

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 383 997**

51 Int. Cl.:
C12N 15/32 (2006.01)
C07K 14/325 (2006.01)
A01N 63/00 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)
C12R 1/07 (2006.01)
A01H 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08103076 .9**
96 Fecha de presentación: **06.05.1999**
97 Número de publicación de la solicitud: **1944372**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **16.07.2008**

54 Título: **Nuevas toxinas plaguicidas y secuencias de nucleótidos que codifican estas toxinas**

30 Prioridad:
06.05.1998 US 73898

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
28.06.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
28.06.2012

73 Titular/es:
**MYCOGEN CORPORATION
9330 ZIONSVILLE ROAD
INDIANAPOLIS, IN 46268, US**

72 Inventor/es:
**Feitelson, Jerald S; Schnepf, H. Ernest;
Narva, Kenneth E.; Stockhoff, Brian A.;
Schmeits, James; Loewer, David;
Dullum, Charles Joseph; Muller-Cohn, Judy;
Morera, Lisa M.; Morrill, George y
Finstad-Lee, Stacey**

74 Agente/Representante:
de Elzaburu Márquez, Alberto

ES 2 383 997 T3

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

DESCRIPCIÓN

Nuevas toxinas plaguicidas y secuencias de nucleótidos que codifican estas toxinas.

Antecedentes de la invención

5 Los insectos y otras plagas cuestan a los agricultores miles de millones de dólares anualmente en pérdidas de cosechas y gastos para mantener bajo control estas plagas. Las pérdidas causadas por las plagas de insectos en los medios de producción agrícola incluyen la disminución del rendimiento de la cosecha, la disminución de la calidad de la cosecha y el aumento de los costes de recogida de la cosecha.

10 Procedimientos de cultivo tales como la rotación de cultivos y la aplicación de niveles de nitrógeno altos para estimular el crecimiento de un sistema de raíz adventicia se han enfrentado parcialmente a los problemas causados por las plagas agrícolas. Los demandas económicas sobre la utilización del campo de cultivo restringen el uso de la rotación de cultivos. Además, las características de algunos insectos de mantenerse vivos durante el invierno rompen en algunas zonas las rotaciones de la cosecha. Así, los insecticidas químicos son a los sumo capaces de garantizar el nivel deseado de control. Los insecticidas son aplicados sobre el suelo o incorporados al suelo.

15 El uso de insecticidas químicos tiene varios inconvenientes. El uso continuo de insecticidas ha permitido la generación de insectos resistentes. Situaciones tales como poblaciones extremadamente grandes de larvas, lluvias fuertes y un calibrado inapropiado del equipo para aplicar el insecticida pueden dar por resultado un mal control. Con frecuencia, el uso de insecticidas genera preocupaciones tales como contaminación del suelo y de suministro del agua tanto superficial como subterránea. El público también se ha preocupado por la cantidad de productos sintéticos residuales que se pueden encontrar en los alimentos. El trabajo con insecticidas también puede suponer riesgos para las personas que los aplican. Por tanto, se están examinando crecientemente los plaguicidas químicos sintéticos en cuanto a sus potenciales consecuencias tóxicas ambientales. Entre los ejemplos de plaguicidas químicos sintéticos extensamente usados figuran los compuestos organocloro, por ejemplo, DDT, mirex, kepone, lindano, aldrina, clordano, aldicarb y dieldrina; los organofosfatos, por ejemplo, clorpirifos, paratión, malatión y diazinón; y carbamatos. Nuevas restricciones exigentes sobre el uso de plaguicidas y la eliminación del mercado de algunos plaguicidas eficaces podrían limitar opciones económicas y eficaces para controlar daños y plagas costosas.

30 A causa de los problemas asociados con el uso de plaguicidas orgánicos químicos sintéticos, existe una clara necesidad de limitar el uso de estos agentes y una necesidad de identificar agentes de control alternativos. La sustitución de plaguicidas químicos sintéticos, o una combinación de estos agentes con plaguicidas biológicos, podría reducir los niveles de productos químicos tóxicos en el ambiente.

35 Un agente plaguicida biológico que goza de una popularidad creciente es el microbio del suelo *Bacillus thuringiensis* (*B.t.*). El microbio del suelo *Bacillus thuringiensis* (*B.t.*) es una bacteria Gram positiva que forma esporas. La mayoría de las cepas de *B.t.* no exhiben actividad plaguicida. Algunas cepas de *B.t.* producen inclusiones de proteína paraesporales cristalinas y se pueden caracterizar por ellas. A menudo, estas inclusiones aparecen microscópicamente como cristales conformados distintivamente. Algunas proteínas de *B.t.* son muy tóxicas para plagas tales como insectos y son específicas en cuanto a su actividad tóxica. Ciertas proteínas de *B.t.* insecticidas están asociadas con las inclusiones. Estas β -endotoxinas son diferentes de las exotoxinas, que tienen una gama huésped no específica. Otras especies de *Bacillus* también producen proteínas plaguicidas.

40 Se han aislado y secuenciado ciertos genes de toxina de *Bacillus* y se han producido y aprobado para uso productos basados en ADN recombinante. Además, con el uso de técnicas de ingeniería genética se están desarrollando nuevos enfoques para suministrar estas toxinas a ambientes agrícolas. Entre ellas figuran el uso de plantas generadas por ingeniería genética con genes de toxina para resistencia a insectos y el uso de células microbianas intactas como vehículos para suministro de toxinas. Así, los genes de toxina aislados de *Bacillus* están llegando a ser comercialmente valiosos.

45 Hasta los últimos quince años, el uso de plaguicidas de *B.t.* ha estado restringido en gran medida a la selección de dianas de una gama estrecha de plagas de lepidópteros (oruga). Durante muchos años se han usado como insecticidas comerciales para plagas de lepidópteros preparaciones de las esporas y cristales de *B. thuringiensis*, subesp. *kurstaki*. Por ejemplo, *B. thuringiensis*, var. *kurstaki* HD-1 produce una β endotoxina que es tóxica para las larvas de varios insectos de lepidópteros.

50 En los últimos años, sin embargo, los investigadores han descubierto plaguicidas de *B.t.* con especificidad para una gama mucho más amplia de plagas. Por ejemplo, se han usado otras especies de *B.t.*, a saber, *israelensis* y *morrisoni* (a.k.a. *tenebrionis*, a.k.a. *B.t.*, M-7, a.k.a. *B.t. san diego*) para controlar insectos de los órdenes Díptera y Coleoptera, respectivamente. Se ha dado cuenta de que *B. thuringiensis*, var. *tenebrionis* es activo frente a

escarabajos del orden Coleoptera (escarabajo de la patata de Colorado, *Leptinotarsa decemlineata* y *Agelastica alni*).

Más recientemente se han identificado nuevas especies de *B.t.* y se han aislado genes responsables de las proteínas de δ -endotoxina. Höfte y Whiteley clasificaron los genes de proteína cristalina de *B.t.* en cuatro clases principales (Höfte, H., H.R. Whiteley [1989], *Microbiological Reviews*, 52(2).242-255). Las clases son (CryI (específica para lepidópteros), CryII (específica para lepidópteros y dípteros), CryIII (específica para coleópteros) y CryIV (específica para dípteros). Se ha dado cuenta del descubrimiento de cepas específicamente tóxicas para otras plagas. Por ejemplo, se ha propuesto que CryV y CryVI designen una clase de genes de toxina que son específicos para nematodos.

La nomenclatura de 1989 y el esquema de clasificación de Höfte y Whiteley para proteínas cristalinas estaban basados en la secuencia de aminoácidos deducida y la gama huésped de la toxina. Ese sistema se adaptó para cubrir 14 tipos diferentes de genes de toxina que se dividieron en cinco clases importantes. El número de genes de proteína cristalina de *Bacillus thuringiensis* secuenciados es actualmente de más de 50. Se ha propuesto un esquema de nomenclatura revisado basado únicamente en la identidad de aminoácidos (Crickmores y otros, [1996], *Society for Invertebrate Pathology, 29th Annual Meeting, 11th International Colloquium on Bacillus thuringiensis*, Universidad de Córdoba, Córdoba, España, 1-6 de septiembre de 1996, resumen). El término nemotécnico "cry" se ha conservado para todos los genes de toxina excepto para *cytA* y *cytB* que permanecen como clase separada. En la primera fila se han intercambiado los números romanos por números arábigos y se han eliminado los paréntesis en la tercera fila. Se han conservado muchos de los nombres originales con las excepciones indicadas, aunque se han reclasificado algunos.

Se han identificado ahora muchos otros genes de *B.t.* Los documentos WO 94/21795, WO 96/10083, WO 98/44137, y Estruch., J.J. y otros (1996) *PNAS* 93:5389-5393 describen las toxinas Vip1A(a), Vip1A(b), Vip2A(a), Vip2A(b), Vip3A(a) y Vip3A(b) obtenidas de microbios *Bacillus*. Se ha indicado que estas toxinas se producen durante el crecimiento celular vegetativo y por ello se denominaron proteínas insecticidas vegetativas (VIP). Se ha dado cuenta de la actividad de estas toxinas frente a ciertas plagas de lepidópteros y coleópteros. El documento WO 98/18932 da a conocer nuevas clases de toxinas plaguicidas.

Entre los obstáculos para el uso exitoso de toxinas de *Bacillus* figuran el desarrollo de resistencia a las toxinas de *B.t.* por los insectos. Además, ciertos insectos pueden ser refractarios a los efectos de las toxinas de *Bacillus*. Entre ellos figuran insectos tales como picudo del algodón (Anthonomus grandis) y larva Agrotis, así como insectos de la mayoría de especies que hasta el momento han demostrado no tener una sensibilidad significativa a las δ -endotoxinas de *B.t.* Si bien actualmente tienen gran interés las técnicas de control de la resistencia en la tecnología de plantas transgénicas, sigue habiendo una gran necesidad del desarrollo de genes adicionales que se puedan expresar en plantas con el fin de controlar eficazmente diversos insectos.

