

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 982 696**

51 Int. Cl.:

C12N 15/82 (2006.01)

C07K 14/325 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.12.2014** **E 20202357 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.03.2024** **EP 3800259**

54 Título: **Gen de la toxina AXMI486 y procedimientos para su uso**

30 Prioridad:

09.12.2013 US 201361913905 P

09.12.2013 US 201361913911 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
17.10.2024

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**LEHTINEN, DUANE ALAN;
SAMPSON, KIMBERLY, S.;
ROBERTS, KIRA;
DUNN, ETHAN y
CHOUGULE, NANA**

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

Observaciones:

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

ES 2 982 696 T3

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

DESCRIPCIÓN

Gen de la toxina AXMI486 y procedimientos para su uso

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

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

15 Las proteínas cristalinas (Cry) (delta-endotoxinas) de *Bacillus thuringiensis* tienen una potente actividad insecticida contra larvas predominantemente de lepidópteros, hemípteros, dípteros y coleópteros. Estas proteínas también han mostrado actividad contra los órdenes de plagas *Hymenoptera*, *Homoptera*, *Phthiraptera*, *Mallophaga* y *Acarí*, así como otros órdenes de invertebrados tales como *Nemathelminthes*, *Platyhelminthes* y *Sarcomastigophora* (Feitelson (1993) The *Bacillus Thuringiensis* family tree. En *Advanced Engineered Pesticides*, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y.) Estas proteínas se clasificaron originalmente como CryI a CryV basándose principalmente en su actividad insecticida. Las clases principales eran específicas de lepidópteros(I), específicas de lepidópteros y dípteros(II), específicas de coleópteros(III), específicas de dípteros(IV) y específicas de nematodos (V) y (VI). Las proteínas se clasificaron a su vez en subfamilias; a las proteínas más emparentadas dentro de cada familia se les asignaron letras de división como Cry1A, Cry1B, Cry1C, etc. A las proteínas aún más estrechamente relacionadas dentro de cada división se les asignaron nombres tales como Cry1C1, Cry1C2, etc.

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

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

40 Las delta-endotoxinas suelen tener cinco dominios de secuencia conservados y tres dominios estructurales conservados (véase, por ejemplo, de Maagd et al. (2001) *Trends Genetics* 17:193-199). El primer dominio estructural conservado consta de siete hélices alfa y participa en la inserción en la membrana y la formación de poros. El dominio II consta de tres hojas beta dispuestas en una configuración de llave griega, y el dominio III consta de dos hojas beta antiparalelas en formación de "jelly-roll" (de Maagd et al., 2001, supra). Los dominios II y III intervienen en el reconocimiento y la unión al receptor, por lo que se consideran determinantes de la especificidad de la toxina.

50 Otras toxinas bacterianas con actividad pesticida contra plagas de lepidópteros, coleópteros, nematodos y dípteros se describen en el documento WO 2007/147096 A2.

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

55 En el presente documento se proporcionan composiciones y procedimientos para conferir actividad pesticida a bacterias, plantas, células vegetales, tejidos y semillas. Las composiciones incluyen moléculas de ácido nucleico que codifican secuencias para polipéptidos pesticidas e insecticidas, vectores que comprenden esas moléculas de ácido nucleico y células huésped que comprenden los vectores. Las composiciones también incluyen las secuencias de polipéptidos pesticidas y los anticuerpos contra esos polipéptidos. Las secuencias de nucleótidos pueden utilizarse en construcciones de ADN o casetes de expresión para la transformación y expresión en organismos, incluidos microorganismos y plantas. Las secuencias de nucleótidos o aminoácidos pueden ser secuencias sintéticas que se han diseñado para su expresión en un organismo, incluyendo, entre otros, un microorganismo o una planta. Las composiciones también comprenden bacterias, plantas, células vegetales, tejidos y semillas que comprenden la secuencia nucleotídica de la invención.

65 En particular, se proporcionan moléculas de ácido nucleico aisladas o recombinantes que codifican una proteína pesticida. Además, se incluyen secuencias de aminoácidos correspondientes a la proteína pesticida. La presente

invención proporciona una molécula de ácido nucleico aislada o recombinante que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO:15-19 o una secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO:3, así como variantes biológicamente activas y fragmentos de la misma. También se incluyen las secuencias de nucleótidos que son complementarias a una secuencia de nucleótidos de la invención, o que hibridan con una secuencia de la invención o un complemento de la misma. Se proporcionan además vectores, células huésped, plantas y semillas que comprenden las secuencias de nucleótidos de la invención, o secuencias de nucleótidos que codifican las secuencias de aminoácidos de la invención, así como variantes biológicamente activas y fragmentos de las mismas.

La presente invención se refiere a un constructo que comprende un promotor heterólogo enlazado operablemente a una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene actividad pesticida contra lepidópteros, en la que dicha secuencia de nucleótidos se selecciona del grupo que consiste en:

- a) la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 3;
- b) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 15-19;
- c) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 98% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 15-19.

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

- a) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 15-19;
- y
- b) un polipéptido que comprenda una secuencia de aminoácidos que tenga al menos 98% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 15-19.

Las composiciones de acuerdo con la presente invención comprenden dicho polipéptido recombinante con actividad pesticida contra lepidópteros.

Se proporcionan procedimientos para producir los polipéptidos de la invención, y para usar esos polipéptidos de acuerdo con la invención para controlar o matar una plaga de lepidópteros. También se incluyen procedimientos y kits para detectar los ácidos nucleicos y polipéptidos de la invención en una muestra.

Las composiciones y procedimientos de la invención son útiles para la producción de organismos con mayor resistencia o tolerancia a las plagas. Estos organismos y las composiciones que los comprenden son deseables para fines agrícolas. Las composiciones de la invención también son útiles para generar proteínas alteradas o mejoradas que tengan actividad pesticida, o para detectar la presencia de proteínas o ácidos nucleicos pesticidas en productos u organismos.

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

- a) la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 3;
- b) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 15-19; y
- c) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 98% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 15-19.

Además, la presente invención abarca un procedimiento para proteger una planta de una plaga de lepidópteros, que comprende expresar en una planta o célula de la misma una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido pesticida que tiene actividad pesticida contra una plaga de lepidópteros, en el que dicha secuencia de nucleótidos se selecciona del grupo que consiste en:

- a) la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO:3;
- b) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 15-19; y
- c) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 98% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 15-19.

La presente invención se refiere a composiciones y procedimientos para regular la resistencia o tolerancia a plagas en organismos, particularmente plantas o células vegetales. Por "resistencia" se entiende que la plaga (por ejemplo, el insecto) muere tras la ingestión u otro contacto con los polipéptidos de la invención. Por "tolerancia" se entiende

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

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

Por lo tanto, en el presente documento se proporcionan nuevas secuencias nucleotídicas aisladas o recombinantes que confieren actividad pesticida. Estas secuencias de nucleótidos codifican polipéptidos con homología a delta-endotoxinas o toxinas binarias conocidas. También se proporcionan las secuencias de aminoácidos de las proteínas pesticidas. La proteína resultante de la traducción de este gen permite a las células controlar o matar las plagas que la ingieren. Las SEQ ID NOs 1-2, 4-14 y 20-26 se divulgan únicamente con fines comparativos.

Moléculas de ácido nucleico aisladas, y sus variantes y fragmentos

Un aspecto de la invención se refiere a moléculas de ácido nucleico aisladas o recombinantes que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican proteínas pesticidas y polipéptidos o porciones biológicamente activas de los mismos, así como moléculas de ácido nucleico suficientes para su uso como sondas de hibridación para identificar moléculas de ácido nucleico que codifican proteínas con regiones de homología de secuencia. También se incluyen secuencias nucleotídicas capaces de hibridar con las secuencias nucleotídicas de la invención en condiciones estrictas, tal como se define en el presente documento. Tal y como se utiliza en el presente documento, el término "molécula de ácido nucleico" pretende incluir moléculas de ADN (por ejemplo, ADN recombinante, ADNc o ADN genómico) y moléculas de ARN (por ejemplo, ARNm) y análogos del ADN o ARN generados utilizando análogos de nucleótidos. La molécula de ácido nucleico puede ser monocatenaria o bicatenaria, pero preferentemente es ADN bicatenario.

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

Las secuencias de nucleótidos que codifican las proteínas de la presente invención incluyen la secuencia establecida en SEQ ID NO:3, y sus variantes, fragmentos y complementos. Por "complemento" se entiende una secuencia de nucleótidos que es lo suficientemente complementaria a una secuencia de nucleótidos dada como para poder hibridarse con la secuencia de nucleótidos dada y formar así un dúplex estable. Las correspondientes secuencias de aminoácidos para las proteínas pesticidas codificadas por estas secuencias nucleotídicas se exponen en SEQ ID NO:15-19.

Las moléculas de ácido nucleico que son fragmentos de estas secuencias de nucleótidos que codifican proteínas pesticidas también están incluidas en la presente invención. Por "fragmento" se entiende una porción de la secuencia de nucleótidos que codifica una proteína pesticida. Un fragmento de una secuencia de nucleótidos puede codificar una porción biológicamente activa de una proteína plaguicida, o puede ser un fragmento que pueda utilizarse como sonda de hibridación o cebador de PCR utilizando los procedimientos que se describen a continuación. Las moléculas

de ácido nucleico que son fragmentos de una secuencia nucleotídica que codifica una proteína plaguicida comprenden al menos aproximadamente 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1350, 1400 nucleótidos contiguos, o hasta el número de nucleótidos presentes en una secuencia nucleotídica de longitud completa que codifica una proteína plaguicida divulgada en el presente documento, dependiendo del uso previsto. Por nucleótidos "contiguos" se entienden los residuos nucleotídicos que son inmediatamente adyacentes entre sí. Los fragmentos de las secuencias nucleotídicas de la presente invención codificarán fragmentos proteicos que conserven la actividad biológica de la proteína plaguicida y, por tanto, conserven la actividad plaguicida. Por lo tanto, también se incluyen los fragmentos biológicamente activos de los polipéptidos aquí descritos. Por "conserva la actividad" se entiende que el fragmento tendrá al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 70%, 80%, 90%, 95% o más de la actividad plaguicida de la proteína plaguicida. En un aspecto ilustrativo, la actividad pesticida es la actividad coleopterica. De acuerdo con la invención, la actividad pesticida es la actividad lepidopterica. En otro aspecto ilustrativo, la actividad pesticida es nematocida. En otro aspecto ilustrativo, la actividad pesticida es la actividad dipterica. En otro aspecto ilustrativo, la actividad pesticida es una actividad hemipterica. Los procedimientos para medir la actividad pesticida son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Czaplá y Lang (1990) J. Econ. Entomol. 83:2480-2485; Andrews et al. (1988) Biochem. J. 252:199-206; Marrone et al. (1985) J. of Economic Entomology 78:290-293y Patente de EE. UU. No. 5,743,477.

Un fragmento de una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína pesticida que codifica una porción biológicamente activa de una proteína de la invención codificará al menos aproximadamente 15, 25, 30, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1050 aminoácidos contiguos, o hasta el número total de aminoácidos presentes en una proteína pesticida de longitud completa de la invención. En algunas realizaciones, el fragmento es un fragmento de escisión proteolítica. Por ejemplo, el fragmento de escisión proteolítica puede tener un truncamiento N-terminal o C-terminal de al menos aproximadamente 30 aminoácidos, al menos aproximadamente 40 aminoácidos, al menos aproximadamente 50, al menos aproximadamente 100 aminoácidos, aproximadamente 120, aproximadamente 130, aproximadamente 140, aproximadamente 150, aproximadamente 160, aproximadamente 170, aproximadamente 180, aproximadamente 190, aproximadamente 200, aproximadamente 210, aproximadamente 220, aproximadamente 230, aproximadamente 240, aproximadamente 250, aproximadamente 275, aproximadamente 300, aproximadamente 350, aproximadamente 400, aproximadamente 450, aproximadamente 500 o aproximadamente 550 aminoácidos en relación con SEQ ID NO: 3. En algunas realizaciones, los fragmentos englobados en el presente documento resultan de la eliminación del dominio de cristalización C-terminal, por ejemplo, por proteólisis, o por inserción de un codón de parada en la secuencia codificante. En algunas formas de realización, los fragmentos englobados en el presente documento resultan de la eliminación del péptido señal N-terminal. Los truncamientos N-terminales pueden comprender además un residuo de metionina en el N-terminal.

