T, C o G

5

<400> 84

```

g ccg ctc tag ann ngt gga tcc ccc ggg ctg cag gca aaa tcc aat ttc 49
Pro Leu * Xaa Xaa Gly Ser Pro Gly Leu Gln Ala Lys Ser Asn Phe
1 5 10 15

gcg ctt gga gtt atc gca att ctg tta ata aca gaa tcc aac tgt tgg 97
Ala Leu Gly Val Ile Ala Ile Leu Leu Ile Thr Glu Ser Asn Cys Trp
20 25 30

aga agt gat ctc cct atc ata ctc ccg act tat aaa cct cct cgt acc 145
Arg Ser Asp Leu Pro Ile Ile Leu Pro Thr Tyr Lys Pro Pro Arg Thr
35 40 45

ccg agc acc att att atc agg aca gta cgc gaa gcc gga gat aaa ccg 193
Pro Ser Thr Ile Ile Ile Arg Thr Val Arg Glu Ala Gly Asp Lys Pro
50 55 60

tta tgg ctc tac caa gga gac gat cac ccg caa gcc cct tca agc ggc 241
Leu Trp Leu Tyr Gln Gly Asp Asp His Pro Gln Ala Pro Ser Ser Gly
65 70 75

gat cat cct gta ctg ccc tcg att ata gac gat gtg caa ctg gat ccc 289
Asp His Pro Val Leu Pro Ser Ile Ile Asp Asp Val Gln Leu Asp Pro
80 85 90 95

aac aga cgg tac gcg cgt agt gtg agc gag ccg tcg tct cag gat cat 337
Asn Arg Arg Tyr Ala Arg Ser Val Ser Glu Pro Ser Ser Gln Asp His
100 105 110

cac gaa cgc ttt gtg agg agc ttc gac tcc cgc agc agc aag cat cac 385
His Glu Arg Phe Val Arg Ser Phe Asp Ser Arg Ser Ser Lys His His
115 120 125

ggc ggc agt cac tcc acg tcc agc ggc agc cgc gac act gga gct act 433
Gly Gly Ser His Ser Thr Ser Ser Gly Ser Arg Asp Thr Gly Ala Thr
130 135 140

cat ccg gga tac aat cgc cgt aac tca taa tct gtg gtt taa 475
His Pro Gly Tyr Asn Arg Arg Asn Ser * Ser Val Val *
145 150 155

```

<210> 85

45 <211> 141

<212> PRT

<213> *Manduca sexta*

50

<400> 85

```

Lys Ser Asn Phe Ala Leu Gly Val Ile Ala Ile Leu Leu Ile Thr Glu
1 5 10 15
Ser Asn Cys Trp Arg Ser Asp Leu Pro Ile Ile Leu Pro Thr Tyr Lys
20 25 30
Pro Pro Arg Thr Pro Ser Thr Ile Ile Ile Arg Thr Val Arg Glu Ala
35 40 45
Gly Asp Lys Pro Leu Trp Leu Tyr Gln Gly Asp Asp His Pro Gln Ala
50 55 60
Pro Ser Ser Gly Asp His Pro Val Leu Pro Ser Ile Ile Asp Asp Val
65 70 75 80
Gln Leu Asp Pro Asn Arg Arg Tyr Ala Arg Ser Val Ser Glu Pro Ser
85 90 95
Ser Gln Asp His His Glu Arg Phe Val Arg Ser Phe Asp Ser Arg Ser
100 105 110
Ser Lys His His Gly Gly Ser His Ser Thr Ser Ser Gly Ser Arg Asp
115 120 125
Thr Gly Ala Thr His Pro Gly Tyr Asn Arg Arg Asn Ser
130 135 140

```

ES 2 300 440 T3

<210> 86

<211> 155

<212> PRT

5 <213> *Manduca sexta*

<220>

<221> VARIANTE

10 <222> 3, 4

<223> Xaa = Cualquier Aminoácido

<400> 86

```

15      Pro Leu Xaa Xaa Gly Ser Pro Gly Leu Gln Ala Lys Ser Asn Phe Ala
        1          5          10          15
      Leu Gly Val Ile Ala Ile Leu Leu Ile Thr Glu Ser Asn Cys Trp Arg
        20          25          30
      Ser Asp Leu Pro Ile Ile Leu Pro Thr Tyr Lys Pro Pro Arg Thr Pro
        35          40          45
      Ser Thr Ile Ile Ile Arg Thr Val Arg Glu Ala Gly Asp Lys Pro Leu
        50          55          60
      Trp Leu Tyr Gln Gly Asp Asp His Pro Gln Ala Pro Ser Ser Gly Asp
        65          70          75          80
      His Pro Val Leu Pro Ser Ile Ile Asp Asp Val Gln Leu Asp Pro Asn
        85          90          95
      Arg Arg Tyr Ala Arg Ser Val Ser Glu Pro Ser Ser Gln Asp His His

        100          105          110
      Glu Arg Phe Val Arg Ser Phe Asp Ser Arg Ser Ser Lys His His Gly
        115          120          125
      Gly Ser His Ser Thr Ser Ser Gly Ser Arg Asp Thr Gly Ala Thr His
        130          135          140
      Pro Gly Tyr Asn Arg Arg Asn Ser Ser Val Val
        145          150          155

```

35 <210> 87

<211> 273

<212> ADN

40 <213> *Manduca sexta*

<220>

<221> CDS

45 <222> (1)...(204)

