

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 609 332**

51 Int. Cl.:

C12N 15/82 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.07.2010 PCT/US2010/040778**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.01.2011 WO11002992**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.07.2010 E 10732575 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.09.2016 EP 2449109**

54 Título: **Gen pesticida AXMI-205 y métodos para su uso**

30 Prioridad:

02.07.2009 US 222778 P

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

19.04.2017

73 Titular/es:

**ATHENIX CORPORATION (100.0%)
108 T W Alexander Drive
Research Triangle Park, NC 27709, US**

72 Inventor/es:

**DESAI, NALINI;
HINSON, JILL;
BALUSUBRAMANIAN, DEEPA;
SAMPSON, KIMBERLY, S.;
TOMSO, DANIEL, J.;
LEHTINEN, DUANE, ALAN y
DUCK, NICHOLAS, B.**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 609 332 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 pesticida AXMI-205 y métodos para su uso

Campo de la invención

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

Antecedentes de la invención

10 La introducción del DDT (dicloro-difenil-tricloroetano) y el paso posterior al uso indiscriminado de insecticidas químicos sintéticos condujo a la contaminación de fuentes de agua y alimentos, el envenenamiento de insectos beneficiosos que no eran el objetivo y el desarrollo de plagas de insectos resistentes a los insecticidas químicos. El aumento de la preocupación pública sobre los efectos medioambientales adversos del uso indiscriminado de insecticidas químicos impulsó una búsqueda de métodos alternativos para el control de plagas de insectos.

15 Una de las alternativas prometedoras ha sido el uso de agentes de control biológico. Existe un historial bien documentado de la aplicación segura de Bt (*B. thuringiensis*, una bacteria Gram-positiva del suelo) como biopesticidas eficaces y se dispone de varios informes de expresión de gen(es) de delta-endotoxinas en plantas de cultivo. Sólo se requieren unas pocas pulverizaciones con insecticida sobre cultivos transgénicos para Bt, lo que no sólo ahorra costes y tiempo, sino que también reduce los riesgos para la salud. En algunos casos, los insectos pueden desarrollar resistencia a diferentes compuestos insecticidas, lo que plantea la necesidad de identificar agentes de control biológico alternativos para el control de plagas.

Sumario de invención

20 Se proporcionan composiciones y métodos para conferir actividad pesticida a bacterias, plantas, células vegetales, tejidos y semillas. Las composiciones incluyen moléculas de ácido nucleico que codifican para 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 anticuerpos contra esos polipéptidos. Las secuencias de nucleótidos pueden usarse en constructos de ADN o casetes de expresión para la transformación y expresión en organismos, incluyendo microorganismos y plantas. Las secuencias de nucleótidos o aminoácidos pueden ser secuencias sintéticas que se han diseñado para la expresión en un organismo incluyendo, pero sin limitarse a, un microorganismo o una planta. Las composiciones también comprenden bacterias, plantas, células vegetales, tejidos y semillas transformados.

30 En particular, se proporcionan moléculas de ácido nucleico aisladas o recombinantes que codifican para una proteína pesticida. Adicionalmente, están abarcadas secuencias de aminoácidos correspondientes a la proteína pesticida.

35 Así, la presente invención prevé una molécula de ácido nucleico recombinante que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en: a) la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1, o un complemento de la misma; b) una secuencia de nucleótidos que codifica para un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8; y c) una secuencia de nucleótidos que codifica para un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 90% con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8, en la que dicha secuencia de aminoácidos tiene actividad pesticida.

40 La invención también proporciona una célula huésped que contiene una molécula de ácido nucleico recombinante de la invención, preferiblemente que es una célula huésped bacteriana o que es una célula vegetal.

45 La invención proporciona además un polipéptido recombinante con actividad pesticida, seleccionado del grupo que consiste en: a) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8; b) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 90% con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8, en la que dicha secuencia de aminoácidos tiene actividad pesticida; y c) un polipéptido que está codificado por la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1, preferiblemente que comprende además secuencias de aminoácidos heterólogas. También se proporciona un anticuerpo que se une selectivamente a un polipéptido de la invención. Adicionalmente, se proporciona una composición que comprende un polipéptido de la invención.

50 La invención proporciona además:

- un método para controlar una población de plaga de lepidópteros o coleópteros que comprende poner en contacto dicha población con una cantidad eficaz como pesticida del polipéptido de la invención;
 - un método para destruir una plaga de lepidópteros o coleópteros, que comprende poner en contacto dicha plaga, o alimentar a dicha plaga, con una cantidad eficaz como pesticida del polipéptido de la invención; y
- 5 • un método para producir un polipéptido con actividad pesticida, que comprende cultivar la célula huésped de la invención en condiciones en las que se expresa la molécula de ácido nucleico que codifica para el polipéptido.

La invención proporciona además una planta que tiene incorporado de manera estable en su genoma un constructo de ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para una proteína que tiene actividad pesticida, en la que dicha secuencia de nucleótidos se selecciona del grupo que consiste en: a) la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1, 9, 10, 11 ó 12; b) una secuencia de nucleótidos que codifica para un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8; y c) una secuencia de nucleótidos que codifica para un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 90% con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8, en la que dicha secuencia de aminoácidos tiene actividad pesticida; en la que dicha secuencia de nucleótidos está operativamente unida a un promotor que dirige la expresión de una secuencia codificante en una célula vegetal.

También se proporciona un método para proteger a una planta frente a una plaga de insectos, que comprende expresar en una planta o célula de la misma una secuencia de nucleótidos que codifica para un polipéptido pesticida, en la que dicha secuencia de nucleótidos se selecciona del grupo que consiste en: a) la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1,9, 10, 11 ó 12; b) una secuencia de nucleótidos que codifica para un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8; y c) una secuencia de nucleótidos que codifica para un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 90% con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8, en la que dicha secuencia de aminoácidos tiene actividad pesticida, preferiblemente en la que dicha planta produce un polipéptido pesticida que tiene actividad pesticida frente a una plaga de lepidópteros o coleópteros.

Por tanto, se proporcionan métodos para producir los polipéptidos de la invención, y para usar esos polipéptidos para controlar o destruir una plaga de lepidópteros, coleópteros, nematodos o dípteros. También se hace referencia a métodos y kits para detectar los ácidos nucleicos y polipéptidos de la invención en una muestra.

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

Breve descripción de las figuras

La figura 1 muestra una alineación de AXMI-205 (SEQ ID NO:2) con proteínas MACPF de *Photorhabdus luminescens* (SEQ ID NO: 14) y *Clavibacter michiganensis* (SEQ ID NO:15).

Descripción detallada

La presente invención se refiere a composiciones y métodos para regular la resistencia o tolerancia a plagas en organismos, particularmente plantas o células vegetales. Por "resistencia" se entiende que la plaga (por ejemplo, insecto) se destruye tras la ingestión u otro contacto con los polipéptidos de la invención. Po "tolerancia" se entiende una afectación o reducción del movimiento, la alimentación, reproducción, u otras funciones de la plaga. Los métodos implican transformar organismos con una secuencia de nucleótidos que codifica para una proteína pesticida de la invención. En particular, las secuencias de nucleótidos de la invención son útiles para preparar plantas y microorganismos que presentan actividad pesticida. Por tanto, se proporcionan bacterias, plantas, células vegetales, tejidos vegetales y semillas transformados. Las composiciones son ácidos nucleicos y proteínas pesticidas de especies bacterianas. Las secuencias encuentran uso en la construcción de vectores de expresión para la transformación posterior 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 métodos conocidos en la técnica, tales como entrecruzamiento de dominios o intercambio de ADN. Las proteínas encuentran uso en el control o la destrucción de poblaciones de plagas de lepidópteros, coleópteros, dípteros y nematodos y para producir composiciones con actividad pesticida.