Las proteínas pesticidas preferidas de la presente invención están codificadas por una secuencia de nucleótidos suficientemente idéntica a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO:3, o las proteínas pesticidas son suficientemente idénticas a la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO:15-19. Por "suficientemente idéntica" se entiende una secuencia de aminoácidos o nucleótidos que tiene al menos aproximadamente 60% o 65% de identidad de secuencia, aproximadamente 70% o 75% de identidad de secuencia, aproximadamente 80% o 85% de identidad de secuencia, aproximadamente 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad de secuencia comparada con una secuencia de referencia utilizando uno de los programas de alineación descritos en el presente documento utilizando parámetros estándar. Un experto en la técnica reconocerá que estos valores pueden ajustarse adecuadamente para determinar la identidad correspondiente de las proteínas codificadas por dos secuencias de nucleótidos teniendo en cuenta la degeneración de codones, la similitud de aminoácidos, el posicionamiento del marco de lectura y similares.

Para determinar el porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos o de dos ácidos nucleicos, las secuencias se alinean con fines de comparación óptima. El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, porcentaje de identidad = número de posiciones idénticas/número total de posiciones (por ejemplo, posiciones solapadas) x 100). En una realización, las dos secuencias tienen la misma longitud. En otra realización, el porcentaje de identidad se calcula a través de la totalidad de la secuencia de referencia (es decir, la secuencia divulgada en el presente documento como cualquiera de las SEQ ID NO:3, 15-19). El porcentaje de identidad entre dos secuencias puede determinarse utilizando técnicas similares a las descritas a continuación, con o sin permitir huecos. Para calcular el porcentaje de identidad, normalmente se cuentan las coincidencias exactas. Un hueco, es decir, una posición en un alineamiento en la que un residuo está presente en una secuencia, pero no en la otra, se considera una posición con residuos no idénticos. La determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias puede realizarse mediante un algoritmo matemático. Un ejemplo no limitativo de algoritmo matemático utilizado para comparar dos secuencias es el algoritmo de Karlin y Altschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264 modificado como en Karlin y Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877. Este algoritmo se ha incorporado a los programas BLASTN y BLASTX de Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403. Se pueden realizar búsquedas de nucleótidos BLAST con el programa BLASTN, puntuación = 100, longitud de palabra = 12, para obtener secuencias de nucleótidos homólogas a las moléculas de ácido nucleico tipo pesticida de la invención. Se pueden realizar búsquedas de proteínas BLAST con el programa BLASTX, puntuación = 50, longitud de palabra = 3, para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a las moléculas de proteínas pesticidas de la invención. Para obtener alineaciones separadas con fines de comparación, se puede utilizar Gapped

BLAST (en BLAST 2.0) como se describe en Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389. Alternativamente, PSI-Blast puede utilizarse para realizar una búsqueda iterada que detecte relaciones distantes entre moléculas. Véase Altschul et al. (1997) *supra*. Al utilizar los programas BLAST, Gapped BLAST y PSI-Blast, se pueden utilizar los parámetros por defecto de los respectivos programas (por ejemplo, BLASTX y BLASTN). La alineación también puede realizarse manualmente mediante inspección.

Otro ejemplo no limitativo de algoritmo matemático utilizado para la comparación de secuencias es el algoritmo ClustalW (Higgins et al. (1994) Nucleic Acids Res. 22, 4673-4680).

ClustalW compara secuencias y alinea la totalidad de la secuencia de aminoácidos o ADN, por lo que puede proporcionar datos sobre la conservación de la secuencia de aminoácidos completa. El algoritmo ClustalW se utiliza en varios paquetes de software de análisis de ADN/aminoácidos disponibles en el mercado, tal como el módulo ALIGNX del Vector NTI Program Suite (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA). Tras alinear las secuencias de aminoácidos con ClustalW, puede evaluarse el porcentaje de identidad de aminoácidos. Un ejemplo no limitativo de un programa de software útil para el análisis de alineaciones ClustalW es GENEDOC™. GENEDOC™ (Karl Nicholas) permite evaluar la similitud e identidad de aminoácidos (o ADN) entre múltiples proteínas. Otro ejemplo no limitativo de algoritmo matemático utilizado para la comparación de secuencias es el algoritmo de Myers y Miller (1988) CABIOS 4:11-17. Dicho algoritmo está incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0), que forma parte del paquete de software GCG Wisconsin Genetics, versión 10 (disponible en Accelrys, Inc., 9685 Scranton Rd., San Diego, CA, EE. UU.). Al utilizar el programa ALIGN para comparar secuencias de aminoácidos, se puede utilizar una tabla de residuos de peso PAM 120, una penalización de longitud de hueco de 12 y una penalización de hueco de 4.

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

La invención también abarca moléculas de ácido nucleico variantes. Las "variantes" de las secuencias de nucleótidos que codifican las proteínas plaguicidas incluyen aquellas secuencias que codifican las proteínas plaguicidas divulgadas en el presente documento pero que difieren de forma conservadora debido a la degeneración del código genético, así como aquellas que son suficientemente idénticas como se ha comentado anteriormente. Las variantes alélicas de origen natural pueden identificarse con el uso de técnicas de biología molecular bien conocidas, tal como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y las técnicas de hibridación que se describen a continuación. Las secuencias de nucleótidos variantes también incluyen secuencias de nucleótidos derivadas sintéticamente que se han generado, por ejemplo, utilizando mutagénesis dirigida al sitio pero que aún codifican las proteínas plaguicidas divulgadas en la presente invención como se discute a continuación. Las proteínas variantes abarcadas por la presente invención son biológicamente activas, es decir, siguen poseyendo la actividad biológica deseada de la proteína nativa, es decir, actividad pesticida. Por "conserva la actividad" se entiende que la variante tendrá al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 70% o al menos aproximadamente 80% de la actividad pesticida de la proteína nativa. Los procedimientos para medir la actividad pesticida son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Czapla y Lang (1990) J. Econ. Entomol. 83: 2480-2485; Andrews et al. (1988) Biochem. J. 252:199-206; Marrone et al. (1985) J. of Economic Entomology 78:290-293y Patente de EE. UU. No. 5,743,477.

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

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

isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales beta-ramificadas (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina).

Las delta-endotoxinas suelen tener cinco dominios de secuencia conservados y tres dominios estructurales conservados (véase, por ejemplo, de Maagd et al. (2001) Trends Genetics 17:193-199). El primer dominio estructural conservado consta de siete hélices alfa y participa en la inserción en la membrana y la formación de poros. El dominio II consta de tres hojas beta dispuestas en una configuración de llave griega, y el dominio III consta de dos hojas beta antiparalelas en formación de "jelly-roll" (de Maagd et al., 2001, *supra*). Los dominios II y III intervienen en el reconocimiento y la unión al receptor, por lo que se consideran determinantes de la especificidad de la toxina.

Las sustituciones de aminoácidos pueden realizarse en regiones no conservadas que mantienen la función. En general, tales sustituciones no se harían para residuos de aminoácidos conservados, o para residuos de aminoácidos que residan dentro de un motivo conservado, cuando tales residuos sean esenciales para la actividad de la proteína. Ejemplos de residuos que se conservan y que pueden ser esenciales para la actividad de la proteína incluyen, por ejemplo, residuos que son idénticos entre todas las proteínas contenidas en un alineamiento de toxinas similares o relacionadas con las secuencias de la invención (por ejemplo, residuos que son idénticos en un alineamiento de proteínas homólogas). Ejemplos de residuos que se conservan pero que pueden permitir sustituciones conservadoras de aminoácidos y aún retener la actividad incluyen, por ejemplo, residuos que sólo tienen sustituciones conservadoras entre todas las proteínas contenidas en un alineamiento de toxinas similares o relacionadas con las secuencias de la invención (por ejemplo, residuos que sólo tienen sustituciones conservadoras entre todas las proteínas contenidas en el alineamiento proteínas homólogas). Sin embargo, un experto en la técnica entendería que las variantes funcionales pueden tener pequeñas alteraciones conservadas o no conservadas en los residuos conservados.

Alternativamente, las secuencias de nucleótidos variantes pueden hacerse introduciendo mutaciones aleatoriamente a lo largo de toda o parte de la secuencia codificante, tal como por mutagénesis de saturación, y los mutantes resultantes pueden examinarse para determinar la capacidad de conferir actividad pesticida para identificar mutantes que retienen la actividad. Tras la mutagénesis, la proteína codificada puede expresarse de forma recombinante, y la actividad de la proteína puede determinarse mediante técnicas de ensayo estándar.

Utilizando procedimientos tales como PCR, hibridación, y similares, pueden identificarse secuencias pesticidas correspondientes, teniendo dichas secuencias una identidad sustancial con las secuencias de la invención. Véase, por ejemplo, Sambrook y Russell (2001) Molecular Cloning: Manual de laboratorio. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY) y Innis, et al. (1990) PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Academic Press, NY).

En un procedimiento de hibridación, toda o parte de la secuencia de nucleótidos del pesticida puede utilizarse para cribar bibliotecas de ADNc o genómicas. Los procedimientos para la construcción de tales bibliotecas de ADNc y genómicas son generalmente conocidos en la técnica y se divulgan en Sambrook y Russell, 2001, *supra*.

Las llamadas sondas de hibridación pueden ser fragmentos de ADN genómico, fragmentos de ADNc, fragmentos de ARN u otros oligonucleótidos, y pueden estar marcadas con un grupo detectable tal como ^{32}P , o cualquier otro marcador detectable, tal como otros radioisótopos, un compuesto fluorescente, una enzima o un cofactor enzimático. Las sondas para la hibridación pueden fabricarse marcando oligonucleótidos sintéticos basados en la secuencia conocida de nucleótidos codificantes de proteínas plaguicidas divulgada en el presente documento. También pueden utilizarse cebadores degenerados diseñados a partir de nucleótidos o residuos de aminoácidos conservados en la secuencia de nucleótidos o la secuencia de aminoácidos codificada. La sonda comprende típicamente una región de secuencia nucleotídica que hibrida en condiciones estrictas con al menos aproximadamente 12, al menos aproximadamente 25, al menos aproximadamente 50, 75, 100, 125, 150, 175 o 200 nucleótidos consecutivos de secuencia nucleotídica que codifica una proteína pesticida de la invención o un fragmento o variante de la misma. Los procedimientos para la preparación de sondas para hibridación son generalmente conocidos en la técnica y se divulgan en Sambrook y Russell, 2001. Por ejemplo, una secuencia pesticida completa divulgada en el presente documento, o una o más porciones de la misma, puede utilizarse como una sonda capaz de hibridar específicamente con secuencias similares a proteínas pesticidas y ARN mensajeros correspondientes. Para lograr una hibridación específica bajo una variedad de condiciones, dichas sondas incluyen secuencias que son únicas y preferentemente tienen al menos aproximadamente 10 nucleótidos de longitud, o al menos aproximadamente 20 nucleótidos de longitud. Dichas sondas pueden utilizarse para amplificar las secuencias pesticidas correspondientes de un organismo elegido mediante PCR. Esta técnica puede utilizarse para aislar secuencias codificantes adicionales de un organismo deseado o como ensayo de diagnóstico para determinar la presencia de secuencias codificantes en un organismo. Las técnicas de hibridación incluyen el cribado por hibridación de bibliotecas de ADN en placas (ya sean placas o colonias; véase, por ejemplo, Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York).

Por lo tanto, la presente invención abarca sondas para hibridación, así como secuencias de nucleótidos capaces de hibridarse con toda o una parte de una secuencia de nucleótidos de la invención (por ejemplo, al menos aproximadamente 300 nucleótidos, al menos aproximadamente 400, al menos aproximadamente 500, 1000, 1200, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, o hasta la longitud completa de una secuencia de nucleótidos divulgada en el presente

documento). La hibridación de tales secuencias puede llevarse a cabo en condiciones estrictas. Por "condiciones estrictas" o "condiciones estrictas de hibridación" se entienden las condiciones en las que una sonda se hibridará con su secuencia objetivo en un grado detectablemente mayor que con otras secuencias (por ejemplo, al menos 2 veces por encima del fondo). Las condiciones estrictas dependen de la secuencia y serán distintas en circunstancias diferentes. Controlando la rigurosidad de la hibridación y/o las condiciones de lavado, pueden identificarse secuencias objetivo 100% complementarias a la sonda (sondeo homólogo). Alternativamente, las condiciones de rigurosidad pueden ajustarse para permitir cierto desajuste en las secuencias, de modo que se detecten grados inferiores de similitud (sondeo heterólogo). Generalmente, una sonda tiene menos de aproximadamente 1000 nucleótidos de longitud, preferentemente menos de 500 nucleótidos de longitud.