<400> 87

```

50      atg aaa ttc tcc cgt gtt tta ttc ttc gtc ttc gct tgc ttc gcc gca 48
      Met Lys Phe Ser Arg Val Leu Phe Phe Val Phe Ala Cys Phe Ala Ala
        1          5          10          15

      ttt aca gta act gcg gcc aag cca tgg gac ttc tta aag gag ctg gag 96
      Phe Thr Val Thr Ala Ala Lys Pro Trp Asp Phe Leu Lys Glu Leu Glu
        20          25          30

      ggt gca ggt caa agg att cgt gac gct atc atc agc gcg cag ccg gcg 144
      Gly Ala Gly Gln Arg Ile Arg Asp Ala Ile Ile Ser Ala Gln Pro Ala
        35          40          45

      gtg gaa acc atc gcg cag gca acc gcc att ttc aaa gga caa tca aaa 192
      Val Glu Thr Ile Ala Gln Ala Thr Ala Ile Phe Lys Gly Gln Ser Lys
        50          55          60

      gaa gaa gat taa ttgtgtcatt acagtattac atatttaagg atataatttt 244
      Glu Glu Asp *
        65

      attttgacaa tatattcatt taattcaac 273

```

ES 2 300 440 T3

<210> 88

<211> 67

<212> PRT

5 <213> *Manduca sexta*

<400> 88

```

10      Met Lys Phe Ser Arg Val Leu Phe Phe Val Phe Ala Cys Phe Ala Ala
        1           5           10           15
      Phe Thr Val Thr Ala Ala Lys Pro Trp Asp Phe Leu Lys Glu Leu Glu
                20           25           30
      Gly Ala Gly Gln Arg Ile Arg Asp Ala Ile Ile Ser Ala Gln Pro Ala
15      35           40           45
      Val Glu Thr Ile Ala Gln Ala Thr Ala Ile Phe Lys Gly Gln Ser Lys
        50           55           60
      Glu Glu Asp
      65

```

20 <210> 89

<211> 60

<212> PRT

25 <213> *Manduca sexta*

<400> 89

```

30      Met Lys Phe Ser Arg Val Leu Phe Phe Val Phe Ala Cys Phe Ala Ala
        1           5           10           15
      Phe Thr Val Thr Ala Ala Lys Pro Trp Asp Phe Leu Lys Glu Leu Glu
                20           25           30
35      Gly Ala Gly Gln Arg Ile Arg Asp Ala Ile Ile Ser Ala Gln Pro Ala
        35           40           45
      Val Glu Thr Ile Ala Gln Ala Thr Ala Ile Phe Lys
        50           55           60

```

40 <210> 90

<211> 418

<212> ADN

45 <213> *Peregrinus maidis*

<220>

<221> CDS

50 <222> (1)...(192)

<221> rasgo_misc

<222> 259, 305, 330, 340, 358, 359, 372, 380, 397, 417

55 <223> n = A, T, C o G

60

65

ES 2 300 440 T3

<400> 90

```

5      atg aag ttc tcc cga gtg ttc ctg ttc gtg ttc gcg tgc ctg gtc gcg 48
      Met Lys Phe Ser Arg Val Phe Leu Phe Val Phe Ala Cys Leu Val Ala
      1          5          10          15

      ctg agc gcc gtc agc gcc gcg cca gag ccg agg tgg aag gtc ttc aag 96
      Leu Ser Ala Val Ser Ala Ala Pro Glu Pro Arg Trp Lys Val Phe Lys
      20          25          30

10     aag att gag aag atg ggc cgc aac atc aga gac ggt atc gtc aag gca 144
      Lys Ile Glu Lys Met Gly Arg Asn Ile Arg Asp Gly Ile Val Lys Ala
      35          40          45

15     ggt cct gct gtc gag gtg ttg ggt gca gcc aaa gcg ctg ggg aag taa 192
      Gly Pro Ala Val Glu Val Leu Gly Ala Ala Lys Ala Leu Gly Lys *
      50          55          60

      tcagcagtat catcttcac atcatcactt aatatcatca caagtcttat ggtgtgacca 252
      gcataatnctg gtgaccaaca acccctttaa attcctaaac ccaccaaaaa ggnccgggtaa 312
      cgcacttggt acgcctcngg tgttttgnaa tgtccaaggg ggtgganggc gattgcttan 372
20     ccatcaanaa tgattccttc tgatncgttt aaccggtaat ttccna 418

```

<210> 91

<211> 63

25 <212> PRT

<213> *Peregrinus maidis*

<400> 91

```

30

      Met Lys Phe Ser Arg Val Phe Leu Phe Val Phe Ala Cys Leu Val Ala
      1          5          10          15
      Leu Ser Ala Val Ser Ala Ala Pro Glu Pro Arg Trp Lys Val Phe Lys
      20          25          30
35     Lys Ile Glu Lys Met Gly Arg Asn Ile Arg Asp Gly Ile Val Lys Ala
      35          40          45
      Gly Pro Ala Val Glu Val Leu Gly Ala Ala Lys Ala Leu Gly Lys
      50          55          60

```

40 <210> 92

<211> 63

<212> PRT

45 <213> *Peregrinus maidis*

<400> 92

```

50     Met Lys Phe Ser Arg Val Phe Leu Phe Val Phe Ala Cys Leu Val Ala
      1          5          10          15
      Leu Ser Ala Val Ser Ala Ala Pro Glu Pro Arg Trp Lys Val Phe Lys
      20          25          30
55     Lys Ile Glu Lys Met Gly Arg Asn Ile Arg Asp Gly Ile Val Lys Ala
      35          40          45
      Gly Pro Ala Val Glu Val Leu Gly Ala Ala Lys Ala Leu Gly Lys
      50          55          60