Por "toxina pesticida" o "proteína pesticida" se entiende una toxina que tiene actividad tóxica frente a una o más plagas, incluyendo, pero sin limitarse a, miembros de los órdenes *Lepidoptera*, *Diptera* y *Coleoptera*, o el filo *Nematoda*, o una proteína que tiene homología con una proteína de este tipo. 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 a partir de las secuencias de nucleótidos de longitud completa dadas a conocer en el presente documento, y secuencias de aminoácidos que son más cortas que las secuencias de longitud completa, o bien debido al uso de un sitio de iniciación en el sentido de 3' alterno, o bien debido a procesamiento que produce una proteína más corta que tiene actividad pesticida. Puede producirse procesamiento en el organismo en el que se expresa la proteína, o en la plaga después de la ingestión de la proteína.

Por tanto, se proporcionan en el presente documento secuencias de nucleótidos aisladas o recombinantes novedosas que confieren actividad pesticida. También se proporcionan las secuencias de aminoácidos de las proteínas pesticidas. La proteína que resulta de la traducción de este gen permite que las células controlen o destruyan plagas que la ingieren.

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

Un aspecto de la invención se refiere a moléculas de ácido nucleico aisladas o recombinantes que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican para proteínas y polipéptidos pesticidas o partes biológicamente activas de los mismos. También se hace referencia a moléculas de ácido nucleico suficientes para su uso como sondas de hibridación para identificar moléculas de ácido nucleico que codifican para proteínas con regiones de homología de secuencia. Así, la presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico recombinante que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en: a) la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1, o un complemento de la misma; b) una secuencia de nucleótidos que codifica para un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8; y c) una secuencia de nucleótidos que codifica para un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 90% con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8, en la que dicha secuencia de aminoácidos tiene actividad pesticida.

Tal como se usa en el presente documento, el término "molécula de ácido nucleico" se entiende que incluye moléculas de ADN (por ejemplo, ADN recombinante, ADNc o ADN genómico) y moléculas de ARN (por ejemplo, ARNm) y análogos del ADN o ARN generado usando nucleótido análogos. La molécula de ácido nucleico puede ser monocatenaria o bicatenaria, pero preferiblemente es ADN bicatenario.

Una secuencia de ácido nucleico (o ADN) "aislada" se usa en el presente documento para referirse a una secuencia de ácido nucleico (o ADN) que ya no está en su entorno natural, por ejemplo en una célula huésped bacteriana o vegetal recombinante o *in vitro*. En algunas realizaciones, un ácido nucleico "aislado" está libre de secuencias (preferiblemente, secuencias que codifican para proteínas) que flanquean de manera natural el ácido nucleico (es decir, secuencias ubicadas en los extremos 5' y 3' del ácido nucleico) en el ADN genómico del organismo del que se deriva el ácido nucleico. Para los fines de la invención, "aislada" cuando se usa para referirse a moléculas de ácido nucleico excluye cromosomas aislados. Por ejemplo, en diversas realizaciones, la molécula de ácido nucleico aislada que codifica para una proteína pesticida 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 de manera natural la molécula de ácido nucleico en ADN genómico de la célula de la que se deriva el ácido nucleico. Una proteína pesticida que está sustancialmente libre de material celular incluye preparaciones de proteína que tienen menos de aproximadamente el 30%, el 20%, el 10% o el 5% (en peso seco) de proteína no pesticida (también denominada en el presente documento "proteína contaminante").

Las secuencias de nucleótidos que codifican para las proteínas de la presente invención incluyen la secuencia expuesta en SEQ ID NO:1, y variantes, fragmentos y complementos de la misma, codificando tales variantes y fragmentos para un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 90% con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8, en la que dicha secuencia de aminoácidos tiene actividad pesticida. Por "complemento" se entiende una secuencia de nucleótidos que es suficientemente complementaria a una secuencia de nucleótidos dada de tal manera que puede hibridar con la secuencia de nucleótidos dada para formar de ese modo un dúplex estable. La secuencia de aminoácidos correspondiente para la proteína pesticida codificada por esta secuencia de nucleótidos se expone en SEQ ID NO:2, 3 ó 4.

Las moléculas de ácido nucleico que son fragmentos de estas secuencias de nucleótidos que codifican para proteínas pesticidas también están abarcadas por la presente invención. Por "fragmento" se entiende una parte de la secuencia de nucleótidos que codifica para una proteína pesticida que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 90% con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8, en la que dicha secuencia de aminoácidos tiene actividad pesticida. También se hace referencia a un fragmento que puede usarse como sonda de hibridación o cebador de PCR usando métodos dados a conocer a continuación. Las moléculas de ácido nucleico que son fragmentos de una secuencia de nucleótidos que codifica para una proteína pesticida comprenden al menos aproximadamente 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1350, 1400, 1450, 1500, 1550, 1600 nucleótidos contiguos, o hasta el número de

nucleótidos presentes en una secuencia de longitud completa de nucleótidos que codifica para una proteína pesticida dada a conocer en el presente documento, dependiendo del uso pretendido. Por nucleótidos "contiguos" se entiende residuos de nucleótido que son inmediatamente adyacentes entre sí. Fragmentos de las secuencias de nucleótidos de la presente invención codificarán para fragmentos de proteína que conservan la actividad biológica de la proteína pesticida y, así, conservan la actividad pesticida. Por "conserva la actividad" se entiende que el fragmento tendrá al menos aproximadamente el 30%, al menos aproximadamente el 50%, al menos aproximadamente el 70%, el 80%, el 90%, el 95% o más de la actividad pesticida de la proteína pesticida. En una realización, la actividad pesticida es actividad coleopterica. En otra realización, la actividad pesticida es actividad lepidopterica. En otra realización, la actividad pesticida es actividad nematocida. En otra realización, la actividad pesticida es actividad dipterica. Se conocen bien en la técnica métodos para medir la actividad pesticida. Véanse, 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 la patente estadounidense n.º 5.743.477.

Un fragmento de una secuencia de nucleótidos que codifica para una proteína pesticida que codifica para una parte biológicamente activa de una proteína de la invención codificará para al menos aproximadamente 15, 25, 30, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550 o 600 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 truncamiento N-terminal o C-terminal de al menos aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25 aminoácidos o más con relación a SEQ ID NO:2, 3 ó 4. En algunas realizaciones, los fragmentos abarcados en el presente documento resultan de la eliminación de los 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25 aminoácidos C-terminales o más, por ejemplo, mediante proteólisis o mediante inserción de un codón de terminación en la secuencia codificante.

Proteínas pesticidas preferidas de la presente invención están codificadas por una secuencia de nucleótidos suficientemente idéntica a la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:1. Por "suficientemente idéntica" se entiende una secuencia de aminoácidos o nucleótidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99% o más en comparación con una secuencia de referencia usando uno de los programas de alineación descritos en el presente documento usando parámetros convencionales. Un experto en la técnica reconocerá que estos valores pueden ajustarse apropiadamente para determinar la identidad correspondiente de proteínas codificadas por dos secuencias de nucleótidos teniendo en cuenta la degeneración de codones, la similitud de aminoácidos, la situación del marco de lectura, y similares.

Para determinar la identidad en porcentaje de dos secuencias de aminoácidos o de dos ácidos nucleicos, las secuencias se alinean con fines de una comparación óptima. La identidad en porcentaje entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, identidad en porcentaje = número de posiciones idénticas/número total de posiciones (por ejemplo, posiciones solapantes) x 100). En una realización, las dos secuencias tienen la misma longitud. En otra realización, la comparación es a través de la totalidad de la secuencia de referencia (por ejemplo, a través de la totalidad de la SEQ ID NO:1, o a través de la totalidad de una de SEQ ID NO:2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8). La identidad en porcentaje entre dos secuencias puede determinarse usando técnicas similares a las descritas a continuación, con o sin permitir huecos. Al calcular la identidad en porcentaje, normalmente se cuentan las coincidencias exactas.