El documento WO 98/00546 describe cebadores y sondas para cepas de *Bacillus thuringiensis*.

El documento WO 98/18932 describe toxinas SUP-1 de dos cepas de *Bacillus thuringiensis*, PS49C y PS 158C2 que son activas frente a *Heliothis virescens* y *Helicoverpa zea*.

Sumario de la invención

Un primer aspecto de la presente invención es una proteína que es activa frente a la plaga de lepidópteros, que tiene una identidad de al menos 95% con la secuencia de aminoácidos de la SEC. ID NO.3. Preferiblemente, la proteína comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC. ID NO.3

Un segundo aspecto de la presente invención es un polinucleótido que codifica una proteína de la invención. Por ejemplo, el polinucleótido comprende la SEC. ID NO. 2. Las secuencias se dan más adelante.

Otros aspectos de la invención son células microbianas, y también plantas, que comprenden un polinucleótido de la invención, y plantas que comprenden el polinucleótido. Otro aspecto de la invención es un procedimiento para controlar una plaga de lepidóptero, que comprende poner en contacto la plaga con una proteína de la invención.

La transformación de plantas con las construcciones genéticas descritas aquí se puede realizar usando métodos bien conocidos por los expertos en la técnica y típicamente implican modificación del gen para optimizar la expresión de la toxina en plantas.

Para controlar las plagas se pueden usar los microbios recombinantes que expresan las toxinas descritas aquí. A este respecto, la invención incluye el tratamiento de células de *Bacillus* sustancialmente intactas y/o células recombinantes que contienen la toxinas expresadas de la invención, tratadas para prolongar la actividad plaguicida cuando las células intactas se aplican al medio ambiente da la plaga diana. La célula tratada actúa como un revestimiento protector para la toxina plaguicida. La toxina se hace activa después de que la digiere el insecto diana.

Descripción detallada de la invención

Las toxinas de acuerdo con la invención se denominan toxinas de tipo SUP. Típicamente, estas toxinas son solubles y se pueden obtener a partir del material sobrenadante de cultivos de *Bacillus* como se describe aquí. Las toxinas SUP típicamente tienen un tamaño de aproximadamente 70-100 kDa y, preferiblemente, de aproximadamente 80 kDa. La familia SUP se ejemplifica aquí por toxinas del aislado KB59A4-6. Este aislado se ha depositado en la colección permanente de la Agricultural Research Service Patente Culture Collection (NRRL), Northern Regional Research Center, 1815 North University Street, Peoria, Illinois 61604, USA. El número de depósito de esta cepa de *B.t.* es NRRL B-30173.

Una persona experta en esta técnica sabe que los genes que codifican toxinas activas se pueden codificar y obtener por diversos medios.

Estos genes, o porciones o variantes de los mismos, se pueden también construir sintéticamente, por ejemplo, usando un sintetizador de genes. Las variaciones de genes se pueden construir fácilmente usando técnicas estándar para hacer mutaciones puntuales. También se pueden hacer fragmentos de estos genes usando exonucleasas o endonucleasas comercialmente disponibles de acuerdo con procedimientos estándar. Por ejemplo, se pueden usar enzimas tales como *Bal31* o mutagénesis dirigida al sitio para cortar sistemáticamente nucleótidos de los extremos de estos genes. También se pueden obtener genes que codifican fragmentos activos usando una variedad de enzimas de restricción. Se pueden usar proteasas para obtener directamente fragmentos activos de estas toxinas.

Toxinas equivalentes y/o genes que codifican estas toxinas equivalentes se pueden derivar de aislados de *Bacillus* y/o bibliotecas de ADN usando las enseñanzas proporcionadas aquí. Hay diversos procedimientos para obtener las toxinas plaguicidas de la presente invención. Por ejemplo, se pueden usar anticuerpos de las toxinas plaguicidas descritas y reivindicadas aquí para identificar y aislar toxinas de una mezcla de proteínas. Específicamente, se pueden incorporar anticuerpos a las porciones de toxinas que son las más constantes y diferenciadas de otras toxinas de *Bacillus*. Estos anticuerpos se pueden usar para identificar específicamente toxinas equivalentes con la actividad característica por inmunoprecipitación, ensayo inmunoabsorbente ligado a una enzima (ELISA) o transferencia western. Los anticuerpos para las toxinas descritas aquí o toxinas equivalentes, o fragmentos de estas toxinas se pueden preparar fácilmente usando procedimientos estándar en esta técnica. Los genes que codifican estas toxinas se pueden obtener luego del microorganismo.

Los fragmentos y equivalentes que retienen la actividad plaguicida de las toxinas ejemplificadas están dentro del alcance de la invención. También, a causa de la redundancia del código genético, una variedad de diferentes secuencias del ADN pueden codificar las secuencias de aminoácidos descritas aquí. También, corresponde a la habilidad de una persona experimentada en la técnica crear estas secuencias alternativas de ADN que codifican las mismas o esencialmente las mismas toxinas. Estas secuencias variantes de ADN están dentro del alcance de la presente invención. Tal como se usa aquí, la referencia a "esencialmente la misma" secuencia se refiere a secuencias que tienen, sustituciones, supresiones, adiciones o inserciones de aminoácidos que no afectan materialmente a la actividad plaguicida. También están incluidos en esta definición los fragmentos que retienen la actividad plaguicida.

Otro procedimiento para identificar las toxinas y genes de la presente invención es el uso de sondas de oligonucleótidos. Estas sondas son secuencias de nucleótidos detectables. Las sondas proporcionan un procedimiento rápido para identificar genes que identifican toxinas de la presente invención. Los segmentos de nucleótidos que se usan como sondas de acuerdo con la invención se pueden sintetizar usando un sintetizador de ADN y procedimientos estándar.

Se han dado específicamente aquí ejemplos de ciertas toxinas de la presente invención. Puesto que estas toxinas son meramente ejemplos de la presente invención, debe entenderse fácilmente que la presente invención comprende toxinas variantes o equivalentes (y secuencias de nucleótidos que codifican toxinas equivalentes) que tienen la misma o similar actividad plaguicida de la toxina ejemplificada. Las toxinas equivalentes tendrán una homología de aminoácidos con una toxina ejemplificada de al menos 95%. Estas identidades se determinan usando técnicas de alineamiento estándar. La homología de aminoácidos será máxima en regiones críticas de la toxina que origina la actividad biológica o están implicadas en la determinación de la configuración tridimensional que es finalmente responsable de la actividad biológica. A este respecto, ciertas sustituciones de aminoácidos son aceptables y se puede considerar si estas sustituciones están en regiones que no afectan a la actividad o son sustituciones conservadoras de aminoácidos que no afectan a la configuración tridimensional de la molécula. Por ejemplo, los aminoácidos se pueden ordenar en las clases siguientes: no polares, polares no cargadas, básicas y ácidas. Las sustituciones conservadoras en las que un aminoácido de una clase es reemplazado con otro aminoácido del mismo tipo están comprendidas en el alcance de la presente invención siempre que la sustitución no altere materialmente la actividad biológica del compuesto. La Tabla I proporciona un listado de ejemplos de aminoácidos que pertenecen a cada clase.

Tabla I

Clase de aminoácido	Ejemplos de aminoácidos
No polar	Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Met, Phe, Trp
Polar no cargado	Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Gln
Ácido	Asp, Glu
Básico	Lys, Arg, His

5

10

En algunos casos también se pueden hacer sustituciones no conservadoras. El factor crítico es que estas sustituciones no deben aminorar significativamente la actividad biológica de la toxina.

Las δ -toxinas de la presente invención se pueden caracterizar también en términos de la forma y localización de las inclusiones de toxina, descritas antes.

15 Tal como se usa aquí, la referencia a polinucleótidos “aislados” y/o “purificados” se refiere a estas moléculas que no están asociadas con las otras moléculas con las que se encontrarían asociadas en la naturaleza. Así, la referencia a “aisladas y purificadas” significa la intervención de la “mano del hombre” como se describe aquí. Las toxinas y genes quiméricos implican también “la mano del hombre”.

20 **Huéspedes recombinantes.** Los genes que codifican toxinas de la presente invención se pueden introducir en una variedad de huéspedes microbianos o plantas. La expresión del gen de toxina da por resultado, directa o indirectamente, la producción y mantenimiento del plaguicida. Con huéspedes microbianos adecuados, por ejemplo, *Pseudomonas*, los microbios se pueden aplicar al sitio de la plaga donde proliferarán y serán digeridos. El resultado es un control de la plaga. Alternativamente, el microbio que aloja el gen de toxina se puede matar y tratar en condiciones que prolongan la actividad de la toxina y estabilizan la célula. La célula tratada, que retiene la actividad tóxica, se puede aplicar luego al ambiente de la plaga diana.

25

Cuando la toxina de *Bacillus* se introduce mediante un vector adecuado en el huésped microbiano y el mencionado huésped se aplica al ambiente en estado vivo, es esencial usar ciertos microbios huéspedes. Se seleccionan huéspedes de microorganismos que se sabe que ocupan la “fitosfera” (filoplano, filosfera, rizosfera y/o rizoplano) de una o varias cosechas de interés. Estos microorganismos se seleccionan de manera que sean capaces de competir con éxito en el ambiente particular (cosechas y otros hábitats de insectos) con los microorganismos de tipo salvaje, proporcionen el mantenimiento y expresión del gen que expresa el plaguicida de polipéptido y, deseablemente, proporcionen una protección mejorada del plaguicida frente a la degradación e inactivación ambiental.