```

<210> 93

60 <211> 370

<212> ADN

<213> *Peregrinus maidis*

65 <220>

<221> CDS

<222> (1)...(225)

ES 2 300 440 T3

<400> 93

```

5      atg aag ttc tcc cga gtg ttc ctg ttc gtg ttc gcg tgc ctg gtc gcg   48
      Met Lys Phe Ser Arg Val Phe Leu Phe Val Phe Ala Cys Leu Val Ala
      1          5          10          15

      ctg agc gcc gtc agc gcc gcg cca gag ccg agg tgg aag gtc ttc aag   96
      Leu Ser Ala Val Ser Ala Ala Pro Glu Pro Arg Trp Lys Val Phe Lys
      20          25          30

10     aag att gag aag atg ggc cgc aac atc aga gac ggt atc gtc aag gca   144
      Lys Ile Glu Lys Met Gly Arg Asn Ile Arg Asp Gly Ile Val Lys Ala
      35          40          45

      ggt cct gct gtc gag gtg ttg ggt gca agc caa ggc gct ggg gaa gta   192
      Gly Pro Ala Val Glu Val Leu Gly Ala Ser Gln Gly Ala Gly Glu Val
      50          55          60

15     atc agc agt atc atc ttc atc atc atc act taa tatcatcaca gtcttatggt 245
      Ile Ser Ser Ile Ile Phe Ile Ile Ile Thr *
      65          70

20     gtgaccagca tatctggtga caacaaccct taaattccta acccaccaaa agggcggttaa 305
      cgcacttggt acgcctcggg tgtttgaaat gtccaagggg tgggcggcga ttgcttacca 365
      acaag                                           370

```

<210> 94

<211> 74

<212> PRT

<213> *Peregrinus maidis*

30

<400> 94

```

35     Met Lys Phe Ser Arg Val Phe Leu Phe Val Phe Ala Cys Leu Val Ala
      1          5          10          15
      Leu Ser Ala Val Ser Ala Ala Pro Glu Pro Arg Trp Lys Val Phe Lys
      20          25          30
      Lys Ile Glu Lys Met Gly Arg Asn Ile Arg Asp Gly Ile Val Lys Ala
      35          40          45
      Gly Pro Ala Val Glu Val Leu Gly Ala Ser Gln Gly Ala Gly Glu Val
      50          55          60
40     Ile Ser Ser Ile Ile Phe Ile Ile Ile Thr
      65          70

```

<210> 95

<211> 63

<212> PRT

<213> *Peregrinus maidis*

<400> 95

```

50     Met Lys Phe Ser Arg Val Phe Leu Phe Val Phe Ala Cys Leu Val Ala
      1          5          10          15
      Leu Ser Ala Val Ser Ala Ala Pro Glu Pro Arg Trp Lys Val Phe Lys
      20          25          30
      Lys Ile Glu Lys Met Gly Arg Asn Ile Arg Asp Gly Ile Val Lys Ala
      35          40          45
55     Gly Pro Ala Val Glu Val Leu Gly Ala Ser Gln Gly Ala Gly Glu
      50          55          60

```

<210> 96

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

65 <220>

<223> Secuencia peptídica de Mag1 digerido con Lys-C

ES 2 300 440 T3

<400> 96

Val Gly Ala Ser Leu Gly Ala Ala His Thr Asp Phe
1 5 10

5

<210> 97

<211> 17

10 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Secuencia peptídica de Mag1 digerido con Lys-C

<400> 97

Asn Asn Ile Phe Ser Ala Ile Gly Gly Ala Asp Phe Asn Ala Asn His
1 5 10 15
Lys

20

<210> 98

<211> 12

<212> PRT

30 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia Peptídica de Mag1 digerido con Lys-C

35 <400> 98

Lys Phe Asp Thr Pro Phe Met Arg Ser Gly Trp Glu
1 5 10

40

<210> 99

<211> 12

<212> PRT

45 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia Peptídica de Mag1 digerido con Lys-C

50

<400> 99

Leu Asn Leu Phe His Asn Asn Asn His Asp Leu Thr
1 5 10

55

<210> 100

<211> 358

60 <212> ADN

<213> *Agrotis ipsilon*

<220>

65 <221> CDS

<222> (1)...(195)

ES 2 300 440 T3

<221> rasgo_misc

<222> (0)...(0)

<223> Fus6

5

<400> 100

```

10      atg gcc gcc aac aag act atc ttc ctt ctc gtg ctg atc gcc ttc gca 48
      Met Ala Ala Asn Lys Thr Ile Phe Leu Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala
          1          5          10          15

      atg gtg atg gtg acc gtg gag gcc gtc cgt gtg gga ccc tgc gac cag 96
      Met Val Met Val Thr Val Glu Ala Val Arg Val Gly Pro Cys Asp Gln
          20          25          30

15      gtc tgc agc cgc atc gat gct gag aag aac gag tgc tgc aga gct cac 144
      Val Cys Ser Arg Ile Asp Ala Glu Lys Asn Glu Cys Cys Arg Ala His
          35          40          45

20      ggc tac tcc gga tac agc agc tgt aga tat ggg cag atg caa tgt tac 192
      Gly Tyr Ser Gly Tyr Ser Ser Cys Arg Tyr Gly Gln Met Gln Cys Tyr
          50          55          60

      tga cggaactcca caagagcaac agttttctaa ccactttttc aactttgtcc 245
      *

25      agaggtaatc aagattgcct catcacttca aagggttcttt tttgtcattt attaaacttgt 305
      tttcaaaatt aaccgattaa attaattaat ttasasasasas aasasasasas aaa 358