La determinación de la identidad en porcentaje entre dos secuencias puede lograrse usando un algoritmo matemático. Un ejemplo no limitativo de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de 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. Un algoritmo de este tipo se incorpora en los programas BLASTN y BLASTX de Altschul *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403. Pueden realizarse búsquedas de nucleótidos en BLAST con el programa BLASTN, puntuación = 100, longitud de palabra = 12, para obtener secuencias de nucleótidos homólogas a moléculas de ácido nucleico de tipo pesticida de la invención. Pueden realizarse búsquedas de proteínas en BLAST con el programa BLASTX, puntuación = 50, longitud de palabra = 3, para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a moléculas de proteína pesticidas de la invención. Para obtener alineaciones con huecos con fines de comparación, puede utilizarse Gapped BLAST (en BLAST 2.0) tal como se describe en Altschul *et al.* (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389. Alternativamente, puede usarse PSI-Blast para realizar una búsqueda iterada que detecta relaciones distantes entre moléculas. Véase Altschul *et al.* (1997) citado anteriormente. Cuando se utilizan los programas BLAST, Gapped BLAST y PSI-Blast, pueden usarse los parámetros por defecto de los programas respectivos (por ejemplo, BLASTX y BLASTN). También puede realizarse la alineación manualmente mediante inspección.

Otro ejemplo no limitativo de un 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, y por tanto puede proporcionar datos sobre la conservación de secuencia de toda la secuencia de aminoácidos. El algoritmo ClustalW se usa en varios paquetes de software de análisis de ADN/aminoácidos disponibles comercialmente, tales como el módulo ALIGNX del conjunto de programas Vector NTI (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA). Después de la alineación de secuencias de aminoácidos con ClustalW, puede evaluarse la identidad de aminoácidos en porcentaje. Un ejemplo no limitativo de un programa de software útil

para el análisis de alineaciones en ClustalW es GENEDOC™. GENEDOC™ (Karl Nicholas) permite la evaluación de la similitud e identidad de aminoácidos (o ADN) entre múltiples proteínas. Otro ejemplo no limitativo de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de secuencias es el algoritmo de Myers y Miller (1988) CABIOS 4:11-17. Un algoritmo de este tipo se incorpora en el programa ALIGN (versión 2.0), que forma parte del paquete de software de GCG Wisconsin Genetics, versión 10 (disponible de Accelrys, Inc., 9685 Scranton Rd., San Diego, CA, EE.UU.). Cuando se utiliza el programa ALIGN para comparar secuencias de aminoácidos, puede usarse una tabla de residuos con peso PAM120, una penalización por extensión de hueco de 12, y una penalización por hueco de 4.

A menos que se establezca de otro modo, se usará GAP versión 10, que usa el algoritmo de Needleman y Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48(3):443-453, para determinar la identidad o similitud de secuencia usando los siguientes parámetros: % de identidad y % de similitud para una secuencia de nucleótidos usando un peso de hueco de 50 y un peso de extensión de 3, y la matriz de puntuación nwsgapADN.cmp; % de identidad o % de similitud para una secuencia de aminoácidos usando un peso de hueco de 8 y un peso de extensión de 2, y el programa de puntuación BLOSUM62. También pueden usarse programas equivalentes. Por "programa equivalente" se entiende cualquier programa de comparación de secuencias que, para dos secuencias en cuestión cualesquiera, genera una alineación que tiene coincidencias de residuos de residuo idénticos y una identidad de secuencia en porcentaje idéntica en comparación con la alineación correspondiente generada por GAP versión 10.

La invención también abarca moléculas de ácido nucleico variantes. Tales "variantes" codificarán para un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 90% con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8, en la que dicha secuencia de aminoácidos tiene actividad pesticida. Secuencias de nucleótidos que codifican para "variantes" de la proteína pesticida incluyen las secuencias que codifican para las proteínas pesticidas dadas a conocer en el presente documento pero que difieren de manera conservativa debido a la degeneración del código genético así como las que son suficientemente idénticas tal como se comentó anteriormente. Pueden identificarse variantes alélicas que se producen de manera natural con el uso de técnicas de la biología molecular bien conocidas, tales como técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de hibridación tal como se expone a continuación. Las secuencias de nucleótidos variantes también incluyen secuencias de nucleótidos derivadas de manera sintética que se han generado, por ejemplo, usando mutagénesis dirigida al sitio pero que codifican todavía para las proteínas pesticidas dada a conocer en la presente invención tal como se comenta a continuación. Las proteínas variantes abarcadas por la presente invención son biológicamente activas, es decir siguen presentando la actividad biológica deseada de la proteína nativa, es decir, conservan la actividad pesticida. Por "conserva la actividad" se entiende que la variante tendrá al menos aproximadamente el 30%, al menos aproximadamente el 50%, al menos aproximadamente el 70% o al menos aproximadamente el 80% de la actividad pesticida de la proteína nativa. Se conocen bien en la técnica métodos para medir la actividad pesticida. Véanse, 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 la patente estadounidense n.º 5.743.477.

El experto en la técnica apreciará además que pueden introducirse cambios mediante mutación de las secuencias de nucleótidos de la invención conduciendo de ese modo a cambios en la secuencia de aminoácidos de las proteínas pesticidas codificadas, sin alterar la actividad biológica de las proteínas. Por tanto, pueden crearse moléculas de ácido nucleico aisladas variantes introduciendo una o más sustituciones, adiciones o deleciones de nucleótidos en la secuencia de nucleótidos correspondiente dada a conocer en el presente documento, de tal manera que se introducen una o más sustituciones, adiciones o deleciones de aminoácidos en la proteína codificada. Pueden introducirse mutaciones mediante técnicas convencionales, tales como mutagénesis dirigida al sitio y mutagénesis mediada por PCR. Tales secuencias de nucleótidos variantes también están abarcadas por la presente invención.

Por ejemplo, pueden realizarse sustituciones de aminoácido conservativas en uno o más residuos de aminoácido no esenciales, predichos. Un residuo de aminoácido "no esencial" es un residuo que puede alterarse con respecto a la secuencia de tipo natural de una proteína pesticida sin alterar la actividad biológica, mientras que se requiere un residuo de aminoácido "esencial" para la actividad biológica. Una "sustitución de aminoácido conservativa" es una en la que el residuo de aminoácido se reemplaza por un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Se han definido en la técnica familias de residuos de aminoácido que tienen 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 apolares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales polares con ramificación beta (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina).

Pueden realizarse sustituciones de aminoácido en regiones no conservadas que conservan la función. En general, tales sustituciones no se realizarían para residuos de aminoácido conservados, o para residuos de aminoácido que residen dentro de un motivo conservado, en el que tales residuos son esenciales para la actividad de la proteína. Los ejemplos de residuos que están conservados y que pueden ser esenciales para la actividad de la proteína

- incluyen, por ejemplo, residuos que son idénticos entre todas las proteínas contenidas en una alineación de toxinas similares o relacionadas con las secuencias de la invención (por ejemplo, residuos que son idénticos en una alineación de proteínas homólogas). Los ejemplos de residuos que están conservados pero que pueden permitir sustituciones de aminoácido conservativas y conservar todavía la actividad incluyen, por ejemplo, residuos que sólo
- 5 tienen sustituciones conservativas entre todas las proteínas contenidas en una alineación de toxinas similares o relacionadas con las secuencias de la invención (por ejemplo, residuos que sólo tienen sustituciones conservativas entre todas las proteínas contenidas en la alineación proteínas homólogas). Sin embargo, un experto en la técnica entendería que las variantes funcionales pueden tener alteraciones conservadas o no conservadas menores en los residuos conservados.
- 10 Alternativamente, pueden producirse secuencias de nucleótidos variantes introduciendo mutaciones aleatoriamente a lo largo de la totalidad o parte de la secuencia codificante, tal como mediante mutagénesis por saturación, y pueden examinarse los mutantes resultantes para determinar su capacidad para conferir actividad pesticida para identificar mutantes que conservan la actividad. Tras la mutagénesis, la proteína codificada puede expresarse de manera recombinante, y la actividad de la proteína puede determinarse usando técnicas de ensayo convencionales.
- 15 Usando métodos tales como PCR, hibridación, y similares pueden identificarse secuencias pesticidas correspondientes, teniendo tales secuencias una identidad sustancial con las secuencias de la invención. Véanse, por ejemplo, Sambrook y Russell (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY) y Innis, *et al.* (1990) *PCR Protocol: A Guide to Methods and Applications* (Academic Press, NY).
- 20 En un método de hibridación, la totalidad o parte de la secuencia de nucleótidos pesticida puede usarse para examinar bibliotecas de ADNc o genómicas. Se conocen generalmente en la técnica métodos para la construcción de tales bibliotecas de ADNc y genómicas y se dan a conocer en Sambrook y Russell, 2001, citado anteriormente. Las denominadas sondas de hibridación pueden ser fragmentos de ADN genómico, fragmentos de ADNc, fragmentos de ARN, u otros oligonucleótidos, y pueden marcarse con un grupo detectable tal como ³²P, o cualquier
- 25 otro marcador detectable, tal como otros radioisótopos, un compuesto fluorescente, una enzima o un cofactor enzimático. Pueden prepararse sondas para hibridación mediante el marcaje de oligonucleótidos sintéticos basados en la secuencia de nucleótidos que codifica para proteína pesticida conocida dada a conocer en el presente documento. Pueden usarse adicionalmente cebadores degenerados diseñados basándose en residuos de nucleótidos o de aminoácido conservados en la secuencia de nucleótidos o secuencia de aminoácidos codificada. La sonda comprende normalmente una región de secuencia de nucleótidos que hibrida en condiciones rigurosas con al
- 30 menos aproximadamente 12, al menos aproximadamente 25, al menos aproximadamente 50, 75, 100, 125, 150, 175 ó 200 nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos que codifica para una proteína pesticida de la invención o un fragmento o variante de la misma. Se conocen generalmente en la técnica métodos para la preparación de sondas para hibridación y se dan a conocer en Sambrook y Russell, 2001, citado anteriormente en el presente documento incorporado como referencia.
- 35