30

35 Se conoce un gran número de microorganismos para inhibir el filoplano (la superficie de las hojas de la planta) y/o la rizosfera (el suelo que rodea las raíces de la planta) de una variedad de cultivos importantes. Entre estos microorganismos figuran bacterias, algas y hongos. Son de interés particular microorganismos tales como bacterias, por ejemplo, los géneros *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Serratia*, *Klebsiella*, *Xanthomonas*, *Streptomyces*, *Rhizobium*, *Rhodopseudomonas*, *Methylophilus*, *Agrobacterium*, *Acetobacter*, *Lactobacillus*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Leuconostoc* y *Alcaligenes*; hongos, en particular levaduras, por ejemplo los géneros *Saccharomyces*, *Cryptococcus*, *Kluyveromyces*, *Sporobolomyces*, *Rhodotorula* y *Aureobasidium*. Tienen un interés particular especies bacterianas de fitosfera tales como *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas fluorescens*, *Serratia marcescens*, *Acetobacter xylinum*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Rhodopseudomonas spheroides*, *Xanthomonas campestris*, *Rhizobium melioli*, *Alcaligenes entrophus* y *Azobacter vinlandii*; y especies de levaduras de fitosfera tales como *Rhodotorula rubra*, *R. glutinis*, *R. marina*, *R. aurantiaca*, *Cryptococcus albidus*, *C. diffluens*, *C. laurantii*, *Saccharomyces rosei*, *S. pretoriensis*, *S. cerevisiae*, *Sporobolomyces roseus*, *S. odorus*, *Kluyveromyces veronae* y *Aureobasidium pollulans*. Son de un interés particular los microorganismos pigmentados.

40

45

Hay disponibles varias vías para introducir un gen de *Bacillus* que codifica una toxina en un microorganismo en condiciones que permiten una expresión y un mantenimiento estable del gen. Estos procedimientos son bien conocidos por los expertos en la técnica y se describen en, por ejemplo, la patente U.S. n.º. 5.135.867, que se incorpora aquí por referencia.

50

Para transformar huéspedes se pueden usar genes sintéticos que son funcionalmente equivalentes a las toxinas de

la presente invención. Se pueden encontrar procedimientos para la producción de genes sintéticos en, por ejemplo, la patente U.S. n.º. 5.380.831.

Tratamiento de células. Como se ha mencionado antes, células de *Bacillus* o recombinantes que expresan una toxina de *Bacillus* se pueden tratar para prolongar la actividad de la toxina y estabilizar la célula. La microcápsula de plaguicida que se forma comprende la toxina de *Bacillus* dentro de una estructura celular que se ha estabilizado y que protegerá la toxina cuando se aplica la microcápsula al ambiente de la plaga diana. Las células huésped adecuadas pueden incluir procariotes o eucariotes. Como huéspedes serán de un interés particular los procariotes y los eucariotes inferiores, tales como hongos. Usualmente la célula estará intacta y sustancialmente en la forma proliferativa cuando se trata, más que en forma de espora.

El tratamiento de la célula microbiana, por ejemplo, un microbio que contiene el gen de *Bacillus*, se puede hacer por medios químicos o físicos, o por una combinación de medios químicos y/o físicos, con la condición de que la técnica no afecte perjudicialmente a las propiedades de la toxina ni disminuya la capacidad celular de proteger la toxina. Se consideran procedimientos para tratar células microbianas en las patentes U.S. n.º. 4.695.455 y n.º. 4.695.462, que se incorporan aquí por referencia.

Procedimientos y formulaciones para control de plagas. El control de plagas usando los aislados, las toxinas y los genes de la presente invención se puede realizar por varios procedimientos conocidos por los expertos en la técnica. Entre estos procedimientos figuran, por ejemplo, la aplicación de aislados de *Bacillus* a las plagas (o su localización), la aplicación de microbios recombinantes a las plagas (o su localización) y la transformación de plantas con genes que codifican las toxinas plaguicidas de la presente invención. Las transformaciones las pueden hacer los expertos en la técnica usando métodos estándar. Se describen aquí los materiales necesarios para estas transformaciones, que, por otra parte, son fácilmente adquiribles por un técnico experto.

Se pueden aplicar al suelo gránulos de cebo formulados que contienen una sustancia atractiva y las toxinas de los aislados de *Bacillus*, o microbios recombinantes que comprenden los genes obtenibles de los aislados de *Bacillus*. El producto formulado también se puede aplicar como revestimiento de siembra, o tratamiento de raíces, o tratamiento total de la planta en etapas posteriores del ciclo de cosecha. En los tratamientos de la planta y el suelo con células de *Bacillus* se pueden emplear éstas como polvos, gránulos o polvos que se pueden mojar, mezclando diversos materiales inertes tales como minerales inorgánicos (filosilicatos, carbonatos, sulfatos, fosfatos y similares), o materiales botánicos (mazorcas de maíz, corteza de arroz, cáscaras de nuez y similares). Las formulaciones pueden contener coadyuvantes adhesivos- de esparcimiento, agentes estabilizadores, otros aditivos plaguicidas o tensioactivos. Las formulaciones líquidas pueden ser de base acuosa o no acuosa y emplearse como espumas, geles, suspensiones, concentrados emulsivos o similares. Los ingredientes pueden incluir agentes reológicos, tensioactivos, emulsivos, dispersivos o polímeros.

Como lo apreciaría una persona experta en la técnica, la concentración de plaguicida variará dependiendo ampliamente de la naturaleza de la formulación particular, en particular de si se trata de un concentrado o se ha de usar directamente. El plaguicida estará presente en al menos 1% en peso y puede estar presente en 100% en peso. Las formulaciones secas tendrán 1-95% en peso del plaguicida mientras que las formulaciones líquidas generalmente tendrán aproximadamente 1-60% en peso de los sólidos en la fase líquida. Las formulaciones que contienen células generalmente tendrán de aproximadamente 10^2 a aproximadamente 10^4 células/mg. Estas formulaciones se administrarán a razón de 50 mg (líquido o seco) en 1 kg o más por hectárea.

Las formulaciones se pueden aplicar al ambiente de la plaga, por ejemplo el suelo y el follaje, por pulverización, atomización, esparcimiento o similar.

Sondas de polinucleótidos. Es bien sabido que el ADN tiene una propiedad fundamental denominada complementariedad de bases. En la naturaleza, el ADN ordinariamente existe en forma de pares de cadenas antiparalelas, proyectándose las bases en cada cadena desde la cadena hasta la cadena opuesta. La base adenina (A) en una cadena estará siempre opuesta a la base timina (T) de la otra cadena y la base guanina (G) estará opuesta a la base citosina (C). Las bases se mantienen en oposición por su capacidad de unión por hidrógeno de esta manera específica. Aunque cada enlace individual es relativamente débil, el efecto neto de muchas bases adyacentes unidas por hidrógeno, junto con los efectos del rimero de bases, es una unión estable de las dos cadenas complementarias. Estas uniones se pueden romper por tratamientos tales como pH alto o temperatura alta, y estas condiciones dan por resultado la disociación o desnaturalización de las dos cadenas. Si luego se pone el ADN en condiciones en las que la unión por hidrógeno de las bases es termodinámicamente favorable, las cadenas de ADN se condensarán o "hibridarán" y reformarán el ADN original de doble cadena. Si se realiza en condiciones apropiadas, esta hibridación puede ser muy específica. Esto es, sólo cadenas con un alto grado de complementariedad de las bases serán capaces de formar estructuras estables de doble cadena. La relación de la especificidad de hibridación a condiciones de reacción es bien conocida. Así, la hibridación se puede usar para ensayar si las dos piezas de ADN son complementarias en sus secuencias de base. Es este mecanismo de hibridación lo que facilita el uso de sondas de la presente invención para detectar y caracterizar fácilmente las

secuencias de ADN.

Las sondas pueden ser ARN, ADN o APN (ácido péptidonucleico). Normalmente la sonda tendrá al menos aproximadamente 10 bases, más usualmente al menos aproximadamente 17 bases y puede tener hasta aproximadamente 100 bases o más. Se pueden utilizar fácilmente sondas mayores y tales sondas pueden tener una longitud de, por ejemplo, varias kilobases. La secuencia de la sonda se diseña que sea al menos sustancialmente complementaria para una porción de un gen que codifica una toxina de interés. No es necesario que la sonda tenga una complementariedad perfecta con la secuencia a la que se híbrida. Las sondas se pueden marcar utilizando técnicas que son bien conocidas por los expertos en esta técnica.

Un enfoque para el uso de la presente invención como sondas implica identificar primeramente por análisis de transferencia southern de un banco de genes del aislado de *Bacillus* todos los segmentos de ADN homólogos con las secuencias de nucleótidos consideradas. Así es posible conocer previamente, sin ayuda de un análisis biológico, la actividad probable de muchos aislados nuevos de *Bacillus* y de productos génicos individuales expresados por un aislado de *Bacillus* dado. Este análisis de una sonda proporciona un procedimiento rápido para identificar genes de toxina plaguicida potencialmente valiosa comercialmente dentro de las subespecies muy diversas de *B.t.*

Un procedimiento de hibridación útil de acuerdo con la presente invención incluye típicamente las etapas de aislar la muestra de ADN de interés y purificarla químicamente. Se puede usar bacteria lisada o ácido nucleico total fraccionado aislado de bacteria. Las células se pueden tratar usando técnicas conocidas para liberar su ADN (y/o ARN). La muestra de ADN se puede cortar en piezas con una enzima de restricción apropiada. Las piezas se pueden separar por tamaños mediante electroforesis en un gel usando agarosa o acrilamida. Las piezas de interés se pueden transferir a una membrana inmovilizadora.