```

30 <210> 101

<211> 64

<212> PRT

35 <213> *Agrotis ipsilon*

<400> 101

```

40      Met Ala Ala Asn Lys Thr Ile Phe Leu Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala
          1          5          10          15
      Met Val Met Val Thr Val Glu Ala Val Arg Val Gly Pro Cys Asp Gln
          20          25          30
      Val Cys Ser Arg Ile Asp Ala Glu Lys Asn Glu Cys Cys Arg Ala His
          35          40          45
45      Gly Tyr Ser Gly Tyr Ser Ser Cys Arg Tyr Gly Gln Met Gln Cys Tyr
          50          55          60

```

<210> 102

50 <211> 123

<212> ADN

<213> *Agrotis ipsilon*

55 <220>

<221> CDS

<222> (1)...(123)

60 <221> rasgo_misc

<222> (0)..(0)

<223> Fus6

65

ES 2 300 440 T3

<400> 102

```

5      gtc cgt gtg gga ccc tgc gac cag gtc tgc agc cgc atc gat gct gag 48
      Val Arg Val Gly Pro Cys Asp Gln Val Cys Ser Arg Ile Asp Ala Glu
      1          5          10          15

      aag aac gag tgc tgc aga gct cac ggc tac tcc gga tac agc agc tgt 96
      Lys Asn Glu Cys Cys Arg Ala His Gly Tyr Ser Gly Tyr Ser Ser Cys
      20          25          30

10     aga tat ggg cag atg caa tgt tac tga 123
      Arg Tyr Gly Gln Met Gln Cys Tyr *
      35          40

```

<210> 103

15 <211> 40

<212> PRT

<213> *Agrotis ipsilon*

20 <400> 103

```

      Val Arg Val Gly Pro Cys Asp Gln Val Cys Ser Arg Ile Asp Ala Glu
      1          5          10          15
      Lys Asn Glu Cys Cys Arg Ala His Gly Tyr Ser Gly Tyr Ser Ser Cys
      20          25          30
25     Arg Tyr Gly Gln Met Gln Cys Tyr
      35          40

```

<210> 104

30 <211> 387

<212> ADN

<213> *Agrotis ipsilon*

35 <220>

<221> CDS

<222> (1)...(195)

40 <221> rasgo_misc

<222> (0)...(0)

<223> Fus7

45 <400> 104

```

      atg gtt gcc aac aag act atc ctc ctt ctc gtg ctg atc gcc ttc gca 48
      Met Val Ala Asn Lys Thr Ile Leu Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala
      1          5          10          15

50     atg gtg atg gtg acc gtg gaa gcc gtc cat gtg gga ccc tgc gac cag 96
      Met Val Met Val Thr Val Glu Ala Val His Val Gly Pro Cys Asp Gln
      20          25          30

      gtc tgc agc cgc atc gac gct gag aag gac gag tgc tgc aga gct cac 144
      Val Cys Ser Arg Ile Asp Ala Glu Lys Asp Glu Cys Cys Arg Ala His
      35          40          45

      ggc cac tcc ggc tac agc agc tgc aga tac gga cag atg caa tgt tac 192
      Gly His Ser Gly Tyr Ser Ser Cys Arg Tyr Gly Gln Met Gln Cys Tyr
      50          55          60

60     tga cggtactccg caacaacaac ggtactatag tggagctatt gtgtaacttt 245
      *

      tccaaataca tgtgaaagtt aactgtgata tttttaagtt cctttacttt tgaattcggc 305
      atgtgattaa gttattgttt aataaaagga attatttatg aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 365
      aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aa 387

```

ES 2 300 440 T3

<210> 105
 <211> 64
 <212> PRT
 5 <213> *Agrotis ipsilon*

 <400> 105

 10 Met Val Ala Asn Lys Thr Ile Leu Leu Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala
 1 5 10 15
 Met Val Met Val Thr Val Glu Ala Val His Val Gly Pro Cys Asp Gln
 20 25 30
 Val Cys Ser Arg Ile Asp Ala Glu Lys Asp Glu Cys Cys Arg Ala His
 35 40 45
 15 Gly His Ser Gly Tyr Ser Ser Cys Arg Tyr Gly Gln Met Gln Cys Tyr
 50 55 60

 <210> 106
 <211> 123
 20 <212> ADN
 <213> *Agrotis ipsilon*

 <220>
 25 <221> CDS
 <222> (1)...(123)

 <221> rasgo_misc
 30 <222> (0)...(0)
 <223> Fus7

 <400> 106
 35 gtc cat gtg gga ccc tgc gac cag gtc tgc agc cgc atc gac gct gag 48
 Val His Val Gly Pro Cys Asp Gln Val Cys Ser Arg Ile Asp Ala Glu
 1 5 10 15

 40 aag gac gag tgc tgc aga gct cac ggc cac tcc ggc tac agc agc tgc 96
 Lys Asp Glu Cys Cys Arg Ala His Gly His Ser Gly Tyr Ser Ser Cys
 20 25 30

 aga tac gga cag atg caa tgt tac tga 123
 Arg Tyr Gly Gln Met Gln Cys Tyr *
 35 40
 45

 <210> 107
 <211> 40
 <212> PRT
 50 <213> *Agrotis ipsilon*

 <400> 107

 55 Val His Val Gly Pro Cys Asp Gln Val Cys Ser Arg Ile Asp Ala Glu
 1 5 10 15
 Lys Asp Glu Cys Cys Arg Ala His Gly His Ser Gly Tyr Ser Ser Cys
 20 25 30
 Arg Tyr Gly Gln Met Gln Cys Tyr
 35 40
 60