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

La especificidad es típicamente función de los lavados posteriores a la hibridación, siendo los factores críticos la fuerza iónica y la temperatura de la solución de lavado final. Para los híbridos ADN-ADN, la T_m puede aproximarse a partir de la ecuación de Meinkoth y Wahl (1984) Anal. Biochem. 138:267-284: $T_m = 81,5^\circ\text{C} + 16,6 (\log M) + 0,41 (\%GC) - 0,61 (\% \text{ forma}) - 500/L$; donde M es la molaridad de cationes monovalentes, %GC es el porcentaje de nucleótidos de guanosina y citosina en el ADN, % forma es el porcentaje de formamida en la solución de hibridación y L es la longitud del híbrido en pares de bases. La T_m es la temperatura (con una fuerza iónica y un pH definidos) a la que el 50% de una secuencia objetivo complementaria se hibrida con una sonda perfectamente adaptada. La T_m se reduce aproximadamente 1°C por cada 1% de desajuste; por lo tanto, la T_m , la hibridación y/o las condiciones de lavado pueden ajustarse para hibridar con secuencias de la identidad deseada. Por ejemplo, si se buscan secuencias con >90% de identidad, la T_m puede disminuirse 10°C. En general, las condiciones estrictas se seleccionan para que sean aproximadamente 5°C inferiores al punto de fusión térmica (T_m) para la secuencia específica y su complemento a una fuerza iónica y un pH definidos. Sin embargo, las condiciones severamente rigurosas pueden utilizar una hibridación y/o lavado a 1, 2, 3 o 4°C por debajo del punto de fusión térmica (T_m); las condiciones moderadamente rigurosas pueden utilizar una hibridación y/o lavado a 6, 7, 8, 9 o 10°C por debajo del punto de fusión térmica (T_m); las condiciones de baja rigurosidad pueden utilizar una hibridación y/o lavado a 11, 12, 13, 14, 15 o 20°C por debajo del punto de fusión térmica (T_m). Utilizando la ecuación, las composiciones de hibridación y lavado, y la T_m deseada, los expertos comprenderán que las variaciones en la rigurosidad de las soluciones de hibridación y/o lavado se describen de forma inherente. Si el grado de desajuste deseado da como resultado una T_m inferior a 45°C (solución acuosa) o 32°C (solución de formamida), se prefiere aumentar la concentración de CSS para poder utilizar una temperatura más elevada. Una extensa guía sobre la hibridación de ácidos nucleicos se encuentra en Tijssen (1993) Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid Probes, Parte I, Capítulo 2 (Elsevier, New York); y Ausubel et al., eds. (1995) Current Protocols in Molecular Biology, Capítulo 2 (Greene Publishing y Wiley-Interscience, Nueva York). Véase Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York).

Proteínas aisladas y variantes y fragmentos de las mismas

Las proteínas pesticidas también se incluyen en la presente invención. Por "proteína pesticida" se entiende una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO:5-26. También se proporcionan fragmentos, porciones biológicamente activas y variantes de los mismos, que pueden utilizarse para poner en práctica los procedimientos de la presente invención. Una "proteína aislada" o una "proteína recombinante" se utiliza para referirse a una proteína que ya no se encuentra en su entorno natural, por ejemplo, in vitro o en una célula huésped bacteriana o vegetal recombinante.

Los "fragmentos" o "porciones biológicamente activas" incluyen fragmentos polipeptídicos que comprenden secuencias de aminoácidos suficientemente idénticas a la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO:5-26, y que exhiben actividad pesticida. Una porción biológicamente activa de una proteína pesticida puede ser un polipéptido que tenga, por ejemplo, 10, 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1050, 1100, 1150, 1200, 1250, 1300, 1350, o más aminoácidos de longitud. Estas porciones biológicamente activas pueden prepararse mediante técnicas recombinantes y evaluarse para determinar su actividad plaguicida. Los procedimientos para medir la actividad pesticida son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Czaplá y Lang (1990) J. Econ. Entomol. 83:2480-2485; Andrews et al. (1988) Biochem. J. 252:199-206; Marrone et al. (1985) J. of Economic Entomology 78:290-293 y Patente de EE. UU. No. 5,743,477. Como se utiliza

aquí, un fragmento comprende al menos 8 aminoácidos contiguos de SEQ ID NO:5-26. Sin embargo, la invención abarca otros fragmentos, como cualquier fragmento de la proteína de más de aproximadamente 10, 20, 30, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1050, 1100, 1150, 1200, 1250, 1300, 1350 o más aminoácidos de longitud.

Por "variantes" se entiende proteínas o polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 60%, 65%, aproximadamente 70%, 75%, aproximadamente 80%, 85%, aproximadamente 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO:5-26. Las variantes también incluyen polipéptidos codificados por una molécula de ácido nucleico que hibrida con la molécula de ácido nucleico de SEQ ID NO:1-4, o un complemento de la misma, en condiciones estrictas. Las variantes incluyen polipéptidos que difieren en la secuencia de aminoácidos debido a la mutagénesis. Las proteínas variantes abarcadas por la presente invención son biológicamente activas, es decir, siguen poseyendo la actividad biológica deseada de la proteína nativa, es decir, conservando la actividad pesticida. En algunas realizaciones, las variantes tienen una actividad mejorada en relación con la proteína nativa. Los procedimientos para medir la actividad pesticida son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Czapla y Lang (1990) J. Econ. Entomol. 83:2480-2485; Andrews et al. (1988) Biochem. J. 252:199-206; Marrone et al. (1985) J. of Economic Entomology 78:290-293 y Patente de EE. UU. No. 5,743,477. Los genes bacterianos, tales como los axmigenes de esta invención, a menudo poseen múltiples codones de iniciación de metionina en proximidad al comienzo del marco de lectura abierto. A menudo, la iniciación de la traducción en uno o más de estos codones de arranque conducirá a la generación de una proteína funcional. Estos codones de inicio pueden incluir codones ATG. Sin embargo, bacterias como *Bacillus* sp. también reconocen el codón GTG como codón de inicio, y las proteínas que inician la traducción en codones GTG contienen una metionina en el primer aminoácido. En raras ocasiones, la traducción en sistemas bacterianos puede iniciarse en un codón TTG, aunque en este caso el TTG codifica una metionina. Además, no suele determinarse *a priori* cuáles de estos codones se utilizan de forma natural en la bacteria. Así, se entiende que el uso de uno de los codones alternativos de metionina también puede conducir a la generación de proteínas pesticidas. Estas proteínas pesticidas están incluidas en la presente invención y pueden utilizarse en los procedimientos de la presente invención. Se entenderá que, cuando se exprese en plantas, será necesario alterar el codón de inicio alternativo a ATG para una traducción adecuada.

En diversas realizaciones de la presente invención, las proteínas pesticidas incluyen secuencias de aminoácidos deducidas de las secuencias de nucleótidos de longitud completa divulgadas en el presente documento, y secuencias de aminoácidos que son más cortas que las secuencias de longitud completa debido al uso de un sitio de inicio alternativo aguas abajo. Así, la secuencia de nucleótidos de la invención y/o vectores, células huésped y plantas que comprenden la secuencia de nucleótidos de la invención (y procedimientos de fabricación y uso de la secuencia de nucleótidos de la invención) pueden comprender una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos correspondiente a SEQ ID NO:6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 21, 22, 23, 24, 25 y 26.

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

Así, un aspecto de la invención se refiere a anticuerpos, moléculas de unión a antígeno de cadena simple u otras proteínas que se unen específicamente a una o más de las moléculas de proteína o péptido de la invención y sus homólogos, fusiones o fragmentos. En una realización particularmente preferida, el anticuerpo se une específicamente a una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO:5-26 o un fragmento de la misma. En otra realización, el anticuerpo se une específicamente a una proteína de fusión que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO:5-26 o un fragmento de la misma.

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

Los anticuerpos de la invención pueden estar contenidos en un kit útil para la detección de las moléculas proteicas o peptídicas de la invención. La invención comprende además un procedimiento de detección de la molécula proteica o peptídica de la invención (particularmente una proteína codificada por la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO:5-26, incluyendo variantes o fragmentos de la misma que son capaces de unirse específicamente al anticuerpo de la invención) que comprende poner en contacto una muestra con el anticuerpo de la invención y determinar si la muestra contiene la molécula proteica o peptídica de la invención. Los procedimientos para utilizar anticuerpos para la detección de una proteína o péptido de interés son conocidos en la técnica.

Variantes alteradas o mejoradas

Se reconoce que las secuencias de ADN de una proteína pesticida pueden ser alteradas por diversos procedimientos, y que estas alteraciones pueden resultar en secuencias de ADN que codifican proteínas con secuencias de aminoácidos diferentes a la codificada por una proteína pesticida de la presente invención. Esta proteína puede alterarse de diversas maneras, incluyendo sustituciones de aminoácidos, deleciones, truncamientos e inserciones de uno o más aminoácidos de SEQ ID NO:5-26, incluyendo hasta aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7, aproximadamente 8, aproximadamente 9, aproximadamente 10, aproximadamente 15, aproximadamente 20, aproximadamente 25, aproximadamente 30, aproximadamente 35, aproximadamente 40, aproximadamente 45, aproximadamente 50, aproximadamente 55, aproximadamente 60, aproximadamente 65, aproximadamente 70, aproximadamente 75, aproximadamente 80, aproximadamente 85, aproximadamente 90, aproximadamente 100, aproximadamente 105, aproximadamente 110, aproximadamente 115, aproximadamente 120, aproximadamente 125, aproximadamente 130, aproximadamente 135, aproximadamente 140, aproximadamente 145, aproximadamente 150, aproximadamente 155, o más sustituciones, deleciones o inserciones de aminoácidos. Los procedimientos para tales manipulaciones son generalmente conocidos en la técnica. Por ejemplo, se pueden preparar variantes de la secuencia de aminoácidos de una proteína pesticida mediante mutaciones en el ADN. Esto también puede lograrse mediante una de varias formas de mutagénesis y/o en la evolución dirigida. En algunos aspectos, los cambios codificados en la secuencia de aminoácidos no afectarán sustancialmente a la función de la proteína. Tales variantes poseerán la actividad pesticida deseada. Sin embargo, se entiende que la capacidad de una proteína plaguicida para conferir actividad plaguicida puede mejorarse mediante el uso de dichas técnicas en las composiciones de la presente invención. Por ejemplo, se puede expresar una proteína pesticida en células huésped que presenten altas tasas de desincorporación de bases durante la replicación del ADN, tal como XL-1 Red (Stratagene, La Jolla, CA). Tras la propagación en dichas cepas, se puede aislar el ADN (por ejemplo, preparando ADN plasmídico, o amplificando por PCR y clonando el fragmento de PCR resultante en un vector), cultivar las mutaciones de la proteína pesticida en una cepa no mutagénica, e identificar los genes mutados con actividad pesticida, por ejemplo, realizando un ensayo para comprobar la actividad pesticida. Generalmente, la proteína se mezcla y se utiliza en ensayos de alimentación. Véase, por ejemplo, Marrone et al. (1985) J. of Economic Entomology 78:290-293. Dichos ensayos pueden incluir el contacto de las plantas con una o más plagas y la determinación de la capacidad de la planta para sobrevivir y/o causar la muerte de las plagas. Ejemplos de mutaciones que provocan un aumento de la toxicidad se encuentran en Schnepf et al. (1998) Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62:775-806.

Alternativamente, se pueden realizar alteraciones en la secuencia proteica de muchas proteínas en el extremo amino o carboxi sin afectar sustancialmente a la actividad. Esto puede incluir inserciones, deleciones o alteraciones introducidas por procedimientos moleculares modernos, tales como la PCR, incluyendo las amplificaciones por PCR que alteran o amplían la secuencia codificadora de proteínas en virtud de la inclusión de secuencias codificadoras de aminoácidos en los oligonucleótidos utilizados en la amplificación por PCR. Alternativamente, las secuencias de proteínas añadidas pueden incluir secuencias completas de codificación de proteínas, tales como las utilizadas habitualmente en la técnica para generar fusiones de proteínas. Dichas proteínas de fusión se utilizan a menudo para (1) aumentar la expresión de una proteína de interés (2) introducir un dominio de unión, actividad enzimática o epítipo para facilitar la purificación de proteínas, la detección de proteínas u otros usos experimentales conocidos en la técnica (3) dirigir la secreción o traducción de una proteína a un orgánulo subcelular, tal como el espacio periplásmico de las bacterias Gram negativas o el retículo endoplásmico de las células eucariotas, lo que a menudo da lugar a la glicosilación de la proteína.