Para la presente invención no es esencial la técnica particular de hibridación. Como las mejoras se hacen por técnicas de hibridación, se pueden aplicar fácilmente.

La sonda y la muestra se pueden combinar luego en una solución tampón de hibridación y mantener a una temperatura apropiada hasta que se produce la hibridación. Luego se lava la membrana liberándola de materiales extraños, dejando la muestra y las moléculas de sonda unidas típicamente detectadas y cuantificadas por autorradiografía y/o recuento por centelleo en líquido. Como es bien sabido en la técnica, si la molécula de la sonda y la muestra de ácido nucleico se hibridan por formación de un enlace fuerte no covalente entre las dos moléculas, se puede suponer razonablemente que la sonda y la muestra son esencialmente idénticas. La marca detectable de la sonda proporciona un medio para determinar de manera conocida si se ha producido la hibridación.

Al usar como sondas segmentos de nucleótidos, la sonda particular se marca con un marcador adecuado conocido por los expertos en la técnica, incluidos marcadores radiactivos y no radiactivos. Entre los marcadores radiactivos figuran ^{32}P , ^{35}S o similares. Entre los marcadores no radiactivos figuran, por ejemplo, ligandos tales como biotina o tiroxina, así como enzimas tales como hidrolasas o peroxidasas, o diferentes agentes quimioluminiscentes tales como luciferina, o compuestos fluorescentes tales como fluoresceína y sus derivados. Las sondas se pueden hacer inherentemente fluorescentes como se describe en la solicitud de patente internacional n°. WO 93/16094.

Se pueden emplear diversos grados de estrictez de hibridación. Cuanto más severas son las condiciones, mayor es la complementariedad requerida para formación de dúplex. La severidad se puede controlar por la temperatura, la concentración de la sonda, la longitud de la sonda, la fuerza iónica, el tiempo y factores similares. Preferiblemente, la hibridación se realiza en condiciones de estrictez moderada a alta por métodos bien conocidos en la técnica, descritos, por ejemplo, por Keller, G.H., M.M. Manak (1987), *DNA Probes*, Stockton Press, New York, NY, págs. 169-170.

Tal como se usa aquí, la expresión condiciones de "estrictez moderada a alta" para la hibridación se refiere a condiciones que alcanzan el mismo o sustancialmente el mismo grado de especificidad de hibridación que las condiciones empleadas por los solicitantes corrientes. Se proporcionan aquí ejemplos de condiciones de estrictez moderada y alta. Específicamente, la hibridación de ADN inmovilizado en manchas Southern con sondas específicas a genes marcados con ^{32}P se realizó por procedimientos estándar (Maniatis y otros). En general, la hibridación y los posteriores lavados se realizaron en condiciones de estrictez de moderadas a altas que permitieron la detección de secuencias diana de moderadas a altas con homología con los genes de toxina ejemplificados. Para sondas de gen de DNA de cadena doble, la hibridación se realizó durante la noche a 20-25°C por debajo de la temperatura de fusión (T_m) del híbrido de ADN en SSPE 6 X, solución de Denhardt 5 X, 0,1% de SDS, 0,1 mg/ml de ADN desnaturalizado. Las temperaturas de fusión se describen por la fórmula siguiente (Beltz, G.A., K.A. Jacobs, T.H. Eickbushh, P.T. Cherbass y F.C. Kafatos [1983] *Methods of Enzymology*, R. Wu., L. Grossman y K. Moldave [eds], Academic Press, New York 100:266-285).

$T_m = 81,5^\circ\text{C} + 16,6 \log[\text{Na}^+] + 0,41(\% \text{ de G+C}) - 0,61(\% \text{ de formamida}) - 600/\text{longitud de dúplex en pares de base.}$

Los lavados se realizan típicamente como sigue:

(1) Dos veces a temperatura ambiente durante 15 min en SSPE 1 X, 0,1% de SDS (lavado de baja estrictez).

(2) Una vez a $T_m - 20^\circ\text{C}$ durante 15 min en SSPE 0,2 X, 0,1% de SDS (lavado de estrictez moderada).

5 Para sondas de oligonucleótidos, la hibridación se realizó durante la noche a $10-20^\circ\text{C}$ por debajo de la temperatura de fusión (T_m) del híbrido en SSPE 6 X, solución de Denhardt 5 X, 0,1% de SDS, 0,1 mg/ml de ADN desnaturizado. La T_m de sondas de oligonucleótido se determinó por la fórmula siguiente:

$T_m(^\circ\text{C}) = 2(\text{número de pares de base T/A}) + 4(\text{número de pares de base G/C})$ (Suggs, S.V., T. Miyake, E.H. Kawashime, M.J. Johnson, K. Itakura y R.B. Wallace [1981], *ICN-UCLA Symp. Dev. Biol. Using Purified Genes*, D.D. Brown [ed.], Academic Press, New York, 23:683-693).

10 Típicamente los lavados se hicieron como sigue:

(1) Dos veces a temperatura ambiente durante 15 min en SSPE 1 X, 0,1% de SDS (lavado de baja estrictez).

(2) Una vez a la temperatura de hibridación durante 15 min en SSPE 1 X, 0,1% de SDS (lavado de estrictez moderada).

15 En general se puede alterar la sal y/o la temperatura para cambiar la estrictez. Con un fragmento de ADN marcado de una longitud >70 o aproximado de bases se pueden usar las condiciones siguientes:

Baja: SSPE 1 o 2 X, temperatura ambiente

Baja: SSPE 1 o 2 X, 42°C

Moderada: SSPE 0,2 o 1 X, 65°C

Alta: SSPE 0,1 X, 65°C

20 La formación de dúplex y la estabilidad dependen de la complementariedad sustancial de las dos cadenas de un híbrido y, como se ha indicado antes, se puede tolerar un cierto grado de desajuste. Por tanto, las secuencias de la sonda de la presente invención incluyen mutaciones (individuales y múltiples), supresiones, inserciones de las secuencias descritas y combinaciones de las mismas, permitiendo las mencionadas mutaciones, inserciones y supresiones la formación de híbridos estables con el polinucleótido diana. Las mutaciones, inserciones y supresiones se pueden producir en una secuencia de polinucleótido dada de muchas maneras y estos procedimientos son conocidos por un experto de cualificación normal. En el futuro se podrán conocer otros procedimientos.

30 Por tanto, se pueden preparar fácilmente variantes mutacionales, insercionales y supresoras de las secuencias de nucleótidos indicadas por procedimientos que son bien conocidos por los expertos en la técnica. Estas variantes se pueden usar de la misma manera que las secuencias de cebador ejemplificadas siempre que las variantes tengan una homología sustancial de secuencias con la secuencia original. Tal como se usa aquí, homología sustancial de secuencias se refiere a homología que es suficiente para que la sonda variante actúe con la misma capacidad que la sonda original. Preferiblemente, esta homología es mayor que 50%; más preferiblemente esta homología es mayor que 75% y, muy preferiblemente, esta homología es mayor que 90%. El grado de homología necesario para que funcione la variante con su capacidad pretendida dependerá del uso previsto de la secuencia. Corresponde a la capacidad de una persona experta en esta técnica hacer variaciones mutacionales, insercionales y supresoras diseñadas para mejorar la función de la secuencia o que proporcionen una ventaja metodológica.

40 **Tecnología de RCP.** La Reacción en Cadena de Polimerasa (RCP) es una síntesis repetitiva, enzimática, de cebado de una secuencia de ácido nucleico. El procedimiento es bien conocido y muy usado por los expertos en esta técnica (véase Mullis, patentes U.S. n°. 4.683.195, n°. 4.683.202 y n°. 4.800.159; Saiki, Randall K., Stephen Scharf, Fred Faloona, Kary B. Mullis, Glenn T. Horn, Henry A. Erlich, Norman Arnheim [1985], *Enzymatic Amplification of β -Globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle Cell Anemia*, Science 230:1350-1354). La RCP está basada en la amplificación enzimática de un fragmento de ADN de interés que está flanqueado por dos cebadores que hibridan a cadenas opuestas de la secuencia diana. Los cebadores están orientados con los extremos 3' mutuamente enfrentados. Ciclos de desnaturización repetidos de la plantilla, hibridación de los cebadores a sus secuencias complementarias y extensión de los cebadores hibridados con una polimerasa de ADN dan por resultado la amplificación del segmento definido por los extremos 5' de los cebadores de RCP. Puesto que el producto de extensión de cada cebador puede actuar como plantilla para el otro cebador, cada ciclo esencialmente duplica la cantidad de fragmento de ADN producida en el ciclo anterior. Esto da por resultado la acumulación exponencial del fragmento diana específico, hasta varios millones de veces en unas pocas horas. Usando una polimerasa de ADN termoestable tal como la polimerasa *Taq*, que se aísla de la bacteria termófila *Thermus aquaticus*, se puede automatizar completamente el proceso de amplificación. Los expertos en la

técnica conocen otras enzimas que se pueden usar.

Las secuencias de ADN de la presente invención se pueden usar como cebadores para amplificación por RCP. Al realizar la amplificación por RCP, se puede tolerar un cierto grado de desajuste entre cebador y plantilla. Por tanto, las mutaciones, supresiones e inserciones (especialmente adiciones de nucleótidos al extremo 5') de los cebadores ejemplificados están dentro del alcance de la presente invención. Las mutaciones, supresiones e inserciones se pueden producir en un cebador dado por procedimientos conocidos por un experto en la técnica de cualificación normal.