Por ejemplo, puede usarse toda una secuencia de proteína pesticida dada a conocer en el presente documento, o una o más partes de la misma, como sonda que puede hibridar específicamente con secuencias de tipo proteína pesticida y ARN mensajeros correspondientes. Para lograr una hibridación específica en una variedad de condiciones, tales sondas incluyen secuencias que son únicas y tienen preferiblemente al menos aproximadamente

40 10 nucleótidos de longitud, o al menos aproximadamente 20 nucleótidos de longitud. Tales sondas pueden usarse para amplificar secuencias pesticidas correspondientes de un organismo elegido mediante PCR. Esta técnica puede usarse 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 examen por hibridación de bibliotecas de ADN en placas (o bien placas de lisis o bien colonias; véase, por ejemplo,

45 Sambrook *et al.* (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York).

La hibridación de tales secuencias puede llevarse a cabo en condiciones rigurosas. Por "condiciones rigurosas" o "condiciones de hibridación rigurosas" se entienden condiciones en las que se hibridará una sonda con su secuencia diana en un grado mayor de manera detectable que a otras secuencias (por ejemplo, al menos 2 veces con respecto

50 al fondo). Las condiciones rigurosas dependen de la secuencia y serán diferentes en diferentes circunstancias. Controlando la rigurosidad de las condiciones de hibridación y/o lavado, pueden identificarse secuencias diana que son complementarias al 100% a la sonda (detección con sonda homóloga). Alternativamente, pueden ajustarse condiciones de rigurosidad para permitir cierto apareamiento erróneo en las secuencias de modo que se detecten menores grados de similitud (detección con sonda heteróloga). Generalmente, un sonda tiene menos de

55 aproximadamente 1000 nucleótidos de longitud, preferiblemente menos de 500 nucleótidos de longitud.

Normalmente, condiciones rigurosas serán aquellas en las que la concentración de sal de iones de Na es menos de aproximadamente 1,5 M, normalmente concentración de iones de Na (u otras sales) de aproximadamente 0,01 a 1,0 M de 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 al menos aproximadamente 60°C para sondas largas (por ejemplo, más de 50 nucleótidos).

También pueden lograrse condiciones rigurosas con la adición de agentes de desestabilización tales como formamida. Las condiciones de baja rigurosidad a modo de ejemplo incluyen hibridación con una disolución tampón de formamida a del 30 al 35%, NaCl 1 M, SDS (dodecilsulfato de sodio) al 1% a 37°C, y un lavado en SSC de 1X a 2X (SSC 20X = NaCl 3,0 M/citrato de trisodio 3,0 M) a de 50 a 55°C. Las condiciones de rigurosidad moderada a modo de ejemplo incluyen hibridación en formamida a del 40 al 45%, NaCl 1,0 M, SDS al 1% a 37°C, y un lavado en SSC de 0,5X a 1X a de 55 a 60°C. Las condiciones de alta rigurosidad a modo de ejemplo incluyen hibridación en formamida al 50%, NaCl 1 M, SDS al 1% a 37°C, y un lavado en SSC 0,1X a de 60 a 65°C. Opcionalmente, los tampones de lavado pueden comprender SDS de aproximadamente al 0,1% a aproximadamente al 1%. La duración de hibridación es generalmente de menos de aproximadamente 24 horas, habitualmente de aproximadamente 4 a aproximadamente 12 horas.

La especificidad es normalmente la función de lavados tras la hibridación, siendo los factores críticos la fuerza iónica y la temperatura de la disolución de lavado final. Para híbridos de ADN-ADN, la T_f puede aproximarse a partir de la ecuación de Meinkoth y Wahl (1984) Anal. Biochem. 138:267-284: $T_f = 81,5^\circ\text{C} + 16,6 (\log M) + 0,41 (\% \text{ de GC}) - 0,61 (\% \text{ de forma}) - 500/L$; donde M es la molaridad de cationes monovalentes, % de GC es el porcentaje de nucleótidos de guanosina y citosina en el ADN, % de forma es el porcentaje de formamida en la disolución de hibridación, y L es la longitud del híbrido en pares de bases. La T_f es la temperatura (a fuerza iónica y pH definidos) a la que el 50% de una secuencia diana complementaria hibrida con una sonda perfectamente apareada. T_f se reduce en aproximadamente 1°C por cada 1% de apareamiento erróneo; por tanto, pueden ajustarse las condiciones de T_f , hibridación y/o lavado para hibridar con secuencias de la identidad deseada. Por ejemplo, si se buscan secuencias con una identidad $\geq 90\%$, la T_f puede disminuirse 10°C. Generalmente, se seleccionan condiciones rigurosas para que sean aproximadamente 5°C menos que el punto de fusión térmica (T_f) para la secuencia específica y su complemento a una fuerza iónica y un pH definidos. Sin embargo, condiciones intensamente rigurosas pueden utilizar una hibridación y/o un lavado a 1, 2, 3 ó 4°C menos que el punto de fusión térmica (T_f); condiciones moderadamente rigurosas pueden utilizar una hibridación y/o un lavado a 6, 7, 8, 9 ó 10°C menos que el punto de fusión térmica (T_f); condiciones de baja rigurosidad pueden utilizar una hibridación y/o un lavado a 11, 12, 13, 14, 15 ó 20°C menos que el punto de fusión térmica (T_f). Usando la ecuación, composiciones de hibridación y lavado y la T_f deseada, los expertos habituales entenderán que se describen intrínsecamente variaciones en la rigurosidad de disoluciones de hibridación y/o lavado. Si el grado de apareamiento erróneo deseado da como resultado una T_f de menos de 45°C (disolución acuosa) o 32°C (disolución en formamida), se prefiere aumentar la concentración de SSC de modo que pueda usarse una mayor temperatura. Se encuentra una extensa guía para la hibridación de ácidos nucleicos en Tijssen (1993) Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology—Hybridization with Nucleic Acid Probes, parte I, capítulo 2 (Elsevier, Nueva York); y Ausubel *et al.*, eds. (1995) Current Protocols in Molecular Biology, capítulo 2 (Greene Publishing and Wiley-Interscience, Nueva York). Véase Sambrook *et al.* (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York).

Proteínas aisladas y variantes y fragmentos de las mismas

Las proteínas pesticidas también están abarcadas dentro de la presente invención. Por “proteína pesticida” se entiende una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:2, 3 ó 4. También se proporcionan fragmentos, partes biológicamente activas y variantes de la misma (por ejemplo, SEQ ID NO:5, 6, 7 y 8), y pueden usarse para poner en práctica los métodos de la presente invención. Tales fragmentos, partes biológicamente activas y variantes de la misma comprenderán una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 90% con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8, en la que dicha secuencia de aminoácidos tiene actividad pesticida. Una “proteína aislada” se usa para referirse a una proteína que ya no está en su entorno natural, por ejemplo *in vitro* o en una célula huésped bacteriana o vegetal recombinante.