Las secuencias variantes de nucleótidos y aminoácidos de la presente invención también abarcan secuencias derivadas de procedimientos mutagénicos y recombinogénicos tales como la mezcla de ADN. Con este procedimiento, se pueden utilizar una o más regiones codificantes de proteínas plaguicidas diferentes para crear una nueva proteína plaguicida que posea las propiedades deseadas. De esta manera, las bibliotecas de polinucleótidos recombinantes se generan a partir de una población de polinucleótidos de secuencias relacionadas que comprenden regiones de secuencias que tienen una identidad de secuencia sustancial y pueden recombinarse homológamente *in vitro* o *in vivo*. Por ejemplo, utilizando este enfoque, los motivos de secuencia que codifican un dominio de interés pueden barajarse entre un gen plaguicida de la invención y otros genes plaguicidas conocidos para obtener un nuevo gen que codifique una proteína con una propiedad mejorada de interés, tal como una mayor actividad insecticida. Las estrategias para barajar el ADN son conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, Stemmer (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:10747-10751; Stemmer (1994) Nature 370:389-391; Cramer et al. (1997) Nature Biotech. 15:436-438; Moore et al. (1990) J. Mol. Biol. 272:336-347; Zhang et al. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:4504-4509; Cramer et al. (1998) Nature 391:288-291 y Patentes estadounidenses Nos. 5,605,793 y 5,837,458.

El intercambio o mezclado de dominios es otro mecanismo para generar proteínas pesticidas alteradas. Se pueden intercambiar dominios entre proteínas plaguicidas, lo que da lugar a toxinas híbridas o químicas con una actividad plaguicida o un espectro diana mejorados. Los procedimientos para generar proteínas recombinantes y probar su actividad pesticida son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Naimov et al. (2001) Appl. Environ. Microbiol., 67:5328-5330; de Maagd et al. (1996) Appl. Environ. Microbiol., 62:1537-1543; Ge et al. (1991) J. Biol. Chem. 266:17954-17958; Schnepf et al. (1990) J. Biol. Chem. 265:20923-20930; Rang et al. 91999) Appl. Environ. Microbiol., 65, 2918-2925).

Vectores

Una secuencia pesticida de la invención puede proporcionarse en un casete de expresión para su expresión en una planta de interés. Por "casete de expresión vegetal" se entiende una construcción de ADN capaz de dar lugar a la expresión de una proteína a partir de un marco de lectura abierto en una célula vegetal. Normalmente contienen un promotor y una secuencia codificadora. A menudo, estos constructos también contienen una región 3' no traducida.

Dichas construcciones pueden contener una "secuencia señal" o "secuencia líder" para facilitar el transporte cotraduccional o postraduccional del péptido a determinadas estructuras intracelulares tal como el cloroplasto (u otro plástido), el retículo endoplásmico o el aparato de Golgi.

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

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

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

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

El casete de expresión incluirá en la dirección de transcripción 5'-3', una región de iniciación transcripcional y traslacional (es decir, un promotor), una secuencia de ADN de la invención, y una región de terminación traslacional y transcripcional (es decir, región de terminación) funcional en plantas. El promotor puede ser nativo o análogo, o extraño o heterólogo, al huésped vegetal y/o a la secuencia de ADN de la invención. Además, el promotor puede ser la secuencia natural o alternativamente una secuencia sintética. Cuando el promotor es "nativo" u "homólogo" a la planta huésped, se entiende que el promotor se encuentra en la planta nativa en la que se introduce el promotor. Cuando el promotor es "extraño" o "heterólogo" a la secuencia de ADN de la invención, se entiende que el promotor no es el promotor nativo o natural de la secuencia de ADN enlazada operablemente de la invención.

La región de terminación puede ser nativa con la región de iniciación transcripcional, puede ser nativa con la secuencia de ADN de interés enlazada operablemente, puede ser nativa con la planta huésped, o puede derivarse de otra fuente (es decir, ajena o heteróloga al promotor, la secuencia de ADN de interés, la planta huésped, o cualquier combinación de las mismas). Existen regiones de terminación convenientes en el plásmido Ti de *A. tumefaciens*, tales como las regiones de terminación de la octopina sintasa y la nopalina sintasa. See also 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.

Cuando proceda, el gen o genes pueden optimizarse para aumentar su expresión en la célula huésped transformada. Es decir, los genes pueden sintetizarse utilizando codones preferidos por la célula huésped para mejorar la expresión, o pueden sintetizarse utilizando codones con una frecuencia de uso de codones preferida por el huésped. Generalmente, el contenido de GC del gen aumentará. Véase, por ejemplo, Campbell y Gowri (1990) *Plant Physiol.*

92:1-11 para una discusión sobre el uso de codones preferido por el huésped. Existen procedimientos para sintetizar genes preferidos por las plantas. Véase, por ejemplo, Patentes estadounidenses Nos. 5,380,831 y 5,436,391, Publicación de patente estadounidense No. 20090137409 y Murray et al. (1989) Nucleic Acids Res. 17:477-498.

En una realización, la proteína pesticida se dirige al cloroplasto para su expresión. De este modo, cuando la proteína pesticida no se inserte directamente en el cloroplasto, el casete de expresión contendrá además un ácido nucleico que codifique un péptido de tránsito para dirigir la proteína pesticida a los cloroplastos. Dichos péptidos de tránsito son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Von Heijne et al. (1991) Plant Mol. Biol. Rep. 9:104-126; Clark et al. (1989) J. Biol. Chem. 264:17544-17550; Della-Cioppa et al. (1987) Plant Physiol. 84:965-968; Romer et al. (1993) Biochem. Biophys. Res. Commun. 196:1414-1421; y Shah et al. (1986) Science 233:478-481.

El gen pesticida dirigido al cloroplasto puede optimizarse para su expresión en el cloroplasto para tener en cuenta las diferencias en el uso de codones entre el núcleo de la planta y este orgánulo. De este modo, los ácidos nucleicos de interés pueden sintetizarse utilizando codones preferidos por los cloroplastos. Véase, por ejemplo, la patente estadounidense No. 5,380,831.

Transformación vegetal

Los procedimientos de la invención implican la introducción de un constructo nucleotídico en una planta. Por "introducir" se entiende presentar a la planta el constructo nucleotídico de tal manera que el constructo acceda al interior de una célula de la planta. Los procedimientos de la invención no requieren que se utilice un procedimiento concreto para introducir un constructo nucleotídico en una planta, sólo que el constructo nucleotídico acceda al interior de al menos una célula de la planta. Los procedimientos para introducir constructos nucleotídicos en plantas son conocidos en la técnica, incluyendo, pero sin limitarse a, procedimientos de transformación estable, procedimientos de transformación transitoria y procedimientos mediados por virus. Por "planta" se entienden plantas enteras, órganos vegetales (por ejemplo, hojas, tallos, raíces, etc.), semillas, células vegetales, propágulos, embriones y progenie de los mismos. Las células vegetales pueden ser diferenciadas o indiferenciadas (por ejemplo, callo, células de cultivo en suspensión, protoplastos, células foliares, células radiculares, células del floema, polen).

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

Las plantas transgénicas de la invención expresan una o más de las secuencias de toxinas novedosas divulgadas en el presente documento. En diversas realizaciones, la planta transgénica comprende además uno o más genes adicionales de resistencia a insectos (por ejemplo, Cry1, tal como los miembros de las familias Cry1A, Cry1B, Cry1C, Cry1D, Cry1E y Cry1F; Cry2, tal como los miembros de la familia Cry2A; Cry9, tal como los miembros de las familias Cry9A, Cry9B, Cry9C, Cry9D, Cry9E y Cry9F; etc.). Un experto en la técnica entenderá que la planta transgénica puede comprender cualquier gen que imparta un rasgo agronómico de interés.

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

Normalmente, este "casete de expresión vegetal" se insertará en un "vector de transformación vegetal". Este vector de transformación vegetal puede estar compuesto por uno o más vectores de ADN necesarios para lograr la transformación vegetal. Por ejemplo, es una práctica común en la técnica utilizar vectores de transformación de plantas que se componen de más de un segmento contiguo de ADN. Estos vectores suelen denominarse en la técnica "vectores binarios". Los vectores binarios, así como los vectores con plásmidos auxiliares, se utilizan con mayor frecuencia para la transformación *mediada por Agrobacterium*, donde el tamaño y la complejidad de los segmentos de ADN necesarios para lograr una transformación eficaz son bastante grandes, y resulta ventajoso separar las funciones en moléculas de ADN independientes. Los vectores binarios suelen contener un vector plasmídico que contiene las secuencias de acción cis necesarias para la transferencia de ADN-T (tal como el borde izquierdo y el borde derecho), un marcador seleccionable diseñado para poder expresarse en una célula vegetal y un "gen de interés" (un gen diseñado para poder expresarse en una célula vegetal para la que se desea generar plantas transgénicas). En este vector plasmídico también están presentes secuencias necesarias para la replicación bacteriana. Las secuencias de

acción cis están dispuestas de forma que permitan una transferencia eficaz a las células vegetales y su expresión en ellas. Por ejemplo, el gen marcador seleccionable y el gen pesticida están situados entre los bordes izquierdo y derecho. A menudo, un segundo vector plasmídico contiene los factores trans-actores que median la transferencia del ADN-T de *Agrobacterium* a las células vegetales. Este plásmido contiene a menudo las funciones de virulencia (genes Vir) que permiten la infección de células vegetales por *Agrobacterium*, y la transferencia de ADN por escisión en secuencias frontera y transferencia de ADN mediada por virus, como se entiende en la técnica (Hellens y Mullineaux (2000) Trends in Plant Science 5:446-451). Para la transformación de plantas pueden utilizarse varios tipos de cepas de *Agrobacterium* (por ejemplo, LBA4404, GV3101, EHA101, EHA105, etc.). El segundo vector plasmídico no es necesario para transformar las plantas por otros procedimientos tal como microinyección, microinyección, electroporación, polietilenglicol, etc.

En general, los procedimientos de transformación vegetal implican la transferencia de ADN heterólogo a células vegetales objetivo (por ejemplo, embriones inmaduros o maduros, cultivos en suspensión, callos indiferenciados, protoplastos, etc.), seguida de la aplicación de un nivel umbral máximo de selección apropiado (dependiendo del gen marcador seleccionable) para recuperar las células vegetales transformadas de un grupo de masa celular no transformada. Normalmente, los explantes se transfieren a un nuevo suministro del mismo medio y se cultivan de forma rutinaria. Posteriormente, las células transformadas se diferencian en brotes tras colocarlas en medio de regeneración suplementado con un nivel umbral máximo de agente de selección. A continuación, los brotes se transfieren a un medio de enraizamiento selectivo para recuperar el brote enraizado o la plántula. A continuación, la plántula transgénica crece hasta convertirse en una planta madura y produce semillas fértiles (por ejemplo, Hiei et al. (1994) The Plant Journal 6:271-282; Ishida et al. (1996) Nature Biotechnology 14:745-750). Normalmente, los explantes se transfieren a un nuevo suministro del mismo medio y se cultivan de forma rutinaria. Una descripción general de las técnicas y procedimientos para generar plantas transgénicas se encuentra en Ayres y Park (1994) Critical Reviews in Plant Science 13:219-239 y Bommineni y Jauhar (1997) Maydica 42:107-120. Dado que el material transformado contiene muchas células, tanto las transformadas como las no transformadas están presentes en cualquier trozo de callo o tejido objetivo sometido o grupo de células. La capacidad de eliminar las células no transformadas y permitir la proliferación de las transformadas da lugar a cultivos vegetales transformados. A menudo, la capacidad de eliminar las células no transformadas es una limitación para la rápida recuperación de las células vegetales transformadas y la generación satisfactoria de plantas transgénicas.