Seguidamente se presentan ejemplos que ilustran procedimientos para la práctica de la invención. Estos ejemplos no deben considerarse como limitativos. Todos los porcentajes son en peso y las proporciones en mezclas de disolventes son en volumen a no ser que se indique lo contrario.

Ejemplo 1 – Cultivo de aislados de *Bacillus* útiles de acuerdo con la invención

El huésped celular que contiene el gen insecticida de *Bacillus* puede hacerse crecer en cualquier medio nutriente conveniente. Estas células se pueden cosechar luego de acuerdo con métodos convencionales. Alternativamente, las células se pueden tratar antes de cosechar.

Las células de *Bacillus* de la invención se pueden cultivar usando medios estándar en la técnica y técnicas de fermentación. Durante el ciclo de fermentación, las bacterias se pueden cosechar separando primeramente las células vegetativas, las esporas, los cristales y restos celulares lisados de *Bacillus* del caldo de fermentación por procedimientos bien conocidos en la técnica. Cualesquier esporas o δ -endotoxinas de *Bacillus* formadas se pueden recuperar empleando técnicas bien conocidas y usadas como la preparación de una δ -endotoxina convencional de *B.t.* El material sobrenadante del proceso de fermentación contiene toxinas de la presente invención. Las toxinas se aíslan y purifican empleando técnicas bien conocidas.

Para inocular el siguiente medio, conocido como caldo TB, se puede usar un subcultivo de aislados de *Bacillus* o mutantes de los mismos:

25	Triptona:	12 g/l
	Extracto de levadura	24 g/l
	Glicerol	4 g/l
	KH ₂ PO ₄	2,1 g/l
	K ₂ HPO ₄	14,7 g/l
	pH	7,4

30 El fosfato potásico se añadió al caldo tratado en autoclave después de enfriar. Los matraces se incubaron a 30°C en una mesa de sacudidas rotatoria a 30°C y a 250 rpm durante 24-36 h.

El procedimiento anterior se puede diseñar fácilmente a mayor escala siguiendo procedimientos conocidos en la técnica para fermentadores grandes.

35 El *Bacillus* obtenido en la fermentación anterior se puede aislar por procedimientos bien conocidos en la técnica. Un procedimiento frecuentemente usado es someter el caldo de fermentación cosechado a técnicas de separación, por ejemplo centrifugación. En una realización específica, las proteínas de *Bacillus* útiles de acuerdo con la presente invención se pueden obtener del material sobrenadante. El material sobrenadante del cultivo que contiene la(s) proteína(s) activa(s) se puede usar en bioensayos.

40 Alternativamente, un subcultivo de aislado de *Bacillus*, o sus mutantes, se puede usar para inocular un medio de peptona, glucosa y sales:

	Bactopeptona	7,5 g/l
	Glucosa	1,0 g/l
	KH ₂ PO ₄	3,4 g/l
	K ₂ HPO ₄	4,35 g/l
45	Solución de sal	5,0 ml/l
	Solución de CaCl ₂	7,2 ml/l
	pH	7,2

Solución de sales (100 ml)

	MgSO ₄ •7H ₂ O	2,46 g
	MnSO ₄ •H ₂ O	0,04 g
5	ZnSO ₄ •7H ₂ O	0,28 g
	FeSO ₄ •7H ₂ O	0,40 g

Solución de CaCl₂ (100 ml)

3,66 g

- 10 La solución de sales y la solución de CaCl₂ se esterilizan por filtración y se añaden al caldo tratado en autoclave y cocido en el momento de la inoculación. Los matracos se incuban a 30°C en una mesa de sacudidas rotatoria a 200 rpm durante 64 h.

El procedimiento anterior se puede diseñar fácilmente a mayor escala por procedimientos bien conocidos en la técnica para fermentadores grandes.

- 15 Las esporas y/o cristales de *Bacillus* obtenidos en la fermentación se pueden aislar por procedimientos bien conocidos en la técnica. Un procedimiento frecuentemente usado es someter el caldo de fermentación cosechado a técnicas de separación, por ejemplo centrifugación.

Ejemplo 2 – Aislamiento y preparación de ADN celular para RCP

- 20 Se puede preparar ADN de células crecidas en agar de Spizzen u otro agar mínimo o enriquecido conocido por los expertos en la técnica, durante aproximadamente 16 h. El agar de casaminoácido de Spizzen comprende 23,2 g/l de sales mínimas de Spizzens [(NH₄)₂SO₄, 120 g; K₂HPO₄, 840 g; KH₂PO₄, 360 g; citrato sódico, 60 g; MgSO₄•7H₂O, 12 g. Total: 1392 g]; 1,0 g/l de casaminoácidos exentos de vitamina; 15,0 g/l de agar Difco. Al preparar el agar, la mezcla se mantuvo en autoclave durante 30 min, luego se puede añadir una solución estéril de glucosa al 50% a una concentración final de 0,5% (1/100 vol). Una vez que las células crecieron durante
- 25 aproximadamente 16 h, se extrajo del agar un parche de aproximadamente 1 cm² de células que se pasó a Tris-HCl 10 mM (pH 8,0)-EDTA 1 mM. Se añadió proteinasa K a 50 µg/ml y se incubó a 55°C durante 15 min. Se pueden usar otras proteasas adecuadas que carecen de actividad de nucleasa. Las muestras se pusieron luego en un baño de agua hirviendo durante 15 min para inactivar la proteinasa y desnaturalizar el ADN. Esto también precipita los componentes innecesarios. Luego se centrifugan las muestras a 14.000 x g en una
- 30 microcentrifugadora Eppendorf a temperatura ambiente durante 5 min para eliminar residuos celulares. Los materiales sobrenadantes que contenían ADN en bruto se pasaron a tubos frescos y se congelaron a -20°C hasta que se usaron en reacciones de RCP.

Alternativamente se puede preparar ADN celular total a partir de células crecidas en placa usando el kit QIAamp Tissue Kit de Qiagen (Santa Clarita, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

- 35 **Ejemplo 3 – Clonación molecular y análisis de secuencia de ADN de un nuevo gen de toxina SUP de la cepa KB59A4-6 de *Bacillus thuringiensis***

- Se preparó ADN celular total de la cepa KB59A4-6 de *Bacillus thuringiensis* crecida a una densidad óptica de 0,5-0,8 a 600 nm de luz visible en caldo Luria Bertani (LB). Se extrajo ADN usando el kit Qiagen Genomic-tip 500 G/ki y el set Genomic DNA Buffer de acuerdo con el protocolo para bacterias Gram positivas (Qiagen Inc.; Valencia CA). Se digirió ADN con HinDIII y se trató en geles de agarosa al 0,7% para análisis de transferencia Southern por procedimientos estándar (Maniatis y otros). Usando los oligos "3A-atg (GCTCTAGAAGGAGGTAACCTTATGAA CAAGAATAATACTAAATTAAGC) y "3A-taa" (GGGGTACCTTACTTAATAGAGACATGG) se obtuvo un amplicón de RCP que contenía genes de tipo SUP (SEC ID NO.1) de ADN genómico de Javelin-90. Este fragmento de ADN se purificó en gel y se marcó con ³²P-dCTP radiactivo usán el kit Prime-It II Random Primer Labeling kit (Stratagene)
- 45 para uso como sonda. La hibridación de los filtros de transferencia Southern se realizó en una solución 6X de SSPE, 5X de solución de Denhardt, 0,1% de SDS, 0,1 mg/ml de ADN desnaturalizado a 42°C durante la noche en un baño de agua de sacudidas. Los filtros se lavaron posteriormente en SSPE 1 X y 0,1% de SDS a 25° una vez y adicionalmente dos veces a 37°C. Los filtros hibridados se expusieron luego a película de rayos X a -80°C. Se identificó que un fragmento HinDIII de aproximadamente 1 kbp de ADN KB59A4-6 genómico hibridó a la sonda
- 50 Javelin 90 SUP.

Se construyó como sigue una biblioteca lambda de ADN KB59A4-6 genómico. Se digirió parcialmente ADN con

Sau3A y se fraccionó en tamaños sobre geles de agarosa. Se cortó la región del gel que contenía fragmentos entre 9,0 y 23 kbp y se aisló el ADN por electroelución en tapón 0,1X TAE y seguidamente se purificó sobre columnas Elutip-d (Schleicher y Schuell, Keene, NH). Se ligaron los insertos de ADN fraccionados en tamaños en Lambda-Gem11 digerido con BamHI (Promega) y se empaquetaron los fagos recombinantes usando GigapackIII XL Packing Extract (Stratagene). Se cultivaron los fagos sobre células VCS257 de *E. coli* para exploración por hibridación. Las placas se transfirieron a filtros de nailon y se secaron en vacío a 80°C. La hibridación se realizó luego con sonda de gen Javalib 90 Sup como se ha descrito antes. Se seleccionó usando una pipeta Pasteur una placa que dio señal positiva, obteniéndose un tapón. El tapón se maceró durante la noche en 1 ml de tampón SM + 10uL de CHCl₃. De los lisados líquidos de KW251 de *E. Coli* infectados con este fago se obtuvieron preparaciones de ADN de fago a gran escala (Maniatis y otros).

El gen de toxina de KB59A4-6 se subclonó en el vector transportador de *E. coli B. thurigiensis*, pHT370 (O. Arantes y D. Lereclus, 1991, Gene 108: 115-119) en un fragmento SacI/XbaI de aproximadamente 5,5 kbp identificado por hibridación Southern. Este subclón de plásmido se designó pMYC2473. Las células XL10-Gold de *E. coli recombinantes* (Stratagene) que contienen esta construcción se designan MR993. El gen de toxina insecticida se secuenció por desplazamiento de cebador usando el plásmido pMYC2473 y amplicones de RCP como plantillas de ADN. Las reacciones de secuenciación se realizaron usando el kit Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction de PE Applied Biosystems y en un secuenciador automático ABI PRISM 377. Los datos de secuencia se analizaron usando software PE ABI PRISM 377 de recogida, factura y autoensamblaje. La secuencia de ADN y la secuencia de péptido deducida de la toxina de KB59A4-6 se expresan como nuevas secuencias SEC ID NOS. 53 y 54, respectivamente.