“Fragmentos” o “partes biológicamente activas” incluyen fragmentos de polipéptido que comprenden secuencias de aminoácidos suficientemente idénticas a la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:2, 3 ó 4, y que muestran actividad pesticida. Una parte biológicamente activa de una proteína pesticida puede ser un polipéptido que tiene, por ejemplo, 10, 25, 50, 100, 150, 200, 250 aminoácidos o más de longitud. Tales partes biológicamente activas pueden prepararse mediante técnicas recombinantes y evaluarse para determinar su actividad pesticida. Se conocen bien en la técnica métodos para medir la actividad pesticida. Véanse, 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 la patente estadounidense n.º 5.743.477. Tal como se usa en el presente documento, un fragmento comprende al menos 8 aminoácidos contiguos de SEQ ID NO:2, 3 ó 4. La invención abarca otros fragmentos, sin embargo, tal como cualquier fragmento en la proteína más de aproximadamente 10, 20, 30, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550 aminoácidos o más.

En algunas realizaciones, el fragmento es un truncamiento N-terminal o C-terminal de al menos aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25 aminoácidos o más con relación a SEQ ID NO:2, 3 ó 4 (por ejemplo, SEQ ID NO:7 u 8). En algunas realizaciones, los fragmentos abarcados en el presente documento resultan de la eliminación de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25 aminoácidos C-

- terminales o más, por ejemplo, mediante proteólisis o mediante inserción de un codón de terminación en la secuencia codificante. Por "variantes" se entiende proteínas o polipéptidos que tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos el 90%, el 91%, 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98% o el 99% a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8. Variantes también incluyen polipéptidos codificadas por una molécula de ácido nucleico que hibrida con la molécula de ácido nucleico de SEQ ID NO:1 o un complemento de la misma, en condiciones rigurosas siempre que tengan una identidad de secuencia de al menos el 90% con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8, en la que dicha secuencia de aminoácidos tiene actividad pesticida. Las variantes incluyen polipéptidos que difieren en la secuencia de aminoácidos debido a mutagénesis. Las proteínas variantes abarcadas por la presente invención son biológicamente activas, es decir, siguen presentando la actividad biológica deseada de la proteína nativa, es decir, conservan la actividad pesticida. En algunas realizaciones, las variantes tienen actividad mejorada. Se conocen bien en la técnica métodos para medir la actividad pesticida. Véanse, 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 la patente estadounidense n.º 5.743.477.
- 15 En algunas realizaciones, la proteína o el polipéptido variante comprende una o más sustituciones en las posiciones de aminoácido seleccionadas del grupo que consiste en las posiciones 307, 315, 317, 349, 351, 353, 355, 395, 399, 407, 419, 435, 443, 465, 467, 483, 487, 495, 497, 499, 509 y 513 con relación a SEQ ID NO:2. En realizaciones específicas, la sustitución es una alanina para el aminoácido nativo en la(s) posición/posiciones citada(s). También están abarcadas la(s) secuencia(s) de nucleótidos que codifica(n) para la proteína o el polipéptido variante.
- 20 Genes bacterianos, tales como los genes *axmi* de esta invención, bastante a menudo presentan múltiples codones de iniciación de metionina en las proximidades del inicio del marco de lectura abierto. A menudo, la iniciación de la traducción en uno o más de estos codones de iniciación conducirá a la generación de una proteína funcional. Estos codones de iniciación pueden incluir codones ATG. Por ejemplo, SEQ ID NO:3 y 4 representan proteínas de sitio de iniciación alterno codificadas por SEQ ID NO:1. Sin embargo, bacterias tales como *Bacillus sp.* también reconocen el codón GTG como codón de iniciación, y 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 para una metionina. Además, a menudo no se determina *a priori* cuál de estos codones se usa de manera natural en la bacteria. Por tanto, se entiende que el uso de uno de los codones de metionina alternos también puede conducir a la generación de proteínas pesticidas. Estas proteínas pesticidas están abarcadas en la presente invención y pueden usarse en los métodos de la presente invención. Se entenderá que, cuando se expresan en plantas, será necesario alterar el codón de iniciación alterno a ATG para una traducción apropiada.
- 35 También están abarcados anticuerpos contra los polipéptidos de la presente invención, o contra variantes o fragmentos de los mismos. Se conocen bien en la técnica métodos para producir anticuerpos (véanse, por ejemplo, Harlow y Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY; la patente estadounidense n.º 4.196.265).

Variantes alteradas o mejoradas

- Se reconoce que pueden alterarse secuencias de ADN de una proteína pesticida mediante diversos métodos, y que estas alteraciones pueden dar como resultado secuencias de ADN que codifican para proteínas con secuencias de aminoácidos diferentes de las codificadas por una proteína pesticida de la presente invención. Tales variantes comprenderán una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 90% con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8, en la que dicha secuencia de aminoácidos tiene actividad pesticida. Esta proteína puede alterarse de diversos modos incluyendo sustituciones, deleciones, truncamientos e inserciones de aminoácidos de uno o más aminoácidos de SEQ ID NO:2, 3 ó 4, 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 sustituciones, deleciones o inserciones de aminoácidos. Se conocen generalmente en la técnica métodos para tales manipulaciones. Por ejemplo, pueden prepararse variantes de 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 evolución dirigida. En algunos aspectos, los cambios codificados en la secuencia de aminoácidos no afectarán sustancialmente a la función de la proteína. Tales variantes presentarán la actividad pesticida deseada. Sin embargo, se entiende que la capacidad de una proteína pesticida para conferir actividad pesticida puede mejorarse mediante el uso de tales técnicas con las composiciones de esta invención. Por ejemplo, puede expresarse una proteína pesticida en células huésped que muestran altas tasas de incorporación incorrecta de bases durante la replicación de ADN, tales como XL-1 Red (Stratagene, La Jolla, CA). Después de la propagación en tales cepas, puede aislarse el ADN (por ejemplo mediante la preparación de ADN de plásmido, o mediante amplificación por PCR y clonación del fragmento de PCR resultante en un vector), cultivo de las mutaciones de proteína pesticida en una cepa no mutagénica, e identificación de genes mutados con actividad pesticida, por ejemplo mediante la realización de un ensayo para someter a prueba la

actividad pesticida. Generalmente, la proteína se mezcla y se usa en ensayos de alimentación. Véase, por ejemplo Marrone *et al.* (1985) *J. of Economic Entomology* 78:290-293. Tales ensayos pueden incluir poner en contacto plantas con una o más plagas y determinar la capacidad de la planta para sobrevivir y/o producir la muerte de las plagas. Se encuentran ejemplos de mutaciones que dan como resultado un aumento de la toxicidad en Schnepf *et al.* (1998) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:775-806.

Alternativamente, pueden realizarse alteraciones en la secuencia de proteína de muchas proteínas en el extremo amino o carboxi-terminal sin afectar sustancialmente a la actividad. Estas pueden incluir inserciones, deleciones o alteraciones introducidas mediante métodos moleculares modernos, tales como PCR, incluyendo ampliaciones por PCR que alteran o amplían la secuencia codificante de proteína en virtud de la inclusión de secuencias que codifican para aminoácidos en los oligonucleótidos utilizados en la amplificación por PCR. Alternativamente, las secuencias de proteína añadidas pueden incluir secuencias codificantes de proteína enteras, tales como las usadas comúnmente en la técnica para generar fusiones de proteína. Tales proteínas de fusión se usan a menudo para (1) aumentar la expresión de una proteína de interés (2) introducir un dominio de unión, actividad enzimática o epítipo para facilitar o bien la purificación de proteínas, detección de proteínas, u otros usos experimentales conocidos en la técnica (3) la secreción o traducción diana de una proteína en un orgánulo subcelular, tal como el espacio periplasmático de bacterias Gram-negativas, o el retículo endoplasmático de células eucariotas, dando esto último a menudo como resultado glicosilación de la proteína.