Los protocolos de transformación, así como los protocolos para introducir secuencias de nucleótidos en plantas, pueden variar en función del tipo de planta o célula vegetal, es decir, monocotiledónea o dicotiledónea, objetivo de la transformación. La generación de plantas transgénicas puede realizarse por uno de varios procedimientos, incluyendo, pero no limitado a, microinyección, electroporación, transferencia directa de genes, introducción de ADN heterólogo por *Agrobacterium* en células vegetales (transformación mediada por *Agrobacterium*), bombardeo de células vegetales con ADN extraño heterólogo adherido a partículas, aceleración de partículas balísticas, transformación por haz de aerosol (Solicitud Publicada en EE. UU. No. 20010026941; Patente de EE. UU. No. 4,945,050; Publicación Internacional No. WO 91/00915; Solicitud Publicada en EE. UU. No. 2002015066), la transformación Lec1 y otros procedimientos no mediados directamente por partículas para transferir ADN.

Se conocen en la técnica procedimientos para la transformación de cloroplastos. Véase, por ejemplo, Svab et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 87:8526-8530; Svab y Maliga (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 90:913-917; Svab y Maliga (1993) EMBO J. 12:601-606. El procedimiento se basa en el suministro por pistola de partículas de ADN que contiene un marcador seleccionable y en la localización del ADN en el genoma plastidial mediante recombinación homóloga. Además, la transformación plastidial puede llevarse a cabo mediante la transactivación de un transgén plastidial silencioso a través de la expresión tisular preferente de una ARN polimerasa codificada en el núcleo y dirigida por el plásmido. Se ha informado de un sistema de este tipo en McBride et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:7301-7305.

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

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

Evaluación de la transformación de plantas

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

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

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

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

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

Actividad plaguicida en plantas

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

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

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

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

Las verduras incluyen, entre otras, los tomates, la lechuga, las judías verdes, las habas, los guisantes y los miembros del género *Cucumis* tal como el pepino, el melón cantalupo y el melón almizclero. Las plantas ornamentales incluyen,

entre otras, azaleas, hortensias, hibiscos, rosas, tulipanes, narcisos, petunias, claveles, poinsettia y crisantemos. Preferentemente, las plantas de la presente invención son plantas de cultivo (por ejemplo, maíz, sorgo, trigo, girasol, tomate, crucíferas, pimientos, patata, algodón, arroz, soja, remolacha azucarera, caña de azúcar, tabaco, cebada, colza, etc.).

Uso en el control de plaguicidas

Los procedimientos generales para emplear cepas que comprenden una secuencia nucleotídica de la presente invención, o una variante de la misma, en el control de plagas o en la ingeniería de otros organismos como agentes pesticidas son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. y EP 0480762A2. Las cepas de *Bacillus* que contienen una secuencia nucleotídica de la presente invención, o una variante de la misma, o los microorganismos que se han alterado genéticamente para contener un gen pesticida de la invención y proteína pueden utilizarse para proteger los cultivos y productos agrícolas de las plagas. En un aspecto de la invención, las células enteras, es decir, no lisadas, de un organismo productor de toxina (pesticida) se tratan con reactivos que prolongan la actividad de la toxina producida en la célula cuando ésta se aplica al entorno de la(s) plaga(s) objetivo.

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

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

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

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

Las composiciones plaguicidas descritas pueden elaborarse formulando la célula bacteriana, el cristal y/o la suspensión de esporas, o el componente proteico aislado con el portador deseable aceptable desde el punto de vista agrícola. Las composiciones pueden formularse antes de la administración en un medio apropiado, tal como liofilizado, secado en frío, desecado, o en un portador acuoso, medio o diluyente adecuado, tal como solución salina u otro

tampón. Las composiciones formuladas pueden presentarse en forma de polvo o material granular, o en suspensión en aceite (vegetal o mineral), o agua o emulsiones aceite/agua, o como polvo mojable, o en combinación con cualquier otro material portador adecuado para la aplicación agrícola. Los portadores agrícolas adecuados pueden ser sólidos o líquidos y son bien conocidos en la técnica. El término "portador aceptable desde el punto de vista agrícola" abarca todos los adyuvantes, componentes inertes, dispersantes, tensioactivos, adherentes, aglutinantes, etc. que se utilizan habitualmente en la tecnología de formulación de plaguicidas; son bien conocidos por los expertos en formulación de plaguicidas. Las formulaciones pueden mezclarse con uno o más adyuvantes sólidos o líquidos y prepararse por diversos medios, por ejemplo, mezclando homogéneamente, combinando y/o triturando la composición plaguicida con los adyuvantes adecuados mediante técnicas de formulación convencionales. Las formulaciones y procedimientos de aplicación adecuados se describen en Patente de EE. UU. No. 6,468,523.

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

[0092] El orden *Coleoptera* incluye los subórdenes *Adephaga* y *Polyphaga*. El suborden *Adephaga* incluye las superfamilias *Caraboidea* y *Gyrinoidea*, mientras que el suborden *Polyphaga* incluye las superfamilias *Hydrophiloidea*, *Staphylinoidea*, *Cantharoidea*, *Cleroidea*, *Elateroidea*, *Dascilloidea*, *Dryopoidea*, *Byrrhoidea*, *Cucujoidea*, *Meloidea*, *Mordelloidea*, *Tenebrionoidea*, *Bostrichoidea*, *Scarabaeoidea*, *Cerambycoidea*, *Chrysomeloidea* y *Curculionoidea*. La superfamilia *Caraboidea* incluye las familias *Cicindelidae*, *Carabidae* y *Dytiscidae*. La superfamilia *Gyrinoidea* incluye la familia *Gyrinidae*. La superfamilia *Hydrophiloidea* incluye la familia *Hydrophilidae*. La superfamilia *Staphylinoidea* incluye las familias *Silphidae* y *Staphylinidae*. La superfamilia *Cantharoidea* incluye las familias *Cantharidae* y *Lampyridae*. La superfamilia *Cleroidea* incluye las familias *Cleridae* y *Dermestidae*. La superfamilia *Elateroidea* incluye las familias *Elateridae* y *Buprestidae*. La superfamilia *Cucujoidea* incluye la familia *Coccinellidae*. La superfamilia *Meloidea* incluye la familia *Meloidae*. La superfamilia *Tenebrionoidea* incluye la familia *Tenebrionidae*. La superfamilia *Scarabaeoidea* incluye las familias *Passalidae* y *Scarabaeidae*. La superfamilia *Cerambycoidea* incluye la familia *Cerambycidae*. La superfamilia *Chrysomeloidea* incluye la familia *Chrysomelidae*. La superfamilia *Curculionoidea* incluye las familias *Curculionidae* y *Scolytidae*.

El orden *Diptera* incluye los subórdenes *Nematocera*, *Brachycera* y *Cyclorrhapha*. El suborden *Nematocera* incluye las familias *Tipulidae*, *Psychodidae*, *Culicidae*, *Ceratopogonidae*, *Chironomidae*, *Simuliidae*, *Bibionidae* y *Cecidomyiidae*. El suborden *Brachycera* incluye las familias *Stratiomyidae*, *Tabanidae*, *Therevidae*, *Asilidae*, *Mydidae*, *Bombyliidae* y *Dolichopodidae*. El suborden *Cyclorrhapha* incluye las divisiones *Aschiza* y *Aschiza*. La división *Aschiza* incluye las familias *Phoridae*, *Syrphidae* y *Conopidae*. La División *Aschiza* incluye las Secciones *Acalypterae* y *Calypterae*. La sección *Acalypterae* incluye las familias *Otitidae*, *Tephritidae*, *Agromyzidae* y *Drosophilidae*. La sección *Calypterae* incluye las familias *Hippoboscidae*, *Oestridae*, *Tachinidae*, *Anthomyiidae*, *Muscidae*, *Calliphoridae* y *Sarcophagidae*.

El orden *Lepidoptera* incluye las familias *Papilionidae*, *Pieridae*, *Lycaenidae*, *Alymphenidae*, *Danaidae*, *Satyridae*, *Hesperiidae*, *Sphingidae*, *Saturniidae*, *Geometridae*, *Arctiidae*, *Noctuidae*, *Lymantriidae*, *Sesiidae* y *Tineidae*.

Los nematodos incluyen nematodos parásitos tales como los nematodos del nudo de la raíz, del quiste y de la lesión, incluyendo *Heterodera* spp., *Meloidogyne* spp. y *Globodera* spp.; en particular, miembros de los nematodos del quiste, incluyendo, entre otros, *Heterodera glycines* (nematodo del quiste de la soja); *Heterodera schachtii* (nematodo del quiste de la remolacha); *Heterodera avenae* (nematodo del quiste del cereal); y *Globodera rostochiensis* y *Globodera pallida* (nematodos del quiste de la patata). Los nematodos de las lesiones son *Pratylenchus* spp.

Las plagas de hemípteros (que incluyen especies que se designan como Hemiptera, Homoptera o Heteroptera) incluyen, pero no se limitan a, *Lygus* spp, tal como el chinche deslustrado occidental de las plantas (*Lygus hesperus*), el chinche deslustrado de las plantas (*Lygus lineolaris*) y el chinche verde de las plantas (*Lygus elisus*); pulgones, tal como el pulgón verde del melocotonero (*Myzus persicae*), el pulgón del algodón (*Aphis gossypii*), el pulgón de la cereza o pulgón negro de la cereza (*Myzus cerasi*), el pulgón de la soja (*Aphis glycines* *Matsumura*); la chicharrita marrón de las plantas (*Nilaparvata lugens*), y la chicharrita verde del arroz (*Nephotettix* spp.); y chinches apestosas, tal como la chinche apestosa verde (*Acrosternum hilare*), la chinche apestosa marrón (*Halyomorpha halys*), la chinche apestosa verde del sur (*Nezara viridula*), la chinche apestosa del arroz (*Oebalus pugnax*), la chinche del bosque (*Pentatoma rufipes*), la chinche apestosa europea (*Rhaphigaster nebulosa*) y la chinche escudo *Troilus luridus*.

Las plagas de insectos de la invención para los principales cultivos incluyen: Maíz: *Ostrinia nubilalis*, barrenador europeo del maíz; *Agrotis ipsilon*, gusano cortador negro; *Helicoverpa zea*, gusano de la espiga del maíz; *Spodoptera frugiperda*, gusano militar del otoño; *Diatraea grandiosella*, barrenador suroccidental del maíz; *Elasmopalpus lignosellus*, barrenador menor del tallo del maíz; *Diatraea saccharalis*, barrenador de la caña de azúcar; *Diabrotica virgifera*, gusano de la raíz del maíz occidental; *Diabrotica longicornis barberi*, gusano de la raíz del maíz septentrional; *Diabrotica undecimpunctata howardi*, gusano de la raíz del maíz