 <210> 108
 <211> 361
 <212> ADN
 65 <213> *Agrotis ipsilon*

ES 2 300 440 T3

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(195)

5

<221> rasgo_misc

<222> (0)...(0)

<223> Fus8

10

<221> rasgo_misc

<222> 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333

<223> n = A, T, C o G

15

<400> 108

20

atg gtt gcc aac aag acc atc ttc ctt ctc gtg ctg atc gcc ttc gca 48
Met Val Ala Asn Lys Thr Ile Phe Leu Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala
1 5 10 15

25

atg gtg atg gtg acc gtg gag gcc gtc cgt gtg gga ccc tgc gac cag 96
Met Val Met Val Thr Val Glu Ala Val Arg Val Gly Pro Cys Asp Gln
20 25 30

gtc tgc agc cgc atc gac gct gag aag gac gag tgc tgc aga gct cac 144
Val Cys Ser Arg Ile Asp Ala Glu Lys Asp Glu Cys Cys Arg Ala His
35 40 45

30

ggc cac tcc ggc tac agc agc tgc aga tac gga cag atg caa tgt tac 192
Gly His Ser Gly Tyr Ser Ser Cys Arg Tyr Gly Gln Met Gln Cys Tyr
50 55 60

35

tga cggaactccg caacgacaac ggtactatag tggagctact gtgtaacttc 245
*

tctaaatttc tattactttc gaattcggca tgtgataaag ttattgttta ataaaaggaa 305
ttattttataa aaaaaaaaaa annnnnnnnaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaa 361

40

<210> 109

<211> 64

<212> PRT

45

<213> *Agrotis ipsilon*

<400> 109

50

Met Val Ala Asn Lys Thr Ile Phe Leu Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala
1 5 10 15

Met Val Met Val Thr Val Glu Ala Val Arg Val Gly Pro Cys Asp Gln
20 25 30

Val Cys Ser Arg Ile Asp Ala Glu Lys Asp Glu Cys Cys Arg Ala His
35 40 45

55

Gly His Ser Gly Tyr Ser Ser Cys Arg Tyr Gly Gln Met Gln Cys Tyr
50 55 60

<210> 110

<211> 123

60

<212> ADN

<213> *Agrotis ipsilon*

<220>

65

<221> CDS

<222> (1)...(123)

ES 2 300 440 T3

<221> rasgo_misc

<222> (0)...(0)

<223> Fus8

5

<400> 110

```

10      gtc cgt gtg gga ccc tgc gac cag gtc tgc agc cgc atc gac gct gag   48
      Val Arg Val Gly Pro Cys Asp Gln Val Cys Ser Arg Ile Asp Ala Glu
          1              5              10              15

      aag gac gag tgc tgc aga gct cac ggc cac tcc ggc tac agc agc tgc   96
      Lys Asp Glu Cys Cys Arg Ala His Gly His Ser Gly Tyr Ser Ser Cys
          20              25              30

      aga tac gga cag atg caa tgt tac tga   123
      Arg Tyr Gly Gln Met Gln Cys Tyr  *
          35              40

```

20

<210> 111

<211> 40

<212> PRT

25 <213> *Agrotis ipsilon*

<400> 111

```

30      Val Arg Val Gly Pro Cys Asp Gln Val Cys Ser Arg Ile Asp Ala Glu
          1              5              10              15
      Lys Asp Glu Cys Cys Arg Ala His Gly His Ser Gly Tyr Ser Ser Cys
          20              25              30
      Arg Tyr Gly Gln Met Gln Cys Tyr
          35              40

```

35

<210> 112

40 <211> 466

<212> ADN

<213> *Agrotis ipsilon*

45 <220>

<221> CDS

<222> (1)...(291)

50 <221> rasgo_misc

<222> (0)...(0)

<223> Fus9

55

60

65

ES 2 300 440 T3

<400> 112

```

5      atg aac aag caa ctg tta gtc gtc ctt ttg gcc atg tgc ctt gtc agc 48
      Met Asn Lys Gln Leu Leu Val Val Leu Leu Ala Met Cys Leu Val Ser
      1          5          10          15

      gct cac gct ttc gtg aaa cgc gat gtc cca aca aat gca gac tta cag 96
      Ala His Ala Phe Val Lys Arg Asp Val Pro Thr Asn Ala Asp Leu Gln
      20          25          30

10     gga caa cta gaa gcc ttg aga aac acc ctt aat cag tta acc aac tca 144
      Gly Gln Leu Glu Ala Leu Arg Asn Thr Leu Asn Gln Leu Thr Asn Ser
      35          40          45

15     gtc att aat caa act tca act gtt ttc gac ccg gaa gaa att aag aag 192
      Val Ile Asn Gln Thr Ser Thr Val Phe Asp Pro Glu Glu Ile Lys Lys
      50          55          60

20     aat atc gat aaa gcc att gac aca gct agc aaa gcc att gat agt tta 240
      Asn Ile Asp Lys Ala Ile Asp Thr Ala Ser Lys Ala Ile Asp Ser Leu
      65          70          75          80

      gtg aaa cca caa gga gga gaa gcc cag ccc gct gcc cag cca gca gcc 288
      Val Lys Pro Gln Gly Gly Glu Ala Gln Pro Ala Ala Gln Pro Ala Ala
      85          90          95

25     taa ttttatgttt aagactgatt tttatgacca cataaaatac ctcaaataaa 341
      *

      acatcaaaat taatctgctt cttcctatct ttcagaaaac taaattaaat aaataattta 401
      tacgtctgct taaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 461
      aaaaaa 466