Las secuencias de aminoácidos y nucleótidos variantes de la presente invención también abarcan secuencias derivadas procedimientos mutagénicos y recombinogénicos tales como intercambio de ADN. Con un procedimiento de este tipo, pueden usarse una o más regiones codificantes de proteína pesticida diferentes para crear una nueva proteína pesticida que presenta las propiedades deseadas. De esta manera, bibliotecas de polinucleótidos recombinantes se generan a partir de una población de polinucleótidos de secuencia relacionada que comprenden regiones de secuencia que tienen una identidad de secuencia sustancial y pueden recombinarse de manera homóloga *in vitro* o *in vivo*. Por ejemplo, usando este enfoque, pueden intercambiarse motivos de secuencia que codifican para un dominio de interés entre un gen pesticida de la invención y otros genes pesticidas conocidos para obtener un nuevo gen que codifica para una proteína con una propiedad de interés mejorada, tal como un aumento de la actividad insecticida. Se conocen en la técnica estrategias para tal intercambio de ADN. Véanse, 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.* (1997) *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 las patentes estadounidenses n.ºs 5.605.793 y 5.837.458.

El entrecruzamiento o intercambio de dominios es otro mecanismo para generar proteínas pesticidas alteradas. Pueden entrecruzarse dominios entre proteínas pesticidas, dando como resultado toxinas híbridas o quiméricas con actividad pesticida o espectro diana mejorados. Se conocen bien en la técnica métodos para generar proteínas recombinantes y someterlas a prueba para determinar su actividad pesticida (véanse, por ejemplo, Naimov *et al.* (2001) *Appl. Environ. Microbiol.* 67:5328-5330; de Maagd *et al.* (1996) *Appl. Environ. Microbiol.* 62:1537-1543; Ge *et al.* (1991) *J. Biol. Chem.* 266:17954-17958; Schnepf *et al.* (1990) *J. Biol. Chem.* 265:20923-20930; Rang *et al.* (1999) *Appl. Environ. Microbiol.* 65:2918-2925).

Vectores

Una secuencia pesticida de la invención puede proporcionarse en un casete de expresión para la expresión en una planta de interés. Por "casete de expresión de planta" se entiende un constructo de ADN que puede dar como resultado la expresión de una proteína desde un marco de lectura abierto en una célula vegetal. Normalmente estos contienen un promotor y una secuencia codificante. A menudo, tales constructos también contendrán una región no traducida en 3'. Tales constructos pueden contener una "secuencia señal" o "secuencia líder" para facilitar el transporte cotraduccional o postraduccional del péptido a determinadas estructuras intracelulares tales como el cloroplasto (u otro plastidio), retículo endoplasmático o aparato de Golgi.

Por "secuencia señal" se entiende una secuencia que se sabe o se sospecha que da como resultado el transporte de péptido cotraduccional o postraduccional a través de la membrana celular. En eucariotas, esto implica normalmente la secreción en el aparato de Golgi, con cierta glicosilación resultante. A menudo se sintetizan toxinas insecticidas de bacterias como protoxinas, que se activan protolíticamente en el intestino de la plaga diana (Chang (1987) *Methods Enzymol.* 153:507-516). En algunas realizaciones de la presente invención, la secuencia señal está ubicada 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 como resultado una secuencia de aminoácidos suficiente para desencadenar el transporte cotraduccional de la cadena peptídica a un orgánulo subcelular. Por tanto, esto incluye secuencias líder que seleccionan como diana el transporte y/o la glicosilación mediante el paso al retículo endoplasmático, el paso a vacuolas, plastidios incluyendo cloroplastos, mitocondrias, y similares.

Por "vector de transformación de planta" se entiende una molécula de ADN que es necesaria para la transformación eficaz de una célula vegetal. Una molécula de este tipo puede consistir en uno o más casetes de expresión de

planta, y puede organizarse en más de una molécula de ADN de "vector". Por ejemplo, los vectores binarios son vectores de transformación de planta que utilizan dos vectores de ADN no contiguos para codificar para todas las funciones de acción en *cis* y *trans* requeridas 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 para incorporar, integrar y expresar secuencias de ADN heterólogas o fragmentos en una célula foránea. El casete incluirá secuencias reguladoras en 5' y 3' operativamente unidas a una secuencia de la invención. Por "operativamente unida" se entiende un ligamiento funcional entre un promotor y una segunda secuencia, en el que la secuencia promotora inicia y media en la transcripción de la secuencia de ADN correspondiente a la segunda secuencia. En general, operativamente unidas significa que las secuencias de ácido nucleico que se ligan son continuas y, cuando sea necesario unir dos regiones codificantes de proteína, contiguas y en el mismo marco de lectura. El casete puede contener adicionalmente al menos un gen adicional para cotransformarse en el organismo. Alternativamente, el/los gen(es) adicional(es) puede(n) proporcionarse en múltiples casetes de expresión.

"Promotor" se refiere a una secuencia de ácido nucleico que funciona para dirigir la transcripción de una secuencia codificante en el sentido de 3'. El promotor junto con otras secuencias de ácido nucleico reguladoras de la transcripción y la traducción (también denominadas "secuencias de control") son necesarios para la expresión de una secuencia de ADN de interés.

Un casete de expresión de este tipo se proporciona con una pluralidad de sitios de restricción para la inserción de la secuencia pesticida para estar bajo la regulación transcripcional de las regiones reguladoras.

El casete de expresión incluirá en el sentido de transcripción 5'-3', una región de iniciación de la transcripción y la traducción (es decir, un promotor), una secuencia de ADN de la invención, y una región de terminación de la transcripción y la traducción (es decir, región de terminación) funcionales en plantas. El promotor puede ser nativo o análogo, o foráneo o heterólogo, con respecto al huésped vegetal y/o con respecto a la secuencia de ADN de la invención. Adicionalmente, el promotor puede ser la secuencia natural o alternativamente una secuencia sintética. Cuando el promotor es "nativo" u "homólogo" con respecto al huésped vegetal, se entiende que el promotor se encuentra en la planta nativa en la que se introduce el promotor. Cuando el promotor es "foráneo" o "heterólogo" con respecto a la secuencia de ADN de la invención, se entiende que el promotor no es el promotor nativo o que se produce de manera natural para la secuencia de ADN operativamente unida de la invención.

La región de terminación puede ser nativa con la región de iniciación de la transcripción, puede ser nativa con la secuencia de ADN operativamente unida de interés, puede ser nativa con el huésped vegetal, o puede derivarse de otra fuente (es decir, foránea o heteróloga con respecto al promotor, la secuencia de ADN de interés, el huésped vegetal, o cualquier combinación de los mismos). Están disponibles regiones de terminación convenientes del plásmido Ti de *A. tumefaciens*, tales como las regiones de terminación de octopina sintasa y nopalina sintasa. Véanse también Guerineau *et al.* (1991) Mol. Gen. Genet. 262:141-144; Proudfoot (1991) Cell 64:671-674; Sanfacon *et al.* (1991) Genes Dev. 5:141-149; Mogen *et al.* (1990) Plant Cell 2:1261-1272; Munroe *et al.* (1990) Gene 91:151-158; Ballas *et al.* (1989) Nucleic Acids Res. 17:7891-7903; y Joshi *et al.* (1987) Nucleic Acids Res. 15:9627-9639.

Cuando sea apropiado, el/los gen(es) puede(n) optimizarse para un aumento de la expresión en la célula huésped transformada. Es decir, los genes pueden sintetizarse usando codones preferidos por la célula huésped para una expresión mejorada, o pueden sintetizarse usando codones a una frecuencia de uso de codones preferida por el huésped. Generalmente, aumentará el contenido de GC del gen. Véase, por ejemplo, Campbell y Gowri (1990) Plant Physiol. 92:1-11 para un análisis de uso de codones preferido por el huésped. Están disponibles métodos en la técnica para sintetizar genes preferidos por plantas. Véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.ºs 5.380.831 y 5.436.391, y Murray *et al.* (1989) Nucleic Acids Res. 17:477-498.