meridional; *Melanotus* spp., *cyclocephala borealis*, gusano enmascarado del norte (gusano blanco); *Cyclocephala immaculata*, gusano enmascarado del sur (gusano blanco); *Popillia japonica*, escarabajo japonés; *Chaetocnema pulicaria*, escarabajo pulgoso del maíz; *Sphenophorus maidis*, chinche del maíz; *Rhopalosiphum maidis*, pulgón de la hoja del maíz; *Anuraphis maidiradicis*, pulgón de la raíz del maíz; *Blissus leucopterus leucopterus*, chinche; *Melanoplus femurrubrum*, saltamontes; *Melanoplus sanguinipes*, saltamontes migratorio; *Hylemya platura*, gusano del maíz; *Agromyza parvicornis*, minador del maíz; *Anaphothrips obscurus*, trips de la hierba; *Solenopsis milesta*, hormiga ladrona; *Tetranychus urticae*, araña roja; Sorgo: *Chilo partellus*, barrenador del sorgo; *Spodoptera frugiperda*, gusano militar del otoño; *Helicoverpa zea*, gusano de la espiga del maíz; *Elasmopalpus lignosellus*, barrenador menor del tallo del maíz; *Feltia subterranea*, gusano cortador granulado; *Phyllophaga crinita*, gusano blanco; *Eleodes*, *Conoderus* y *Aeolus* spp, gusanos de alambre; *Oulema melanopus*, escarabajo de la hoja del cereal; *Chaetocnema pulicaria*, escarabajo pulgoso del maíz; *Sphenophorus maidis*, chinche del maíz; *Rhopalosiphum maidis*, pulgón de la hoja del maíz; *Sipha flava*, pulgón amarillo de la caña de azúcar; *Blissus leucopterus leucopterus*, chinche; *Contarinia sorghicola*, mosquito del sorgo; *Tetranychus cinnabarinus*, araña roja del carmín; *Tetranychus urticae*, araña roja de dos manchas; Trigo: *Pseudaletia unipunctata*, gusano militar; *Spodoptera frugiperda*, gusano militar del otoño; *Elasmopalpus lignosellus*, barrenador menor del tallo del maíz; *Agrotis orthogonia*, gusano cortador occidental; *Elasmopalpus lignosellus*, barrenador menor del tallo del maíz; *Oulema melanopus*, escarabajo de la hoja del cereal; *Hypera punctata*, gorgojo de la hoja del trébol; *Diabrotica undecimpunctata howardi*, gusano de la raíz del maíz del sur; pulgón ruso del trigo; *Schizaphis graminum*, chinche verde; *Macrosiphum avenae*, pulgón inglés del grano; *Melanoplus femurrubrum*, saltamontes de patas rojas; *Melanoplus differentialis*, saltamontes diferencial; *Melanoplus sanguinipes*, saltamontes migratorio; *Mayetiola destructor*, mosca de Hesse; *Sitodiplosis mosellana*, mosquito del trigo; *Meromyza americana*, gusano del tallo del trigo; *Hylemya coarctata*, mosca del bulbo del trigo; *Frankliniella fusca*, trips del tabaco; *Cephus cinctus*, mosca del tallo del trigo; *Aceria tulipae*, ácaro del rizado del trigo; Girasol: *Suleima helianthana*, polilla del capullo del girasol; *Homoeosoma electellum*, polilla del girasol; *zygogramma exclamationis*, escarabajo del girasol; *Bothyrus gibbosus*, escarabajo de la zanahoria; *Neolasioptera murtfeldtiana*, mosquito de las semillas de girasol; Algodón: *Heliothis virescens*, gusano del algodón; *Helicoverpa zea*, gusano del algodón; *Spodoptera exigua*, gusano de la remolacha; *Pectinophora gossypiella*, gusano rosado del algodón; *Anthonomus grandis*, gorgojo de la cápsula; *Aphis gossypii*, pulgón del algodón; *Pseudatomoscelis seriatus*, pulgón del algodón; *Trialeurodes abutilonea*, mosca blanca de alas anilladas; *Lygus lineolaris*, chinche deslustrada; *Melanoplus femurrubrum*, saltamontes de patas rojas; *Melanoplus differentialis*, saltamontes diferencial; *Thrips tabaci*, trips de la cebolla; *Frankliniella fusca*, trips del tabaco; *Tetranychus cinnabarinus*, araña roja del carmín; *Tetranychus urticae*, araña roja de dos manchas; Arroz: *Diatraea saccharalis*, barrenador de la caña de azúcar; *Spodoptera frugiperda*, gusano militar del otoño; *Helicoverpa zea*, gusano de la espiga del maíz; *Colaspis brunnea*, colaspis de la uva; *Lissorhoptrus oryzophilus*, gorgojo del agua del arroz; *Sitophilus oryzae*, gorgojo del arroz; *Nephotettix nigropictus*, chicharrita del arroz; *Blissus leucopterus leucopterus*, chinche; *Acrosternum hilare*, chinche apestosa verde; Soja: *Pseudopiusia includens*, gusano barrenador de la soja; *Anticarsia gemmatilis*, oruga del frijol terciopelo; *Plathypena scabra*, gusano verde del trébol; *Ostrinia nubilalis*, barrenador europeo del maíz; *Agrotis ipsilon*, gusano cortador negro; *Spodoptera exigua*, gusano militar de la remolacha; *Heliothis virescens*, gusano de la yema del algodón; *Helicoverpa zea*, gusano de la cápsula del algodón; *Epilachna varivestis*, escarabajo mexicano de la judía; *Myzus persicae*, pulgón verde del melocotonero; *Empoasca fabae*, chicharrita de la patata; *Acrosternum hilare*, chinche apestosa verde; *Melanoplus femurrubrum*, saltamontes de patas rojas; *Melanoplus differentialis*, saltamontes diferencial; *Hylemya platura*, gusano de la semilla; *Sericothrips variabilis*, trips de la soja; *Thrips tabaci*, trips de la cebolla; *Tetranychus turkestanii*, araña roja de la fresa; *Tetranychus urticae*, araña roja de dos manchas; Cebada: *Ostrinia nubilalis*, barrenador europeo del maíz; *Agrotis ipsilon*, gusano cortador negro; *Schizaphis graminum*, chinche verde; *Blissus leucopterus leucopterus*, cochinilla; *Acrosternum hilare*, chinche apestosa verde; *Euschistus servus*, chinche apestosa marrón; *Delia platura*, gusano del maíz de siembra; *Mayetiola destructor*, mosca de Hesse; *Petrobia latens*, ácaro marrón del trigo; colza oleaginosa: *Brevicoryne brassicae*, pulgón de la col; *Phyllotreta cruciferae*, escarabajo de la pulga; *Mamestra configurata*, gusano militar de Bertha; *Plutella xylostella*, polilla dorso de diamante; *Delia* spp., gusanos de la raíz.

Los nematodos incluyen nematodos parásitos tales como los nematodos del nudo de la raíz, del quiste y de la lesión, incluyendo *Heterodera* spp., *Meloidogyne* spp. y *Globodera* spp.; en particular, miembros de los nematodos del quiste, incluyendo, entre otros, *Heterodera glycines* (nematodo del quiste de la soja); *Heterodera schachtii* (nematodo del quiste de la remolacha); *Heterodera avenae* (nematodo del quiste del cereal); y *Globodera rostochiensis* y *Globodera pailida* (nematodos del quiste de la patata). Los nematodos de las lesiones son *Pratylenchus* spp.

Procedimientos para aumentar el rendimiento de las plantas

Se proporcionan procedimientos para aumentar el rendimiento de las plantas. Los procedimientos comprenden proporcionar una planta o célula vegetal que exprese un polinucleótido que codifique la secuencia del polipéptido pesticida divulgado en el presente documento y cultivar la planta o una semilla de la misma en un campo infestado con (o susceptible de infestación por) una plaga contra la que dicho polipéptido tenga actividad pesticida. En algunas realizaciones, el polipéptido tiene actividad pesticida contra una plaga de lepidópteros, coleópteros, dípteros, hemípteros o nematodos, y dicho campo está infestado con una plaga de lepidópteros, hemípteros, coleópteros, dípteros o nematodos. Tal y como se define en el presente documento, el "rendimiento" de la planta se refiere a la

calidad y/o cantidad de biomasa producida por la planta. Por "biomasa" se entiende cualquier producto vegetal medido. Un aumento en la producción de biomasa es cualquier mejora en el rendimiento del producto vegetal medido. Aumentar el rendimiento de las plantas tiene varias aplicaciones comerciales. Por ejemplo, el aumento de la biomasa de las hojas de las plantas puede incrementar el rendimiento de las hortalizas de hoja verde para consumo humano o animal. Además, el aumento de la biomasa foliar puede utilizarse para incrementar la producción de productos farmacéuticos o industriales derivados de plantas. Un aumento del rendimiento puede comprender cualquier aumento estadísticamente significativo que incluya, entre otros, al menos un aumento del 1%, al menos un aumento del 3%, al menos un aumento del 5%, al menos un aumento del 10%, al menos un aumento del 20%, al menos un aumento del 30%, al menos un aumento del 50%, al menos un aumento del 70%, al menos un aumento del 100% o un aumento mayor del rendimiento en comparación con una planta que no exprese la secuencia pesticida. En procedimientos específicos, el rendimiento de la planta se incrementa como resultado de la mejora de la resistencia a las plagas de una planta que expresa una proteína pesticida divulgada en el presente documento. La expresión de la proteína pesticida reduce la capacidad de la plaga para infestar o alimentarse.

Las plantas también pueden tratarse con una o más composiciones químicas, incluyendo uno o más herbicidas, insecticidas o fungicidas. Las composiciones químicas ejemplares incluyen: Frutas y verduras Herbicidas: Atrazina, Bromacil, Diurón, Glifosato, Linurón, Metribuzin, Simazina, Trifluralina, Fluazifop, Glufosinato, Halosulfurón Gowan, Paraquat, Propizamida, Setoxidim, Butafenacil, Halosulfurón, Indaziflam; Insecticidas para frutas y verduras: Aldicarb, Bacillus thuringiensis, Carbaril, Carbofurano, Clorpirifos, Cipermetrina, Deltametrina, Abamectina, Ciflutrina/beta-ciflutrina, Esfenvalerato, Lambda-cialotrina, Acequinocilo, Bifenazato, Metoxifeno, Novalurón, Cromafenozida, Tiacloprid, Dinotefurano, Flucicopirima, Espirodiclofeno, Gamma-cialotrina, Spiromesifeno, Spinosad, Rynaxypyr, Cyazypyr, Triflumuron, Spirotetramat, Imidacloprid, Flubendiamida, Thiodicarb, Metaflumizone, Sulfoxaflor, Cyflumetofen, Cyanopirafen, Clothianidin, Thiamethoxam, Spinetoram, Thiodicarb, Flonicamid, Methiocarb, Emamectin-benzooate, Indoxacarb, Fenamiphos, Pyriproxifen, Fenbutatin-oxid; Fungicidas para frutas y hortalizas: Ametoctradin, Azoxystrobin, Benthialdicarb, Boscalid, Captan, Carbendazim, Clorothalonil, Copper, Cyazofamid, Cyflufenamid, Cymoxanil, Cyproconazole, Cyprodinil, Difenconazole, Dimetomorfo, Ditanol, Fenamidona, Fenhexamida, Fluazinam, Fludioxonil, Flupicolida, Flupiram, Fluoxastrobina, Fluxapiraxad, Folpet, Fosetil, Iprodiona, Iprovalicarb, Isopirazam, Kresoxim-metilo, Mancozeb, Mandipropamid, Metalaxil/mefenoxam, Metiram, Metrafenona, Miclobutanil, Penconazol, Pentiopirad, Picoxistrobina, Propamocarb, Propiconazol, Propineb, Proquinazid, Prothioconazol, Piraclostrobina, Pirimetanil, Quinoxifeno, Espiroxamina, Azufre, Tebuconazol, Tiofanato-metil, Trifloxistrobina; Herbicidas para cereales: 2,4-D, Amidosulfurón, Bromoxinil, Carfentrazona-E, Clorotolurón, Clorsulfurón, Clodinafop-P, Clopiralida, Dicamba, Diclofop-M, Diflufenicán, Fenoxaprop, Florasulam, Flucarbazona-NA, Flufenacet, Flupirosulfurón-M, Fluroxipir, Flurtamona, Glifosato, Iodosulfurón, Ioxinil, Isoproturon, MCPA, Mesosulfurón, Metsulfurón, Pendimetalina, Pinoxaden, Propoxycarbazona, Prosulfocarb, Piroxulam, Sulfosulfurón, Tifensulfurón, Tralkoxidim, Triasulfurón, Tribenuron, Trifluralina, Tritosulfurón; Fungicidas para cereales: Azoxystrobin, Bixafen, Boscalid, Carbendazim, Chlorothalonil, Cyflufenamid, Cyproconazole, Cyprodinil, Dimoxistrobina, Epoxiconazol, Fenpropidin, Fenpropimorph, Flupyram, Fluoxastrobina, Fluquinconazole, Fluxapiraxad, Isopyrazam, Kresoxim-metilo, Metconazol, Metrafenona, Pentiopirad, Picoxistrobina, Procloraz, Propiconazol, Proquinazid, Prothioconazol, Piraclostrobina, Quinoxifeno, Espiroxamina, Tebuconazol, Tiofanato-metilo, Trifloxistrobina; Insecticidas para cereales: Dimetoato, lambda-cihalotrina, deltametrina, alfa-cipermetrina, beta-ciflutrina, bifentrina, imidacloprid, clotianidina, tiamectoxam, tiacloprid, acetamiprid, dinotefurano, clorpirifos, pirimicarb, metiocarb, sulfoxaflor; herbicidas para el maíz: Atrazina, alacloro, bromoxinil, acetocloro, dicamba, clopiralida, (S-)dimetenamida, glufosinato, glifosato, isoxaflutol, (S-)metolaclo, mesotriona, nicosulfurón, primisulfurón, rimsulfurón, sulcotriona, foramsulfurón, topamezona, tembotriona, saflufenacil, tienocarbazona, flufenacet, piroxasulfon; Insecticidas para el maíz: Carbofurano, clorpirifos, bifentrina, fipronil, imidacloprid, lambda-cialotrina, teflutrina, terbufos, tiamectoxam, clotianidina, espiromesifeno, flubendiamida, triflumuron, Rynaxypyr, Deltamethrin, Thiodicarb, beta-Cyfluthrin, Cypermethrin, Bifenthrin, Lufenuron, Tebupiriphos, Ethiprole, Cyazypyr, Thiacloprid, Acetamiprid, Dinotefuran, Avermectin; Fungicidas para el maíz: Azoxystrobina, Bixafen, Boscalid, Ciproconazol, Dimoxistrobina, Epoxiconazol, Fenitropan, Flupiram, Fluoxastrobina, Fluxapiraxad, Isopirazam, Metconazol, Pentiopirad, Picoxistrobina, Propiconazol, Prothioconazol, Piraclostrobina, Tebuconazol, Trifloxistrobina; Herbicidas para el arroz: Butacloro, Propanil, Azimsulfurón, Bensulfurón, Cihalofop, Daimurón, Fentrazamida, Imazosulfurón, Mefenacet, Oxaziclonemefona, Pirazosulfurón, Piributicarb, Quinclorac, Tiobencarb, Indanofán, Flufenacet, Fentrazamida, Halosulfurón, Oxaziclonemefona, Benzobicyclón, Piritalida, Penoxsulam, Bispiribac, Oxadiargilo, Etoxisulfurón, Pretilaclo, Mesotriona, Tefuriltriona, Oxadiazona, Fenoxaprop, Pirimisulfán; Insecticidas para el arroz: Diazinón, Fenobucarb, Benfuracarb, Buprofezina, Dinotefuran, Fipronil, Imidacloprid, Isoprocarb, Tiacloprid, Cromafenozida, Clotianidina, Etiprol, Flubendiamida, Rynaxypyr, Deltametrina, Acetamiprid, Tiametoxam, Cyazypyr, Spinosad, Spinetoram, Emamectin-Benzooate, Cipermetrina, Clorpirifos, Etofenprox, Carbofurano, Benfuracarb, Sulfoxaflor; Fungicidas para el arroz: Azoxistrobina, Carbendazim, Carpropamid, Diclocymet, Difenconazole, Edifenfos, Ferimzone, Gentamicina, Hexaconazol, Hymexazol, Iprobenfos (IBP), Isoprotiolano, Isotianil, Kasugamicina, Mancozeb, Metominostrobin, Orysastrobina, Pencycuron, Probenazole, Propiconazole, Propineb, Pyroquilon, Tebuconazole, Tiofanato-metilo, Tiadinil, Triciclazol, Trifloxistrobina, Validamicina; Herbicidas para el algodón: Diurón, Fluometuron, MSMA, Oxifluorfen, Prometrina, Trifluralina, Carfentrazona, Clotodim, Fluazifop-butilo, Glifosato, Norflurazón, Pendimetalina, Piritibac-sodio, Trifloxisulfurón, Tepraloxidim, Glufosinato, Flumioxazina, Tiazazurón; Insecticidas para el algodón: Acefato, Aldicarb, Clorpirifos, Cipermetrina, Deltametrina, Abamectina, Acetamiprid, Benzoato de emamectina, Imidacloprid, Indoxacarb, Lambda-cihalotrina, Espinosad, Tiodicarb, Gamma-cihalotrina, Espiromesifeno, Pridalil, Flonicamida, Flubendiamida, Triflumuron, Rynaxipir, Beta-ciflutrina, Spirotetramat,