```

<210> 113

<211> 96

<212> PRT

<213> *Agrotis ipsilon*

<400> 113

```

40     Met Asn Lys Gln Leu Leu Val Val Leu Leu Ala Met Cys Leu Val Ser
      1          5          10          15
      Ala His Ala Phe Val Lys Arg Asp Val Pro Thr Asn Ala Asp Leu Gln
      20          25          30
      Gly Gln Leu Glu Ala Leu Arg Asn Thr Leu Asn Gln Leu Thr Asn Ser
45     35          40          45
      Val Ile Asn Gln Thr Ser Thr Val Phe Asp Pro Glu Glu Ile Lys Lys
      50          55          60
      Asn Ile Asp Lys Ala Ile Asp Thr Ala Ser Lys Ala Ile Asp Ser Leu
      65          70          75          80
      Val Lys Pro Gln Gly Gly Glu Ala Gln Pro Ala Ala Gln Pro Ala Ala
50     85          90          95

```

<210> 114

<211> 222

<212> ADN

<213> *Agrotis ipsilon*

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(222)

<221> rasgo_misc

<222> (0)...(0)

<223> Fus9

ES 2 300 440 T3

<400> 114

```

5      gat gtc cca aca aat gca gac tta cag gga caa cta gaa gcc ttg aga   48
      Asp Val Pro Thr Asn Ala Asp Leu Gln Gly Gln Leu Glu Ala Leu Arg
      1          5          10          15

      aac acc ctt aat cag tta acc aac tca gtc att aat caa act tca act   96
      Asn Thr Leu Asn Gln Leu Thr Asn Ser Val Ile Asn Gln Thr Ser Thr
      20          25          30

10     gtt ttc gac ccg gaa gaa att aag aag aat atc gat aaa gcc att gac   144
      Val Phe Asp Pro Glu Glu Ile Lys Lys Asn Ile Asp Lys Ala Ile Asp
      35          40          45

      aca gct agc aaa gcc att gat agt tta gtg aaa cca caa gga gga gaa   192
      Thr Ala Ser Lys Ala Ile Asp Ser Leu Val Lys Pro Gln Gly Gly Glu
      50          55          60

      gcc cag ccc gct gcc cag cca gca gcc taa   222
      Ala Gln Pro Ala Ala Gln Pro Ala Ala *
      65          70
20

```

<210> 115

<211> 73

25 <212> PRT

<213> *Agrotis ipsilon*

<400> 115

```

30      Asp Val Pro Thr Asn Ala Asp Leu Gln Gly Gln Leu Glu Ala Leu Arg
      1          5          10          15

      Asn Thr Leu Asn Gln Leu Thr Asn Ser Val Ile Asn Gln Thr Ser Thr
      20          25          30

35     Val Phe Asp Pro Glu Glu Ile Lys Lys Asn Ile Asp Lys Ala Ile Asp
      35          40          45

      Thr Ala Ser Lys Ala Ile Asp Ser Leu Val Lys Pro Gln Gly Gly Glu
      50          55          60

      Ala Gln Pro Ala Ala Gln Pro Ala Ala
      65          70
40

```

<210> 116

45 <211> 372

<212> ADN

<213> *Agrotis ipsilon*

50 <220>

<221> CDS

<222> (1)...(222)

<221> rasgo_misc

55 <222> (0)...(0)

<223> Fus10

<221> rasgo_misc

60 <222> 242

<223> n = A, T, C o G

65

ES 2 300 440 T3

<400> 116

```

5      atg tcg aaa agc tac cag tcc gtg ttg ttg ttg gtg tgc ctc acg ttc 48
      Met Ser Lys Ser Tyr Gln Ser Val Leu Leu Leu Val Cys Leu Thr Phe
        1          5          10          15

      ctg gtg atc gtc tgc tct ccg cag aat gct gtc cag gct gat gta cac 96
      Leu Val Ile Val Ser Ser Pro Gln Asn Ala Val Gln Ala Asp Val His
        20          25          30

10     atc ggc agc tgc gtg tgg gga gct gtt gac tac act tcg aac tgc aac 144
      Ile Gly Ser Cys Val Trp Gly Ala Val Asp Tyr Thr Ser Asn Cys Asn
        35          40          45

      aat gaa tgc aag cgg cgt gga tac aaa gga gga cat tgt gga agc ttc 192
      Asn Glu Cys Lys Arg Arg Gly Tyr Lys Gly Gly His Cys Gly Ser Phe
        50          55          60

      gct aat gtt aat tgt tgg tgt gaa caa tag gacaacaatt taacattagn 242
      Ala Asn Val Asn Cys Trp Cys Glu Gln *
        65          70

20     acactaaaca aaccatcaaa atttgcagac gtggacacct ttcatagttt ttataccttg 302
      tcactatggt ggatggacta tcaaaatggt tcatgatttt gaaatttgta tctttaatct 362
      cggactgatg 372

```

<210> 117

<211> 73

<212> PRT

<213> *Agrotis ipsilon*

<400> 117

```

35     Met Ser Lys Ser Tyr Gln Ser Val Leu Leu Leu Val Cys Leu Thr Phe
        1          5          10          15
      Leu Val Ile Val Ser Ser Pro Gln Asn Ala Val Gln Ala Asp Val His
        20          25          30
      Ile Gly Ser Cys Val Trp Gly Ala Val Asp Tyr Thr Ser Asn Cys Asn
        35          40          45
40     Asn Glu Cys Lys Arg Arg Gly Tyr Lys Gly Gly His Cys Gly Ser Phe
        50          55          60
      Ala Asn Val Asn Cys Trp Cys Glu Gln
        65          70