En una realización, la proteína pesticida se dirige al cloroplasto para la expresión. De esta manera, cuando la proteína pesticida no se inserta directamente en el cloroplasto, el casete de expresión contendrá adicionalmente un ácido nucleico que codifica para un péptido de tránsito para dirigir la proteína pesticida a los cloroplastos. Tales péptidos de tránsito se conocen en la técnica. Véanse, 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 que va a dirigirse al cloroplasto puede optimizarse para la expresión en el cloroplasto para tener en cuenta diferencias en el uso de codones entre el núcleo de la planta y este orgánulo. De esta manera, los ácidos nucleicos de interés pueden sintetizarse usando codones preferidos por el cloroplasto. Véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 5,380,831.

Transformación de planta

Los métodos de la invención implican introducir un constructo de nucleótidos en una planta. Por "introducir" se

entiende presentar a la planta el constructo de nucleótidos de tal manera que el constructo obtiene acceso al interior de una célula de la planta. Los métodos de la invención no requieren que se use un método particular para introducir un constructo de nucleótidos en una planta, sólo que el constructo de nucleótidos obtenga acceso al interior de al menos una célula de la planta. Se conocen en la técnica métodos para introducir constructos de nucleótidos en plantas incluyendo, pero sin limitarse a, métodos de transformación estable, métodos de transformación transitoria y métodos mediados por virus.

Por "planta" se entiende plantas completas, órganos de planta (por ejemplo, hojas, tallos, raíces, etc.), semillas, células vegetales, propágulos, embriones y progenie de los mismos. Las células vegetales pueden ser diferenciadas o no diferenciadas (por ejemplo callo, células en cultivo en suspensión, protoplastos, células de las hojas, células de las raíces, células del floema, polen).

"Plantas transgénicas" o "plantas transformadas" o plantas o células o tejidos "transformados de manera estable" se refiere a plantas que tienen secuencias de ácido nucleico exógenas incorporadas o integradas 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 están presentes en la célula vegetal no transformada. "Heterólogo" generalmente se refiere a las secuencias de ácido nucleico que no son endógenas con respecto a la célula o parte del genoma nativo en el que están presentes, y se han añadido a la célula mediante infección, transfección, microinyección, electroporación, microproyección, o similar.

Las plantas transgénicas de la invención expresan una o más de las secuencias pesticidas dadas a conocer en el presente documento. En diversas realizaciones, la planta transgénica comprende además uno o más genes adicionales para resistencia a insectos, por ejemplo, uno o más genes adicionales para controlar plagas de coleópteros, lepidópteros, heterópteros o nematodos. Un experto en la técnica entenderá que la planta transgénica puede comprender cualquier gen que confiera un rasgo agronómico de interés.

La transformación de células vegetales puede lograrse mediante una de varias técnicas conocidas en la técnica. El gen pesticida de la invención puede modificarse para obtener o potenciar la expresión en células vegetales. Normalmente, un constructo que expresa una proteína de este tipo contendría un promotor para dirigir la transcripción del gen, así como una región no traducida en 3' para permitir la terminación de la transcripción y poliadenilación. La organización de tales constructos se conoce bien en la técnica. En algunos casos, puede ser útil modificar por ingeniería el gen de tal manera que el péptido resultante se secrete, o se seleccione como diana de otro modo dentro de la célula vegetal. Por ejemplo, el gen puede modificarse por ingeniería para contener un péptido señal para facilitar la transferencia del péptido al retículo endoplasmático. También puede preferirse modificar por ingeniería el casete de expresión de planta para que contenga un intrón, de tal manera que se requiere el procesamiento de ARNm del intrón para la expresión.

Normalmente, esta "casete de expresión de planta" se insertará en un "vector de transformación de planta". Este vector de transformación de planta puede componerse de uno o más vectores de ADN necesarios para lograr la transformación de planta. Por ejemplo, es una práctica común en la técnica utilizar vectores de transformación de planta que se componen de más un segmento de ADN contiguo. Estos vectores se denominan a menudo en la técnica como "vectores binarios". Los vectores binarios así como vectores con plásmidos auxiliares se usan con la mayor frecuencia para la transformación medida por *Agrobacterium*, en la que 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 contienen normalmente un vector de plásmido que contiene las secuencias de acción en *cis* requeridas para la transferencia de ADN-T (tales como borde izquierdo y borde derecho), un marcador seleccionable que se modifica por ingeniería para que produzca expresión en una célula vegetal, y un "gen de interés" (un gen modificado por ingeniería para que produzca expresión en una célula vegetal para la que se desea la generación de plantas transgénicas). También están presentes en este vector de plásmido secuencias requeridas para la replicación bacteriana. Las secuencias de acción en *cis* están dispuestas de modo que se permite la transferencia eficaz a células vegetales y la expresión en las mismas. Por ejemplo, el gen marcador seleccionable y el gen pesticida están ubicados en los bordes izquierdo y derecho. A menudo un segundo vector de plásmido contiene los factores de acción en *trans* que median en la transferencia de ADN-T de *Agrobacterium* a 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 mediante escisión en secuencias de borde y transferencia de ADN mediada por *vir*, tal como se entiende en la técnica (Hellens y Mullineaux (2000) Trends in Plant Science 5:446-451). Pueden usarse varios tipos de cepas de *Agrobacterium* (por ejemplo LBA4404, GV3101, EHA101, EHA105, etc.) para la transformación de planta. El segundo vector de plásmido no es necesario para transformar las plantas mediante otros métodos tales como microproyección, microinyección, electroporación, polietilenglicol, etc.

En general, métodos de transformación de planta implican transferir ADN heterólogo a células vegetales diana (por ejemplo embriones inmaduros o maduros, cultivos en suspensión, callo no diferenciado, protoplastos, etc.), seguido por aplicar un nivel umbral máximo de selección apropiada (dependiendo del gen marcador seleccionable) para recuperar las células vegetales transformadas de un grupo de masa celular no transformada. Normalmente, se

transfieren los explantes a un suministro nuevo del mismo medio y se cultivan de manera rutinaria. Posteriormente, las células transformadas se diferencian para dar brotes después de ponerlos en medio de regeneración complementado con un nivel umbral máximo de agente de selección. Los brotes se transfieren entonces a un medio de enraizamiento selectivo para recuperar brote enraizado o plántula. La plántula transgénica se hace crecer entonces en una planta madura y produce semillas fértiles (por ejemplo Hiei *et al.* (1994) *Plant Journal* 6:271-282; Ishida *et al.* (1996) *Nature Biotechnology* 14:745-750). Normalmente, se transfieren los explantes a un suministro nuevo del mismo medio y se cultivan de manera rutinaria. Se encuentra una descripción general de las técnicas y los métodos para generar plantas transgénicas en Ayres y Park (1994) *Critical Reviews in Plant Science* 13:219-239 y Bommineni y Jauhar (1997) *Maydica* 42:107-120. Puesto que el material transformado contiene muchas células; están presentes células tanto transformadas como no transformadas en cualquier trozo de callo o tejido o grupo de células diana sometido. La capacidad para destruir células no transformadas y permitir que proliferen las células transformadas da como resultado cultivos de planta transformada. A menudo, la capacidad para retirar células no transformadas es una limitación para la recuperación rápida de 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 dependiendo del tipo de planta o célula vegetal, es decir, monocotiledónea o dicotiledónea, seleccionado como diana para la transformación. La generación de plantas transgénicas puede realizarse mediante uno de varios métodos, incluyendo, pero sin limitarse a, microinyección, electroporación, transferencia génica directa, introducción de ADN heterólogo por *Agrobacterium* en células vegetales (transformación mediada por *Agrobacterium*), bombardeo de células vegetales con ADN foráneo heterólogo adherido a partículas, aceleración balística de partículas, transformación con haz de aerosol (solicitud estadounidense publicada n.º 20010026941; patente estadounidense n.º 4,945,050; publicación internacional n.º WO 91/00915; solicitud estadounidense publicada n.º 2002015066), transformación con Lec1, y diversos otros métodos mediados de manera directa sin partículas para transferir ADN.