Se depositó un subcultivo de MR993 en la colección permanente de la Patent Culture Collection (NRRL), Regional Center Research, 1815 North University Street, Peoria, Illinois 61604 USA el 4 de mayo de 1999. El número de acceso es NRRL B-30125.

Ejemplo 4 – Biensayos de la actividad frente a lepidopteros y coleopteros

Las actividad biológica de las toxinas y aislados de la presente invención se puede confirmar usando procedimientos estándar de bioensayos. Un ensayo de esta clase es el ensayo de larva de capullos-gusano elótero (*Heliothis virescens* [Fabricius] y *Helicoverpa zea* [Boddie]). Los bioensayos de Lepidoptera se hicieron con aplicación superficial a dieta de insectos artificial o incorporación de dieta de muestras. Todos los insectos lepidopteros se ensayaron desde la etapa neonatal a la segunda muda. Todos los ensayos se realizaron en dieta artificial de harina de soja tostada o dieta artificial de larva *Agrotis* negra (BioServ, Frenchtown, NJ),

La incorporación de dieta se puede realizar mezclando las muestras con dieta artificial en una proporción de 6 ml de suspensión más 54 ml de dieta. Después de agitar con vortex, esta mezcla se vierte en bandejas de plástico con pocillos en compartimientos de 3 ml (Nutrend Container Corporation, Jacksonville, FL). Como control sirvió un blanco de agua que no contenía *B.t.* Se ponen sobre la mezcla de dieta larvas de primera muda (USDA-ARS, Stonewille, MS). Se sellan los pocillos con hoja Mylar (ClearLam Packaging, IL) usando un calentador y se hicieron varios agujeros finos en cada pocillo para intercambio de gas. Las larvas se tuvieron a 25°C durante 6 días en una sala de mantenimiento 14:10 (luz:oscuridad). Después de 6 días se registran la mortalidad y la atrofia,

El bioensayo por el procedimiento de carga en la parte superior utiliza la misma muestra y las mismas preparaciones de dieta anteriores. Las muestras se aplican a la superficie de la dieta de insecto. En una realización específica, el área superficial es de 0,3 a aproximadamente 0,8 cm² dependiendo del tamaño de la bandeja y se usaron placas de cultivo de 96 pocillos además del formato indicado antes. Después de la aplicación, las muestras se dejaron secar al aire antes de infestarlas con insecto. Como control puede servir un blanco de agua que no contiene *B.t.* A cada pocillo tratado se aplican huevos y se sellaron con hoja Mylar (ClearLam Packaging, IL) usando un calentador y se hacen agujeros finos en cada pocillo para que haya intercambio de gas. Los bioensayos se mantienen a 25°C durante 7 días en una sala de mantenimiento 14:10 (luz:oscuridad). Al final de cada bioensayo se registran la mortalidad y la atrofia,

Otro ensayo útil de acuerdo con la presente invención es el ensayo del gusano de raíz de maíz occidental. Las muestras se pueden someter a bioensayo frente a larvas de gusano de raíz de maíz occidental (*Diabrotica virgifera virgifera*) mediante carga de la muestra en la parte superior sobre una dieta artificial sobre base de agar en cuantía de 160 ml/cm². La dieta artificial se puede dispensar en pocillos de 0,78 cm² en placas de cultivo de tejidos de 48 pocillos o similares y se deja que endurezca. Después de que solidifique la dieta, se dispensan las muestras con pipeta sobre la superficie de la dieta. Luego se evapora de la superficie el exceso de líquido antes de transferir con cepillo de pelo de camello aproximadamente tres larvas neonatas por pocillo sobre la superficie de la dieta. Para impedir que se escape el insecto durante el intercambio de gas, los pocillos se sellan por calor con una película de poliéster de 0,05 mm con adhesivo 27HT (Oliver Productos Company, Grand Rapids, Michigan). Los bioensayos se hacen en la oscuridad a 25°C y se puntúa la mortalidad después de cuatro días.

Los expertos en la técnica pueden hacer análogos bioensayos para estimar la actividad frente a otras plagas tales como larva *Agrotis negra* (*Agrotis ipsilon*).

Las toxinas de la invención tener utilidad respecto a las plagas de lepidópteros dadas en la Tabla 2.

5 La actividad se puede confirmar fácilmente usando los bioensayos indicados aquí, adaptaciones de estos ensayos y/u otros bioensayos bien conocidos por los expertos en la técnica.

Tabla 2
Especies diana de plagas

Nombre común	Nombre latino
Taladro del maíz europeo	<i>Ostrinia nubilatis</i>
Taladro del maíz europeo resistente a toxinas de la clase CryIA	<i>Ostrinia nubilatis</i>
Larva <i>Agrotis</i>	<i>Agrotis ipsilon</i>
Cogollero del maíz	<i>Spodoptera frugiperda</i>
Barredor grande del maíz	<i>Diatraea grandiosella</i>
Gusano elótero	<i>Helicoverpa zea</i>
Oruga de capullo de tabaco	<i>Heliothis virescens</i>
Oruga del capullo de tabaco resistente a toxinas de la clase CryIA	<i>Heliothis virescens</i>
Mariposa del girasol	<i>Homoeosoma ellectellum</i>
Mariposa del girasol bandeada	<i>Cochylis hospes</i>
Cuncunilla verde	<i>Rachiplusia nu</i>
Espilosoma	<i>Spilosoma virginica</i>
Gardama berta	<i>Mamestra configurata</i>
Palomilla dorso de diamante	<i>Plutella xylostels</i>
Palomila dorso de diamante	<i>Plutella xylostells</i>

10

Ejemplo 5 – Inserción de genes de toxina en plantas

Un aspecto de la presente invención es la transformación de plantas con genes que codifican la toxina insecticida de la presente invención. Las plantas transformadas son resistentes al ataque por la plaga diana.

15 Los genes que codifican toxinas plaguicidas de acuerdo con la indicado aquí se pueden insertar en células de plantas usando una variedad de métodos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, para la preparación de la inserción de genes foráneos en plantas superiores hay disponibles un gran número de vectores de clonación que comprenden un sistema de replicación en *E. coli* y un marcador que permite la selección de las células transformadas. Entre los vectores figuran, por ejemplo, pBR322, la serie pUC, serie M13mp, pACYC184, etc. Consecuentemente, la secuencia que codifica la toxina de *Bacillus* se puede insertar en el vector en un sitio de restricción adecuado. El plásmido resultante se usa para transformación en *E. coli*. Las células de *E. coli* se cultivan en un medio nutriente adecuado, luego se cosechan y lisan. Se recupera el plásmido. Generalmente, el análisis de secuencias, el análisis de restricción, la electroforesis y otros métodos biológicos bioquímicos-moleculares se realizan como métodos de análisis. Después de cada manipulación, la secuencia de ADN usada se puede escindir y unir a la siguiente secuencia de ADN. Cada secuencia de plásmido se puede clonar en los mismos o diferentes plásmidos. Dependiendo del procedimiento de inserción de los genes deseados en la planta, pueden ser necesarias otras secuencias de ADN. Si, por ejemplo, se usa el plásmido Ti o Ri para la transformación de la célula de la planta, se ha de unir al menos el borde derecho, a menudo el borde derecho y el izquierdo de ADN-T del plásmido Ti o Ri como región de flanqueo de los genes a insertar.

20

25

Se ha investigado intensivamente el uso de ADN-T para la transformación de células de plantas y se ha descrito

suficientemente en la PE 120 516; por Hoekema (1985) en *The Binary Plant Vector System*, Offset-durkkerij Kanters B.V., Alblasserdam, capít. 5; Fraley y otros, Crit. Rev. Plant Sci, 4:1-46; y An y otros, (1985) EMBO J. 4:277-287.

5 Una vez que el ADN insertado se ha integrado en el genoma, es relativamente estable en él y, como regla, no vuelve a salir. Normalmente contiene un marcador de selección que confiere a las células de la planta transformada resistencia a un biocida o un antibiótico, tal como kanamicina, G 418, bleomicina, higromicina o cloranfenicol, entre otros. Consecuentemente, el marcador individualmente empleado debe permitir la selección de células transformadas preferentemente a células que no contienen el ADN insertado.