```

<210> 118

<211> 135

<212> ADN

<213> *Agrotis ipsilon*

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(135)

<221> rasgo_misc

<222> (0)...(0)

<223> Fus10

ES 2 300 440 T3

<400> 118

```

5      gat gta cac atc ggc agc tgc gtg tgg gga gct gtt gac tac act tcg   48
      Asp Val His Ile Gly Ser Cys Val Trp Gly Ala Val Asp Tyr Thr Ser
        1           5           10           15

      aac tgc aac aat gaa tgc aag cgg cgt gga tac aaa gga gga cat tgt   96
      Asn Cys Asn Asn Glu Cys Lys Arg Arg Gly Tyr Lys Gly Gly His Cys
        20           25           30

10     gga agc ttc gct aat gtt aat tgt tgg tgt gaa caa tag               135
      Gly Ser Phe Ala Asn Val Asn Cys Trp Cys Glu Gln  *
        35           40

```

15 <210> 119

<211> 44

<212> PRT

20 <213> *Agrotis ipsilon*

<400> 119

```

25     Asp Val His Ile Gly Ser Cys Val Trp Gly Ala Val Asp Tyr Thr Ser
        1           5           10           15
      Asn Cys Asn Asn Glu Cys Lys Arg Arg Gly Tyr Lys Gly Gly His Cys
        20           25           30
      Gly Ser Phe Ala Asn Val Asn Cys Trp Cys Glu Gln
        35           40

```

30

<210> 120

<211> 243

35 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

40 <223> Secuencia de nucleótidos con uso no aleatorio de codones que codifica BAA-Fus1. Uso no aleatorio de codones para *Manduca sexta*.

<221> CDS

45 <222> (1)...(243)

<221> sig_péptido

<222> (1)...(72)

50 <223> Secuencia señal BAA

<221> rasgo_misc

<222> (0)...(0)

55 <223> BAA-Fus1

60

65

ES 2 300 440 T3

<400> 120

```

5      atg gca aac aag cat ttg agc ctg agc ctc ttt ttg gtt ctg cta gga 48
      Met Ala Asn Lys His Leu Ser Leu Ser Leu Phe Leu Val Leu Leu Gly
      -20 -15 -10

      ctg tca gcc tcg ctt gct agt ggt gaa gac ccc aga tgt tcc caa ccg 96
      Leu Ser Ala Ser Leu Ala Ser Gly Glu Asp Pro Arg Cys Ser Gln Pro
      -5 1 5

10     atc gct tcc ggc gtg tgc ttc ggc aac att gag aag ttc gga tat gat 144
      Ile Ala Ser Gly Val Cys Phe Gly Asn Ile Glu Lys Phe Gly Tyr Asp
      10 15 20

      atc gac gag cac aaa tgc gtg cag ttt gta tac ggg ggc tgc ttc ggt 192
      Ile Asp Glu His Lys Cys Val Gln Phe Val Tyr Gly Gly Cys Phe Gly
      25 30 35 40

      aat gat aac caa ttc gac tct ctg gag gaa tgc cag gcg gtc tgt cct 240
      Asn Asp Asn Gln Phe Asp Ser Leu Glu Glu Cys Gln Ala Val Cys Pro
      45 50 55

20     taa 243
      *
```

<210> 121

<211> 80

25 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

30 <221> SEÑAL

<222> (1)...(24)

35 <223> Secuencia de nucleótidos con uso no aleatorio de codones que codifica BAA-Fus1. Uso no aleatorio de codones para *Manduca sexta*.

<400> 121

```

40     Met Ala Asn Lys His Leu Ser Leu Ser Leu Phe Leu Val Leu Leu Gly
      -20 -15 -10
      Leu Ser Ala Ser Leu Ala Ser Gly Glu Asp Pro Arg Cys Ser Gln Pro
      -5 1 5
      Ile Ala Ser Gly Val Cys Phe Gly Asn Ile Glu Lys Phe Gly Tyr Asp
      10 15 20
      Ile Asp Glu His Lys Cys Val Gln Phe Val Tyr Gly Gly Cys Phe Gly
      25 30 35 40
      Asn Asp Asn Gln Phe Asp Ser Leu Glu Glu Cys Gln Ala Val Cys Pro
      45 50 55
```

<210> 122

50 <211> 171

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

55 <220>

<223> Secuencia de nucleótidos con uso no aleatorio de codones que codifica BAA-Fus1. Uso no aleatorio de codones para *Manduca sexta*.

60 <221> rasgo_misc

<222> (0) ... (0)

<223> Fus1

65 <221> CDS

<222> (1)... (171)

ES 2 300 440 T3

<400> 122

```

5      gaa gac ccc aga tgt tcc caa ccg atc gct tcc ggc gtg tgc ttc ggc   48
      Glu Asp Pro Arg Cys Ser Gln Pro Ile Ala Ser Gly Val Cys Phe Gly
      1          5          10          15

      aac att gag aag ttc gga tat gat atc gac gag cac aaa tgc gtg cag   96
      Asn Ile Glu Lys Phe Gly Tyr Asp Ile Asp Glu His Lys Cys Val Gln
      20          25          30

10     ttt gta tac ggg ggc tgc ttc ggt aat gat aac caa ttc gac tct ctg   144
      Phe Val Tyr Gly Gly Cys Phe Gly Asn Asp Asn Gln Phe Asp Ser Leu
      35          40          45

      gag gaa tgc cag gcg gtc tgt cct taa   171
      Glu Glu Cys Gln Ala Val Cys Pro *
      50          55