clotianidina, tiametoxam, tiacloprid, dinetofurano, flubendiamida, ciazipir, espinosad, espinotoram, gammacihalotrina, 4-[[[(6-clorpiridin-3-il)metil](2,2-difluoroetil)amino]furano-2(5H)-on, tiodicarb, avermectina, flonicamid, piridilil, espiromesifeno, sulfoxaflor; Fungicidas para el algodón: Azoxistrobina, Bixafeno, Boscalid, Carbendazima, Clorotalonil, Cobre, Ciproconazol, Difenconazol, Dimoxistrobina, Epoxiconazol, Fenamidona, Fluazinam, Fluopiram, Fluoxastrobina, Fluxaproxad, Iprodiona, Isopirazam, Isotianil, Mancozeb, Maneb, Metominostrobin, Penthiopyrad, Picoxistrobina, Propineb, Protiocanazol, Piraclostrobina, Quintozeno, Tebuconazol, Tetraconazol, Tiofanato-metilo, Trifloxistrobina; Herbicidas para la soja: Alacloro, Bentazona, Trifluralina, Clorimurón-etilo, Cloransulam-metilo, Fenoxaprop, Fomesafén, Fluazifop, Glifosato, Imazamox, Imazaquín, Imazetapir, (S-)Metolaclo, Metribuzin, Pendimetalina, Tepraloxim, Glufosinato; Insecticidas para soja: Lambda-cihalotrina, metomilo, imidacloprid, clotianidina, tiametoxam, tiacloprid, acetamiprid, dinetofurano, flubendiamida, rinaxipir, ciazipir, espinosad, espinotoram, benzoato de emamectina, fipronil, etiprol, Deltametrina, β -ciflutrina, gamma y lambda cihalotrina, 4-[[[(6-clorpiridin-3-il)metil](2,2-difluoroetil)amino]furano-2(5H)-on, espirotetramat, espinodiclofeno, triflumurón, flonicamida, tiodicarb, beta-ciflutrina; Fungicidas para la soja: Azoxistrobin, Bixafen, Boscalid, Carbendazim, Clorotalonil, Cobre, Ciproconazol, Difenconazol, Dimoxistrobina, Epoxiconazol, Fluazinam, Fluopyram, Fluoxastrobin, Flutrialol, Fluxaproxad, Isopirazam, Iprodiona, Isotianil, Mancozeb, Maneb, Metconazol, Metominostrobin, Miclobutanil, Penthiopyrad, Picoxistrobina, Propiconazole, Propineb, Protiocanazol, Piraclostrobina, Tebuconazole, Tetraconazol, Tiofanato-metilo, Trifloxistrobina; Herbicidas para remolacha azucarera: Cloridazón, Desmedifam, Etofumesato, Fenmedifam, Trialato, Clopiralida, Fluazifop, Lenacil, Metamitrón, Quinmerac, Cicloxidim, Triflurosulfurón, Tepraloxim, Quizalofop; Insecticidas para remolacha azucarera: Imidacloprid, clotianidina, tiametoxam, tiacloprid, acetamiprid, dinetofurano, deltametrina, β -ciflutrina, gamma/lambda cihalotrina, 4-[[[(6-clorpiridin-3-il)metil](2,2-difluoroetil)amino]furano-2(5H)-on, teflutrina, rinaxipir, ciazipir, fipronil, carbofurano; Herbicidas para la colza: Clopiralida, diclofop, fluazifop, glufosinato, glifosato, metazaclo, trifluralina, etametsulfurón, quinmerac, quizalofop, cletodim, tepraloxim; fungicidas para la colza: Azoxistrobina, Bixafen, Boscalid, Carbendazim, Ciproconazol, Difenconazole, Dimoxystrobin, Epoxiconazol, Fluazinam, Fluopyram, Fluoxastrobin, Flusilazol, Fluxaproxad, Iprodione, Isopyrazam, Mepiquat-cloruro, Metconazole, Metominostrobin, Paclobutrazole, Penthiopyrad, Picoxistrobina, Procloraz, Protiocanazol, Piraclostrobina, Tebuconazol, Tiofanato-metil, Trifloxistrobina, Vinclozolina; Insecticidas para colza: Carbofurano, tiacloprid, deltametrina, imidacloprid, clotianidina, tiametoxam, acetamiprid, dinetofurano, β -ciflutrina, gamma y lambda cihalotrina, tau-Fluvalerate, Etiproe, Spinosad, Spinotoram, Flubendiamide, Rynaxypyr, Cyazypyr, 4-[[[(6-clorpiridin-3-il)metil](2,2-difluoroetil)amino]furan-2(5H)-on.

Los siguientes ejemplos se ofrecen a título ilustrativo y no limitativo. Las Tablas 3 y 7 representan ejemplos de acuerdo con la invención. Las Tablas 1, 2, 4-6, 8 se presentan únicamente a efectos comparativos.

EJEMPLOS EXPERIMENTALES

Ejemplo 1. Descubrimiento de nuevos genes pesticidas de *Bacillus thuringiensis*

Se identificaron nuevos genes pesticidas a partir de las cepas bacterianas ATX47307 y ATX65002 siguiendo los siguientes pasos:

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

Tabla 1. Nuevo gen identificado en la cepa ATX47307

Nombre genético	Peso molecular (kD)	Homólogo cercano	más	Nucleótido (SEQ ID NO)	Aminoácido SEQ ID NO
Axmi477	132	75% Cry9Ba1	1		5
Axmi477.2					6
Axmi477.3					7
Axmi477(trun)		60% Cry9Ba1(trun)			8
Axmi477.2(trun)					9
Axmi477.3(trun)					10

Axmi477.2 y Axmi477.3 representan proteínas codificadas a partir de un sitio de inicio corriente abajo en relación con Axmi477.

Tabla 2. Nuevo gen identificado en la cepa ATX47307

Nombre genético	Peso molecular (kD)	Homólogo cercano	más	Nucleótido (SEQ ID NO)	Aminoácido SEQ ID NO
Axmi482	37	94% Axmi486; Mtx3	51%	2	11
Axmi482.2					12
Axmi482.3					13
Axmi482.4					14
Axmi482.2, Axmi482.3 y Axmi482.4 representan proteínas codificadas a partir de un sitio de inicio corriente abajo en relación con Axmi482.					

5 Tabla 3. Nuevo gen identificado en la cepa ATX65002

Nombre genético	Peso molecular (kD)	Homólogo cercano	más	Nucleótido (SEQ ID NO)	Aminoácido SEQ ID NO
Axmi486	38	94% Axmi482; Mtx3	49%	3	15
Axmi486.2					16
Axmi486.3					17
Axmi486.4					18
Axmi486.5					19
Axmi486.2, Axmi486.3, Axmi486.4 y Axmi486.5 representan proteínas codificadas a partir de un sitio de inicio corriente abajo en relación con Axmi486.					

Tabla 4. Nuevo gen identificado en la cepa ATX65002

Nombre genético	Peso molecular (kD)	Homólogo cercano	más	Nucleótido (SEQ ID NO)	Aminoácido SEQ ID NO
>(Axmi525)	38	97% Axmi486; Mtx3	51%	4	20
>(Axmi525.2)					21
>(Axmi525.3)					22

10 (continuación)

Nombre genético	Peso molecular (kD)	Homólogo cercano	más	Nucleótido (SEQ ID NO)	Aminoácido SEQ ID NO
>(Axmi525.4)					23
>(Axmi525.5)					24
>(Axmi525.6)					25
>(Axmi525.7)					26
Axmi525.2, Axmi525.3, Axmi525.4, Axmi525.5, Axmi525.6 y Axmi525.7 representan proteínas codificadas a partir de un sitio de inicio corriente abajo en relación con Axmi525.					

Ejemplo 2. Ensayos de actividad pesticida

15 Las secuencias nucleotídicas de la invención pueden probarse para determinar su capacidad de producir proteínas
 20 pesticidas. La capacidad de una proteína plaguicida para actuar como tal sobre una plaga suele evaluarse de varias
 maneras. Una forma bien conocida en la técnica es realizar un ensayo de alimentación. En un ensayo de alimentación
 de este tipo, se expone a la plaga a una muestra que contiene compuestos a ensayar o muestras de control. A menudo
 esto se lleva a cabo colocando el material a ensayar, o una dilución adecuada de dicho material, sobre un material
 que la plaga vaya a ingerir, como una dieta artificial. El material que se va a ensayar puede estar compuesto por un

líquido, un sólido o un lodo. El material que se va a ensayar puede colocarse sobre la superficie y dejar que se seque. Alternativamente, el material que se va a ensayar puede mezclarse con una dieta artificial fundida y, a continuación, dispensarse en la cámara de ensayo. La cámara de ensayo puede ser, por ejemplo, una taza, un plato o un pocillo de una placa de microtitulación.

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

Otros tipos de ensayos pueden incluir la microinyección del material de ensayo en la boca o intestino de la plaga, así como el desarrollo de plantas transgénicas, seguido de la prueba de la capacidad de la plaga para alimentarse de la planta transgénica. Las pruebas en plantas pueden implicar el aislamiento de las partes de la planta que normalmente se consumen, por ejemplo, pequeñas jaulas unidas a una hoja, o el aislamiento de plantas enteras en jaulas que contienen insectos.