10 Para insertar ADN en un huésped planta hay disponibles un gran número de técnicas, Entre esas técnicas figuran transformación de ADN-T usando *Agrobacterium tumefaciens* o *Agrobacterium rhizogenes* como agente de transformación, fusión, inyección, biolística (bombardeo de micropartículas) o electroporación, así como otros posibles métodos. Si para la transformación se usan agrobacterias, el ADN a insertar se ha de clonar en plásmidos especiales, a saber, en un vector intermedio o en un vector binario. Los vectores intermedios se pueden integrar en el plásmido Ti o Ri por recombinación homóloga debido a las secuencias que son homólogas a secuencias en el ADN-T. El plásmido Ri o Ti también comprende la región vir necesaria para transferir el ADN-T. Los vectores intermedios no pueden replicarse en sí en agrobacterias. El vector intermedio puede transferirse a *Agrobacterium tumefaciens* mediante un plásmido cooperador (conjugación). Los vectores binarios pueden replicarse en sí en *E. coli* y en agrobacterias. Comprenden un gen marcador de selección y un acoplador o poliacoplador que están enmarcados por las regiones derecha e izquierda de ADN-T. Pueden transferirse directamente a agrobacterias (Holsters y otros, [1978] Mol. Gen. Genet. 163:181-187). La agrobacteria usada como célula huésped ha de comprender también un plásmido que presenta una región vir. La región vir es necesaria para la transferencia de ADN-T a la célula de la planta. Puede estar contenido ADN-T adicional. La bacteria así transformada se puede usar para la transformación de células de plantas. Los explantes de plantas pueden cultivarse ventajosamente con *Agrobacterium tumefaciens* o *Agrobacterium rhizogenes* para transferir el ADN a la célula de la planta. Se pueden recuperar luego plantas enteras del material de planta infectado (por ejemplo trozos de hojas, segmentos del tallo, raíces, pero también protoplastos o células cultivadas en suspensión) en un medio adecuado, que puede contener antibióticos o biocidas para selección. Las plantas así obtenidas se pueden luego ensayar en cuanto a la presencia de ADN insertado. No se demanda nada especial de los plásmidos en el caso de inyección y electroporación. Es posible usar plásmidos corrientes tales como, por ejemplo, derivados de pUC. En la transformación biolística se puede emplear ADN de plásmido o ADN lineal.

20 Las células transformadas se regeneran a plantas morfológicamente normales de la manera usual. Si la transformación implica una célula de línea de germen, el ADN insertado y el (los) correspondiente(s) rasgo(s) fenotípicos(s) será(n) transmitido(s) a las plantas de la progenie. Tales plantas se pueden crecer de manera normal y se pueden cruzar con plantas que tienen los mismos factores hereditarios u otros factores hereditarios. Los individuos híbridos resultantes tienen las correspondientes propiedades fenotípicas.

35 En una realización preferente de la presente invención, las plantas se transformarán con genes en los que se ha optimizado el uso de codón para plantas. Véase, por ejemplo, patente U.S. nº. 5.380.831. También, ventajosamente se usarán plantas que codifican una toxina truncada. Típicamente, la toxina truncada codificará de aproximadamente 55% a aproximadamente 80% de la toxina de longitud entera. Los procedimientos para crear genes sintéticos de *Bacillus* para uso en plantas son conocidos en la técnica.

40

LISTA DE SECUENCIAS

SEC ID NO. 1

atgaacaaga	ataatactaa	attaagcaca	agagccttac	caagttttat	tgattatfff	60
aatggcattt	atggatttgc	cactgggtac	aaagacatta	tgaacatgat	ttttaaaacg	120
gatacaggtg	gtgatctaac	cctagacgaa	atfttaaaga	atcagcagtt	actaaatgat	180
atftctggta	aattggatgg	ggtgaatgga	agcttaaattg	atcttatcgc	acaggggaaac	240
ttaaatacag	aattatctaa	ggaaatatta	aaaattgcaa	atgaacaaaa	tcaagtttta	300
aatgatgfta	ataacaaaact	cgatgcgata	aatacgatgc	ttcgggtata	tctacctaaa	360
attacctcta	tgttgagtga	tghtaatgaaa	caaaattatg	cgctaagtct	gcaaatagaa	420
tacttaagta	aacaattgca	agagatttct	gataagttgg	atattattaa	tgtaaattgta	480
cttattaact	ctacacttac	tgaaattaca	cctgcgatc	aaaggattaa	atatgtgaaac	540
gaaaaatttg	aggaattaac	ttttgctaca	gaaactagtt	caaaagttaa	aaaggatggc	600
tctcctgcag	atattcctga	tgagttaact	gagttaactg	aactagcgaa	aagtgtaaaca	660
aaaaatgatg	tggatggftt	tgaattttac	cttaatacat	tccacgatgt	aatggtagga	720
aataattttat	tccggcgttc	agcttttaaaa	actgcatcgg	aattaattac	taaagaaaaat	780
gtgaaaacaa	gtggcagtg	ggtcggaaaat	gtttataact	tcttaattgt	attaacagct	840
ctgcaagcaa	aagctftttct	tactttaaca	acatgccgaa	aattattagg	cttagcagat	900
attgattata	cttctattat	gaatgaacat	ttaaataagg	aaaaagagga	atttagagta	960
aacatcctcc	ctacactttc	taatactttt	tctaatecta	attatgcaaa	agttaaagga	1020
agtgatgaag	atgcaaagat	gattgtggaa	gctaaaccag	gacatgcatt	gattgggttt	1080
gaaattagta	atgattcaat	tacagtatta	aaagtatatg	aggctaagct	aaaacaaaat	1140
tatcaagtcg	ataaggattc	cttatcggaa	gttatfttatg	gtgatatgga	taaattattg	1200
tgcccagatc	aatctgaaca	aatctattat	acaataaaca	tagtatttcc	aaatgaatat	1260
gtaattacta	aaattgattt	cactaaaaaa	atgaaaactt	taagatatga	ggtaacagcg	1320
aatttttatg	attcttctac	aggagaaaatt	gacttaaata	agaaaaaagt	agaatcaagt	1380
gaagcggagt	atagaacgft	aagtgtctaat	gatgatgggg	tgtatatgcc	gtaggtgtc	1440
atcagtgaaa	catttttgac	tccgattaat	gggtttggcc	tccaagctga	tgaaaattca	1500
agattaatta	ctttaacatg	taaatcatat	ttaagagaac	tactgctagc	aacagactta	1560
agcaataaag	aaactaaatt	gatygtcccg	ccaagtggft	ttattagcaa	tattgtagag	1620
aacgggtcca	tagaagagga	caatttagag	ccgtggaaaag	caaataataa	gaatgcgtat	1680
gtagatcata	caggcggagt	gaatggaact	aaagctttat	atgttcataa	ggacggagga	1740
atftcacaat	ttattggaga	taagttaaaa	ccgaaaactg	agtatgtaat	ccaatatact	1800
gtraaaggaa	aaccttctat	tcatttaaaa	gatgaaaata	ctggatatat	tcattatgaa	1860
gatacaaaata	ataattttaga	agattatcaa	actattaata	aacgttttac	tacaggaact	1920
gatttaaagg	gagtgtatft	aatttttaaaa	agtcaaaaatg	gagatgaagc	ttggggagat	1980
aactttatta	ttttggaaat	tagtccttct	gaaaagftat	taagtccaga	attaattaat	2040
acaaataatt	ggacgagrac	gggatcaact	aatattagcg	gtaatacact	cactctttat	2100
cagggaggac	gagggattct	aaaacaaaac	cttcaattag	atagtttttc	aacttataga	2160
gtgtatfttt	ctgtgtccgg	agatgtctaat	gtaaggatta	gaaattctag	ggaagtgtta	2220
tttgaaaaaa	gatatatgag	cggtgctaaa	gatgtttctg	aaatgttcac	tacaaaattt	2280
gagaaaagata	acttttatat	agagcttftct	caagggaaata	atfttatatg	tggtcctatt	2340
gtacattfttt	acgatgtctc	tattaagtaa	cccaa			2375

SEC ID NO. 2

atgaatatga	ataatactaa	attaaacgca	agggccctac	cgagttttat	tgattatfff	60
aatggcattt	atggatttgc	cactggtatc	aaagacatta	tgaatatgat	ttttaaaacg	120
gatacagggtg	gtaatctaac	cttagacgaa	atcctaaaga	atcagcagtt	actaaatgag	180
atctctggta	aattggatgg	ggtaaattggg	agcttaaattg	atcttatcgc	acaggggaaac	240
ttaaatacag	aattatctaa	ggaaatctta	aaaattgcaa	atgaacagaa	tcaagtctta	300
aatgatgta	ataacaaact	cgatgcgata	aatacgatgc	ttcatatata	tctacctaaa	360
atcacatcta	tgtaagtga	tgtaatgaag	caaaattatg	cgctaagtct	gcaagtagaa	420
tacttaagta	aacaattgaa	agaaatttct	gataaattag	atgttattaa	cgtaaattgt	480
cttattaact	ctacacttac	tgaattaca	cctgcatatc	aacggattaa	atatgtaaat	540
gaaaaatttg	aagaattaac	ttttgctaca	gaaaccactt	taaaagtaaa	aaaggatagc	600
tcgcttgctg	atattcttga	cgagttaact	gaattaactg	aactagcgaa	aagtgttaca	660
aaaaatgacg	tggatgggtt	tgaattttac	cttaatacat	tccacgatgt	aatggtagga	720
aataatttat	tcgggctgtc	agctttaaaa	actgcttcag	aattaattgc	taaagaaaat	780
gtgaaaacaa	gtggcagtga	agttaggaaat	gtttataatt	tcttaattgt	attaacagct	840
ctacaagcaa	aagcttttct	tactttaaca	acatgccgaa	aattattagg	cttagcagat	900
attgattata	catctattat	gaatgaacat	ttaaataagg	aaaaagagga	atftagagta	960
aacatecctt	ctacactttc	taatactttt	tctaactcta	attatgcaa	agttaaaagga	1020
agtgatgaag	atgcaaagat	gattgtggaa	gctaaaccag	gacatgcatt	ggttgggttt	1080
gaaattagta	atgattcaat	gacagtatta	aaagtatatg	aagctaagct	aaaacaaaat	1140
taccaagtgg	ataaggattc	cttatcggaa	gtcattttata	gtgatatgga	taaattattg	1200
tgcccagatc	aatctgaaca	aattttattat	acaaataata	tagtatttcc	aaatgaatat	1260
gtaattacta	aaattgattt	tactaagaaa	atgaaaactt	taagatatga	ggtaacagct	1320
aattctttag	atcttctac	aggagaaaat	gacttaata	agaagaaagt	agaatcaagt	1380
gaagcggagt	ataggacgtt	aagtgtctaat	aatgatggag	tatatatgcc	gtaggtgtc	1440
atcagtga	catttttgac	tccaattaat	ggatttggtc	tccaagctga	tgaaaattca	1500
agattaatta	ctttaacatg	taaatcatat	ttaagggaa	tactactagc	gacagactta	1560
agcaataaag	aaactaaatt	gattgtcccg	cctattagtt	ttattagtaa	tattgtagaa	1620
aatgggaact	tagagggaga	aaacttagag	ccgtggatag	caataacaa	aaatgcgtat	1680
gtagatcata	caggtgggat	aaatgggaact	aaagttttat	atgttcataa	ggatgggtgag	1740
ttttcacaat	ttgttggagg	taagttaaaa	tcgaaaacag	aatatgtaat	tcaatatatt	1800
gtaaagggaa	aagcttctat	ttatttaaaa	gataaaaaaa	atgagaattc	catttatgaa	1860
gaaataaata	atgattttaga	aggttttcaa	actgttacta	aacgttttat	tacaggaacg	1920
gattcttcag	ggattcattt	aatttttacc	agtcaaaatg	gcgagggagc	atttggagga	1980
aactttatta	tctcagaaat	taggacatcc	gaagagttat	taagtccaga	attgattatg	2040
tcggatgctt	gggttggatc	ccaggggaact	tggatctcag	gaaattctct	cactattaat	2100
agtaatgtaa	atggaacctt	tcgacaaaat	cttccgtag	aaagttattc	aacctatagt	2160
atgaacttta	ctgtgaatgg	atftggcaag	gtgacagtaa	gaaattctcg	tgaagtatta	2220
tttgaaaaaa	gttatccgca	gctttcacct	aaagatattt	ctgaaaaatt	tacaactgca	2280
gccaaataata	ccggattata	tgtagagctt	tctcgctcaa	cgtcgggtgg	tgcaataaat	2340
ttccgagatt	tttcaattaa	gtaa				2364