```

<210> 123

<211> 80

<212> PRT

20 <213> Secuencia Artificial

<220>

25 <223> BAA-Fus1

<221> SEÑAL

<222> (1)...(24)

30 <223> BAA

<400> 123

```

35     Met Ala Asn Lys His Leu Ser Leu Ser Leu Phe Leu Val Leu Leu Gly
      -20          -15          -10
      Leu Ser Ala Ser Leu Ala Ser Gly Glu Asp Pro Arg Cys Ser Gln Pro
      -5          1          5
      Ile Ala Ser Gly Val Cys Phe Gly Asn Ile Glu Lys Phe Gly Tyr Asp
      10          15          20
      Ile Asp Glu His Lys Cys Val Gln Phe Val Tyr Gly Gly Cys Phe Gly
      25          30          35          40
      Asn Asp Asn Gln Phe Asp Ser Leu Glu Glu Cys Gln Ala Val Cys Pro
      45          50          55

```

<210> 124

45 <211> 207

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

50 <220>

<223> Secuencia de nucleótidos con uso no aleatorio de codones que codifica BAA-Fus2. Uso no aleatorio de codones para *Streptomyces coelicolor*.

55 <221> CDS

<222> (1)...(207)

<221> sig_péptido

60 <222> (1)...(75)

<223> secuencia señal BAA

<221> rasgo_misc

65 <222> (0)..(0)

<223> BAA-Fus2

ES 2 300 440 T3

<400> 124

```

5      atg gcg aac aag cac ctg tcc ctc tcc ctc ttc ctg gtc ctg ctg ggc  48
      Met Ala Asn Lys His Leu Ser Leu Ser Leu Phe Leu Val Leu Leu Gly
      -25                -20                -15                -10

      ctc tcg gcg acc ccg tcc gcc cag gcg gac gcc ggc gac gag ccg ctg  96
      Leu Ser Ala Thr Pro Ser Ala Gln Ala Asp Ala Gly Asp Glu Pro Leu
                        -5                1                5

10     tgg ctg tac cag ggc gac gac cac ccc aga gcc ccg agc agc ggg gac 144
      Trp Leu Tyr Gln Gly Asp Asp His Pro Arg Ala Pro Ser Ser Gly Asp
                        10                15                20

15     cac ccg gtg ctc ccc tcg atc atc gac gac gtc aag ctg gac ccc aac 192
      His Pro Val Leu Pro Ser Ile Ile Asp Asp Val Lys Leu Asp Pro Asn
                        25                30                35

      cgg cgc tac gcc tga
      Arg Arg Tyr Ala *
20     40
  
```

<210> 125

<211> 68

25 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

30 <221> SIGNAL

<222> (1)...(25)

<223> Secuencia de nucleótidos con uso no aleatorio de codones que codifica BAA-Fus2. Uso no aleatorio de codones para *Streptomyces coelicolor*.

35

<400> 125

```

40     Met Ala Asn Lys His Leu Ser Leu Ser Leu Phe Leu Val Leu Leu Gly
      -25                -20                -15                -10
      Leu Ser Ala Thr Pro Ser Ala Gln Ala Asp Ala Gly Asp Glu Pro Leu
                        -5                1                5
      Trp Leu Tyr Gln Gly Asp Asp His Pro Arg Ala Pro Ser Ser Gly Asp
                        10                15                20
      His Pro Val Leu Pro Ser Ile Ile Asp Asp Val Lys Leu Asp Pro Asn
                        25                30                35
      Arg Arg Tyr Ala
      40
  
```

<210> 126

50 <211> 132

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

55 <220>

<223> Secuencia de nucleótidos con uso no aleatorio de codones que codifica Fus2. Uso no aleatorio de codones para *Streptomyces coelicolor*.

60 <221> CDS

<222> (1)...(132)

<221> rasgo_misc

65 <222> (0)...(0)

<223> Fus2

ES 2 300 440 T3

<400> 126

```

5      gac gcc ggc gac gag ccg ctg tgg ctg tac cag ggc gac gac cac ccc  48
      Asp Ala Gly Asp Glu Pro Leu Trp Leu Tyr Gln Gly Asp Asp His Pro

      1          5          10          15

10     aga gcc ccg agc agc ggg gac cac ccg gtg ctc ccc tcg atc atc gac  96
      Arg Ala Pro Ser Ser Gly Asp His Pro Val Leu Pro Ser Ile Ile Asp
              20          25          30

      gac gtc aag ctg gac ccc aac cgg cgc tac gcc tga  132
      Asp Val Lys Leu Asp Pro Asn Arg Arg Tyr Ala  *
              35          40

```

<210> 127

<211> 68

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de nucleótidos con uso no aleatorio de codones que codifica BAA-Fus2. Uso no aleatorio de codones para *Streptomyces coelicolor*.

<221> SEÑAL

<222> (1)...(25)

<223> BAA

<400> 127

```

35     Met Ala Asn Lys His Leu Ser Leu Ser Leu Phe Leu Val Leu Leu Gly
      -25          -20          -15          -10
      Leu Ser Ala Thr Pro Ser Ala Gln Ala Asp Ala Gly Asp Glu Pro Leu
              -5          1          5
40     Trp Leu Tyr Gln Gly Asp Asp His Pro Arg Ala Pro Ser Ser Gly Asp
              10          15          20
      His Pro Val Leu Pro Ser Ile Ile Asp Asp Val Lys Leu Asp Pro Asn
              25          30          35
      Arg Arg Tyr Ala
      40

```

45

50

55

60

65