Otros procedimientos y enfoques para ensayar plagas son conocidos en la técnica, y pueden encontrarse, por ejemplo, en Robertson y Preisler, eds. (1992) *Pesticide bioassays with arthropods*, CRC, Boca Raton, FL. Como alternativa, los ensayos suelen describirse en las revistas *Arthropod Management Tests* y *Journal of Economic Entomology* o mediante conversaciones con miembros de la Entomological Society of America (ESA).

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

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

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

Ejemplo 3. Expresión y purificación

Las variantes truncadas de Axmi477 (que se establece en el presente documento como SEQ ID NO:8), Axmi482 (que se establece en el presente documento como SEQ ID NO:13), Axmi486 (que se establece en el presente documento como SEQ ID NO:16), y Axmi525 (que se establece en el presente documento como SEQ ID NO:26), se expresaron y ensayaron para bioactividad. Los genes se amplificaron por PCR a partir de sus respectivas cepas utilizando HERCULASE® II Fusion DNA Polymerase con cebadores que incorporaban un enlazador *Ascl* en el extremo 3'. El producto amplificado de la PCR se digirió con *Ascl* y se ligó al vector pMalC4X. Los clones se confirmaron mediante secuenciación y se transformaron en células competentes BI21. Se inoculó una sola colonia de cada una en medio LB y se cultivó a 37°C hasta la fase logarítmica, y se indujo con 0,5 mM de IPTG a 20°C durante 18 horas. La proteína purificada se digirió con Factor Xa en una proporción de 1:50 a temperatura ambiente durante toda la noche. La proteína purificada se sometió a bioensayo frente a plagas de insectos seleccionadas según el protocolo estándar. Los resultados se muestran en las Tablas 5-8.

Tabla 5. Puntuaciones de mortalidad y retraso del crecimiento para Axmi477

Grupo de plagas	Puntuación de retraso	Porcentaje de mortalidad
<i>Plutella xylostella</i> (DBM)	4	100
<i>Anticarsia gemmatilis</i> (VBC)	4	100
<i>Diatraea grandiosella</i> (SWCB)	3,5	25

<i>Diatraea saccharalis</i> (SCB)	3,5	0
<i>Heliothis virescens</i> (Hv)	4	75
<i>Heliocoverpa zea</i> (Hz)	2	25
<i>Ostrinia nubilalis</i> (BCE)	3	25
<i>Spodoptera frugiperda</i> (FAW)	1	0
<i>Spodoptera exigua</i> (BAW)	3	0
<i>Agrotis ipsilon</i> (BCW)	4	0
<i>Pseudoplusia includens</i> (SBL)	4	100

Tabla 6: Puntuaciones de mortalidad y retraso del crecimiento para Axmi482

Grupo de plagas	Puntuación de retraso	Porcentaje mortalidad de
<i>Plutella xylostella</i> (DBM)	4	100
<i>Anticarsia gemmatilis</i> (VBC)	4	75
<i>Diatraea grandiosella</i> (SWCB)	4	50
<i>Diatraea saccharalis</i> (SCB)	3	0
<i>Heliothis virescens</i> (Hv)	1	0
<i>Heliocoverpa zea</i> (Hz)	4	0
<i>Ostrinia nubilalis</i> (BCE)	3	1
<i>Spodoptera frugiperda</i> (FAW)	3	0

Tabla 7: Puntuaciones de mortalidad y retraso del crecimiento para Axmi486

Grupo de plagas	Puntuación de retraso	Porcentaje mortalidad de
<i>Plutella xylostella</i> (DBM)	4	100
<i>Anticarsia gemmatilis</i> (VBC)	4	37
<i>Diatraea grandiosella</i> (SWCB)	3,5	50
<i>Diatraea saccharalis</i> (SCB)	2,5	25
<i>Heliothis virescens</i> (Hv)	3,5	0
<i>Heliocoverpa zea</i> (Hz)	3	0
<i>Pseudoplusia includens</i> (SBL)	1	0

Tabla 8: Puntuaciones de mortalidad y retraso del crecimiento para Axmi525

Grupo de plagas	Puntuación de retraso	Porcentaje de mortalidad
<i>Spodoptera frugiperda</i> (FAW)	1	0 %
<i>Heliothis virescens</i> (Hv)	1,5	0 %
<i>Helicoverpa zea</i> (Hz)	3	0 %
<i>Anticarsia gemmatilis</i> (VBC)	4	42 %
<i>Spodoptera eridania</i> (SAW)	3,2	70 %
<i>Plutella xylostella</i> (DBM)	4	100 %
<i>Diatraea grandiosella</i> (SWCB)	4	83 %
<i>Diatraea crambidoides</i> (SCB)	4	66 %

Puntuación de atrofia:

- 5 0 - Sin actividad
 1- Atrofia no uniforme
 2- Atrofia ligera no uniforme
 3 - Atrofia uniforme fuerte
 10 4 - Atrofia uniforme grave

Ejemplo 4. Vectorización de genes para su expresión en plantas

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

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

En otro aspecto de la invención, se diseñan versiones modificadas de los genes sintéticos de forma que el péptido resultante se dirija a un orgánulo vegetal, tal como el retículo endoplásmico o el apoplasto. Las secuencias peptídicas que permiten dirigir las proteínas de fusión a orgánulos vegetales son conocidas en la técnica. Por ejemplo, la región N-terminal del gen de la fosfatasa ácida del altramuza blanco *Lupinus albus* (GENBANKO ID GI:14276838, Miller et al. (2001) Plant Physiology 127: 594-606) es conocido en la técnica por dar lugar a la orientación de proteínas heterólogas al retículo endoplásmico. Si la proteína de fusión resultante también contiene una secuencia de retención del retículo endoplásmico que comprende el péptido N-terminal-lisina-ácido aspártico-ácido glutámico-leucina (es decir, el motivo "KDEL", SEQ ID NO:27) en el C-terminal, la proteína de fusión se dirigirá al retículo endoplásmico. Si la proteína de fusión carece de una secuencia dirigida al retículo endoplásmico en el extremo C-terminal, la proteína se dirigirá al retículo endoplásmico, pero finalmente quedará secuestrada en el apoplasto.

Así, este gen codifica una proteína de fusión que contiene los treinta y un aminoácidos N-terminales del gen de la fosfatasa ácida del altramuza blanco *Lupinus albus* (GENBANK® ID GI: 14276838, Miller et al., 2001, *supra*) fusionada al N-terminal de la secuencia de aminoácidos de la invención, así como la secuencia KDEL (SEQ ID NO:27) en el C-terminal. Por lo tanto, se prevé que la proteína resultante se dirija al retículo endoplásmico de la planta tras su expresión en una célula vegetal.

Los casetes de expresión vegetal descritos anteriormente se combinan con un marcador vegetal seleccionable apropiado para ayudar en la selección de células y tejidos transformados, y se ligan en vectores de transformación vegetal. Estos pueden incluir vectores binarios de transformación *mediada por Agrobacterium* o vectores plasmídicos simples para la transformación por aerosol o biolística.

Ejemplo 5. Transformación de células de maíz con los genes de proteínas pesticidas descritos en el presente documento

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

Los explantes resultantes se transfieren a cuadrados de malla (30-40 por placa), se transfieren a un medio osmótico durante aproximadamente 30-45 minutos y, a continuación, se transfieren a una placa de irradiación (véase, por ejemplo, Publicación PCT No. WO/0138514 y Patente de EE.UU No. 5,240,842).

Los constructos de ADN diseñados para los genes de la invención en células vegetales se aceleran en el tejido vegetal utilizando un acelerador de haz de aerosol, utilizando condiciones esencialmente como las descritas en Publicación PCT No. WO/0138514. Tras la irradiación, los embriones se incuban durante aproximadamente 30 minutos en un medio osmótico y se colocan en un medio de incubación durante toda la noche a 25 °C en la oscuridad. Para evitar dañar indebidamente los explantes irradiados, se incuban durante al menos 24 horas antes de transferirlos a los medios de recuperación. A continuación, los embriones se extienden en un medio para el período de recuperación, durante aproximadamente 5 días, a 25 °C en la oscuridad, y luego se transfieren a un medio de selección. Los explantes se incuban en medios de selección durante un máximo de ocho semanas, dependiendo de la naturaleza y las características de la selección concreta utilizada. Tras el período de selección, el callo resultante se transfiere a un medio de maduración de embriones, hasta que se observa la formación de embriones somáticos maduros. A continuación, los embriones somáticos maduros resultantes se colocan bajo luz tenue y se inicia el procedimiento de regeneración por procedimientos conocidos en la técnica. Los brotes resultantes se dejan enraizar en medios de enraizamiento, y las plantas resultantes se transfieren a macetas de vivero y se propagan como plantas transgénicas.

Materiales:**DN62A5S Medios de comunicación**

Componentes	Por litro	Fuente
Chu's N6 Basal Salt Mixture (Prod. No. C 416)	3,98 g/L	Laboratorios fitotecnología de

(continuación)

Componentes	Por litro	Fuente
Chu's N6 Solución Vitamínica (Prod. No. C 149)	1 mL/L (de 1000x Stock)	Laboratorios fitotecnología de
L-Asparagina	800 mg/L	Laboratorios fitotecnología de
Mio-inositol	100 mg/L	Sigma
L-Prolina	1,4 g/L	Laboratorios fitotecnología de
Casaminoácidos	100 mg/L	Fisher Scientific
Sacarosa	50 g/L	Laboratorios fitotecnología de
2,4-D (Prod. No. D-7299)	1 mL/L (de 1 mg/mL Stock)	Sigma

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

Ejemplo 6. Transformación de genes de la invención en células vegetales mediante transformación mediada por *Agrobacterium*

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

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

REIVINDICACIONES

1. Un constructo que comprende un promotor heterólogo enlazado operablemente a una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene actividad plaguicida contra lepidópteros, en la que dicha secuencia de nucleótidos se selecciona del grupo que consiste en:

- a) la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 3;
- b) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 15-19;
- c) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 98% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 15-19.

2. El constructo de la reivindicación 1, en la que dicha secuencia de nucleótidos es:

- a) una secuencia sintética diseñada para su expresión en una planta; o
- b) unido de forma operable a un promotor capaz de dirigir la expresión de dicha secuencia de nucleótidos en una célula vegetal.

3. Un vector que comprende el constructo de la reivindicación 1.

4. Una célula huésped que contenga la construcción de la reivindicación 1 o 2 o el vector de la reivindicación 3, preferentemente que sea una célula huésped bacteriana o que sea una célula vegetal.

5. Una semilla transgénica que comprende el constructo de la reivindicación 1.

6. Un polipéptido recombinante con actividad plaguicida contra lepidópteros, seleccionado del grupo que consiste en:

- a) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 15-19;
- y
- b) un polipéptido que comprenda una secuencia de aminoácidos que tenga al menos 98% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 15-19.

7. El polipéptido de la reivindicación 6 comprende además secuencias de aminoácidos heterólogos.

8. Una composición que comprende el polipéptido de la reivindicación 6.

9. La composición de la reivindicación 8, en la que dicha composición:

- a) se selecciona del grupo que consiste en un polvo, un polvillo, un gránulo, un aerosol, una emulsión, un coloide y una solución;
- b) preparado por desecación, liofilización, homogeneización, extracción, filtración, centrifugación, sedimentación o concentración de un cultivo de células bacterianas; o
- c) comprende desde aproximadamente 1% hasta aproximadamente 99% en peso de dicho polipéptido.

10. Un procedimiento para matar una plaga de lepidópteros o para controlar una población de plagas de lepidópteros, que comprende poner en contacto dicha plaga o población con, o alimentar a dicha plaga o población, con una cantidad plaguicidamente eficaz del polipéptido de la reivindicación 6.

11. Un procedimiento para producir un polipéptido con actividad pesticida contra lepidópteros, que comprende el cultivo de la célula huésped de la reivindicación 4 en condiciones en las que se expresa la molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido.

12. Una planta o célula vegetal que tiene incorporada de forma estable en su genoma un constructo de ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína que tiene actividad plaguicida contra lepidópteros, en la que dicha secuencia de nucleótidos se selecciona del grupo que consiste en:

- a) la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 3;
- b) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 15-19; y
- c) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 98% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 15-19.

13. La planta de la reivindicación 12, en la que dicha planta se selecciona del grupo que consiste en maíz, sorgo, trigo, col, girasol, tomate, crucíferas, pimientos, patata, algodón, arroz, soja, remolacha azucarera, caña de azúcar, tabaco, cebada y colza oleaginosa.

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

10 a) la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO:3;
b) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 15-19; y
c) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos
15 que tiene al menos 98% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 15-19.