SEC ID NO. 3

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

ES 2 383 997 T3

Asn Gln Val Leu Asn Asp Val Asn Asn Lys Leu Asp Ala Ile Asn Thr
 100 105 110
 Met Leu His Ile Tyr Leu Pro Lys Ile Thr Ser Met Leu Ser Asp Val
 115 120 125
 Met Lys Gln Asn Tyr Ala Leu Ser Leu Gln Val Glu Tyr Leu Ser Lys
 130 135 140
 Gln Leu Lys Glu Ile Ser Asp Lys Leu Asp Val Ile Asn Val Asn Val
 145 150 155 160
 Leu Ile Asn Ser Thr Leu Thr Glu Ile Thr Pro Ala Tyr Gln Arg Ile
 165 170 175
 Lys Tyr Val Asn Glu Lys Phe Glu Glu Leu Thr Phe Ala Thr Glu Thr
 180 185 190
 Thr Leu Lys Val Lys Lys Asp Ser Ser Pro Ala Asp Ile Leu Asp Glu
 195 200 205
 Leu Thr Glu Leu Thr Glu Leu Ala Lys Ser Val Thr Lys Asn Asp Val
 210 215 220
 Asp Gly Phe Glu Phe Tyr Leu Asn Thr Phe His Asp Val Met Val Gly
 225 230 235 240
 Asn Asn Leu Phe Gly Arg Ser Ala Leu Lys Thr Ala Ser Glu Leu Ile
 245 250 255
 Ala Lys Glu Asn Val Lys Thr Ser Gly Ser Glu Val Gly Asn Val Tyr
 260 265 270
 Asn Phe Leu Ile Val Leu Thr Ala Leu Gln Ala Lys Ala Phe Leu Thr
 275 280 285
 Leu Thr Thr Cys Arg Lys Leu Leu Gly Leu Ala Asp Ile Asp Tyr Thr
 290 295 300
 Ser Ile Met Asn Glu His Leu Asn Lys Glu Lys Glu Glu Phe Arg Val
 305 310 315 320
 Asn Ile Leu Pro Thr Leu Ser Asn Thr Phe Ser Asn Pro Asn Tyr Ala
 325 330 335
 Lys Val Lys Gly Ser Asp Glu Asp Ala Lys Met Ile Val Glu Ala Lys
 340 345 350
 Pro Gly His Ala Leu Val Gly Phe Glu Ile Ser Asn Asp Ser Met Thr
 355 360 365
 Val Leu Lys Val Tyr Glu Ala Lys Leu Lys Gln Asn Tyr Gln Val Asp
 370 375 380
 Lys Asp Ser Leu Ser Glu Val Ile Tyr Ser Asp Met Asp Lys Leu Leu
 385 390 395 400
 Cys Pro Asp Gln Ser Glu Gln Ile Tyr Tyr Thr Asn Asn Ile Val Phe
 405 410 415
 Pro Asn Glu Tyr Val Ile Thr Lys Ile Asp Phe Thr Lys Lys Met Lys
 420 425 430
 Thr Leu Arg Tyr Glu Val Thr Ala Asn Ser Tyr Asp Ser Ser Thr Gly
 435 440 445
 Glu Ile Asp Leu Asn Lys Lys Lys Val Glu Ser Ser Glu Ala Glu Tyr

ES 2 383 997 T3

450					455					460					
Arg 465	Thr	Leu	Ser	Ala	Asn 470	Asn	Asp	Gly	Val	Tyr 475	Met	Pro	Leu	Gly	Val 480
Ile	Ser	Glu	Thr	Phe 485	Leu	Thr	Pro	Ile	Asn 490	Gly	Phe	Gly	Leu	Gln	Ala 495
Asp	Glu	Asn	Ser 500	Arg	Leu	Ile	Thr	Leu 505	Thr	Cys	Lys	Ser	Tyr 510	Leu	Arg
Glu	Leu	Leu 515	Leu	Ala	Thr	Asp	Leu 520	Ser	Asn	Lys	Glu	Thr 525	Lys	Leu	Ile
Val	Pro 530	Pro	Ile	Ser	Phe	Ile 535	Ser	Asn	Ile	Val	Glu 540	Asn	Gly	Asn	Leu
Glu 545	Gly	Glu	Asn	Leu	Glu 550	Pro	Trp	Ile	Ala	Asn 555	Asn	Lys	Asn	Ala	Tyr 560
Val	Asp	His	Thr	Gly 565	Gly	Ile	Asn	Gly	Thr 570	Lys	Val	Leu	Tyr	Val 575	His
Lys	Asp	Gly	Glu 580	Phe	Ser	Gln	Phe	Val 585	Gly	Gly	Lys	Leu	Lys 590	Ser	Lys
Thr	Glu	Tyr 595	Val	Ile	Gln	Tyr	Ile 600	Val	Lys	Gly	Lys	Ala 605	Ser	Ile	Tyr
Leu	Lys 610	Asp	Lys	Lys	Asn	Glu 615	Asn	Ser	Ile	Tyr	Glu 620	Glu	Ile	Asn	Asn
Asp 625	Leu	Glu	Gly	Phe	Gln 630	Thr	Val	Thr	Lys	Arg 635	Phe	Ile	Thr	Gly	Thr 640
Asp	Ser	Ser	Gly	Ile 645	His	Leu	Ile	Phe	Thr 650	Ser	Gln	Asn	Gly	Glu 655	Gly
Ala	Phe	Gly	Gly 660	Asn	Phe	Ile	Ile	Ser 665	Glu	Ile	Arg	Thr	Ser 670	Glu	Glu
Leu	Leu	Ser 675	Pro	Glu	Leu	Ile	Met 680	Ser	Asp	Ala	Trp	Val 685	Gly	Ser	Gln
Gly	Thr 690	Trp	Ile	Ser	Gly	Asn 695	Ser	Leu	Thr	Ile	Asn 700	Ser	Asn	Val	Asn
Gly 705	Thr	Phe	Arg	Gln	Asn 710	Leu	Pro	Leu	Glu	Ser 715	Tyr	Ser	Thr	Tyr	Ser 720
Met	Asn	Phe	Thr	Val 725	Asn	Gly	Phe	Gly	Lys 730	Val	Thr	Val	Arg	Asn 735	Ser
Arg	Glu	Val	Leu 740	Phe	Glu	Lys	Ser	Tyr 745	Pro	Gln	Leu	Ser	Pro 750	Lys	Asp
Ile	Ser	Glu 755	Lys	Phe	Thr	Thr	Ala 760	Ala	Asn	Asn	Thr	Gly 765	Leu	Tyr	Val
Glu	Leu 770	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser 775	Gly	Gly	Ala	Ile	Asn 780	Phe	Arg	Asp	Phe
Ser 785	Ile	Lys													

REIVINDICACIONES

1. Una proteína que es activa frente a una plaga de lepidopteros, que tiene una identidad de como mínimo 95% con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO. 3
- 5 2. Una proteína de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO. 3.
3. Un polinucleótido que codifica una proteína de la reivindicación 1 o la reivindicación 2.
4. Un polinucleótido de la reivindicación 3, que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEC. ID NO. 2.
5. Una célula microbiana o de planta que comprende un polinucleótido de la reivindicación 3 o la reivindicación 4.
- 10 6. Una células de acuerdo con la reivindicación 5, que es una célula bacteriana.
7. Una planta que comprende un polinucleótido de la reivindicación 3 o la reivindicación 4.
8. Un procedimiento para controlar una plaga de lepidopteros, que comprende poner en contacto la plaga con una proteína de la reivindicación 1 o la reivindicación 2.