Se conocen en la técnica métodos para la transformación de cloroplastos. Véanse, por ejemplo, Svab *et al.* (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:8526-8530; Svab y Maliga (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:913-917; Svab y Maliga (1993) *EMBO J.* 12:601-606. El método se basa en la inserción con pistola genética de ADN que contiene un marcador seleccionable y el direccionamiento del ADN al genoma plastídico a través de recombinación homóloga. Adicionalmente, puede lograrse la transformación plastídica mediante transactivación de un transgén portado por plastidio silencioso mediante expresión preferida de tejido de una ARN polimerasa dirigida por plastidio y codificada de manera nuclear. Se ha notificado un sistema de este tipo en McBride *et al.* (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:7301-7305.

Tras la integración de ADN foráneo heterólogo en células vegetales, entonces se aplica un nivel umbral máximo de selección apropiada en el medio para destruir las células no transformadas y separar y hacer proliferar las células supuestamente transformadas que sobreviven a este tratamiento de selección transfiriéndolas regularmente a un medio nuevo. Por el paso y la exposición continuos con selección apropiada, se identifican y se hacen proliferar las células que se transforman con el vector de plásmido. Pueden usarse entonces métodos moleculares y bioquímicos para confirmar la presencia del gen heterólogo integrado de interés en el genoma de la planta transgénica.

Las células que se han transformado pueden hacerse crecer en plantas según modos convencionales. Véase, por ejemplo, McCormick *et al.* (1986) *Plant Cell Reports* 5:81-84. Estas plantas pueden hacerse crecer luego, y polinizarse o bien con la misma cepa transformada o bien con diferentes cepas, e identificarse el híbrido resultante que tiene expresión constitutiva de la característica fenotípica deseada. Pueden hacerse crecer dos o más generaciones para garantizar que la expresión de la característica fenotípica deseada se mantiene de manera estable y se hereda y luego recogerse las semillas para garantizar que se ha obtenido la expresión de la característica fenotípica deseada. De esta manera, la presente invención proporciona semilla transformada (también denominada "semilla transgénica") que tiene un constructo de nucleótidos de la invención, por ejemplo, un casete de expresión de la invención, incorporado de manera estable en su genoma.

Evaluación de la transformación de planta

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

El análisis por PCR es un método rápido para examinar células, tejido o brotes transformados para determinar la presencia de gen incorporado en una fase anterior al trasplante al suelo (Sambrook y Russell (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY). La PCR se lleva a cabo usando cebadores de oligonucleótidos específicos para el gen de interés o fondo de vector de *Agrobacterium*, etc.

Puede confirmarse la transformación de planta mediante análisis por transferencia de tipo Southern de ADN

5 genómico (Sambrook y Russell, 2001, citado anteriormente). En general, se extrae el ADN total del transformante, se digiere con enzimas de restricción apropiadas, se fracciona en un gel de agarosa y se transfiere a una membrana de nitrocelulosa o nailon. La membrana o "transferencia" se examina con sonda con, por ejemplo, fragmento de ADN diana con ³²P radiomarcado para confirmar la integración del gen introducido en el genoma de la planta según técnicas convencionales (Sambrook y Russell, 2001, citado anteriormente).

10 En el análisis por transferencia de tipo Northern, se aísla ARN de tejidos específicos del transformante, se fracciona en un gel de formaldehído-agarosa, y se transfiere sobre un filtro de nailon según procedimientos convencionales que se usan de manera rutinaria en la técnica (Sambrook y Russell, 2001, citado anteriormente). Entonces se somete a prueba la expresión de ARN codificado por el gen pesticida mediante hibridación del filtro con una sonda radiactiva derivada de un gen pesticida, mediante métodos conocidos en la técnica (Sambrook y Russell, 2001, citado anteriormente).

15 Pueden llevarse a cabo inmunotransferencia de tipo Western, ensayos bioquímicos y similares con las plantas transgénicas para confirmar la presencia de proteína codificada por el gen pesticida mediante procedimientos convencionales (Sambrook y Russell, 2001, citado anteriormente) usando anticuerpos que se unen a uno o más epítomos presentes en la proteína pesticida.

Actividad pesticida en plantas

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

30 Se han desarrollado varios marcadores para su uso con células vegetales, tales como resistencia a cloranfenicol, el aminoglicósido G418, higromicina, o similar. También pueden usarse otros genes que codifican para un producto implicado en el metabolismo de cloroplastos como marcadores seleccionables. Por ejemplo, pueden encontrar un uso particular genes que proporcionan resistencia a herbicidas para plantas tales como glifosato, bromoxinil o imidazolinona. Tales genes se han notificado (Stalquer *et al.* (1985) J. Biol. Chem. 263:6310-6314 (gen de nitrilasa de resistencia a bromoxinil); y Sathasivan *et al.* (1990) Nucl. Acids Res. 18:2188 (gen de resistencia a imidazolinona AHAS). Adicionalmente, los genes dados a conocer en el presente documento son útiles como marcadores para evaluar la transformación de células bacterianas o vegetales. Se conocen bien en la técnica métodos para detectar la presencia de un transgén en una planta, órgano de planta (por ejemplo, hojas, tallos, raíces, etc.), semilla, célula vegetal, propágulo, embrión o progenie de los mismos. En una realización, la presencia del transgén se detecta mediante pruebas para determinar la actividad pesticida.

40 Pueden someterse a prueba plantas fértiles que expresan una proteína pesticida para determinar la actividad pesticida, y seleccionarse las plantas que muestran actividad óptima para reproducción adicional. Están disponibles métodos en la técnica para someter a ensayo la actividad de plagas. Generalmente, la proteína se mezcla y se usa en ensayos de alimentación. Véase, por ejemplo Marrone *et al.* (1985) J. of Economic Entomology 78:290-293.

45 La presente invención puede usarse para la transformación de cualquier especie de planta, incluyendo, pero sin limitarse a, monocotiledóneas y dicotiledóneas. Los ejemplos de plantas de interés incluyen, pero no se limitan a, maíz, sorgo, trigo, girasol, tomate, crucíferas, pimientos, patata, algodón, arroz, soja, remolacha azucarera, caña de azúcar, tabaco, cebada y colza, *Brassica* sp., alfalfa, centeno, mijo, cártamo, cacahuetes, boniato, yuca, café, coco, piña, cítricos, cacao, té, plátano, aguacate, higo, guayaba, mango, aceituna, papaya, anacardo, macadamia, almendra, avenas, hortalizas, plantas ornamentales y coníferas.

50 Las hortalizas incluyen, pero no se limitan a, tomates, lechuga, judías verdes, judías de Lima, guisantes, y miembros del género *Curcumis* tales como pepino, melón cantalupo y melón común. Las plantas ornamentales incluyen, pero no se limitan a, azalea, hortensia, hibisco, rosas, tulipanes, narcisos, petunias, clavel, flor de Pascua y crisantemo. Preferiblemente, 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 control pesticida

Se conocen en la técnica métodos generales para emplear cepas que comprenden una secuencia de nucleótidos de

la presente invención, o una variante de las mismas, en el control pesticida o en la modificación por ingeniería de otros organismos como agentes pesticidas. Véanse, por ejemplo la patente estadounidense n.º 5.039.523 y el documento EP 0480762A2.

5 Pueden usarse las cepas de *Bacillus* que contienen una secuencia de nucleótidos de la presente invención, o una variante de la misma, o los microorganismos que se han alterado genéticamente para contener un gen y proteína pesticida para proteger cultivos y productos agrícolas frente a plagas. En un aspecto de la invención, células completas, 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 se aplica la célula al entorno de plaga(s) diana.

10 Alternativamente, el pesticida se produce introduciendo un gen pesticida en un huésped celular. La expresión del gen pesticida da como resultado, directa o indirectamente, la producción intracelular y el 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 se aplica la célula al entorno de plaga(s) diana. El producto resultante conserva la toxicidad de la toxina. Estos pesticidas encapsulados de manera natural pueden formularse entonces según técnicas convencionales para la aplicación al entorno que alberga una plaga diana, por ejemplo, 15 suelo, agua y follaje de plantas. Véase, por ejemplo el documento EPA 0192319, y las referencias citadas en el mismo. Alternativamente, pueden formularse las células expresar un gen de esta invención tal como para permitir la aplicación del material resultante como pesticida.

Composiciones pesticidas

20 Los componentes activos de la presente invención se aplican normalmente en forma de composiciones y pueden aplicarse a la zona de cultivo o planta que va a tratarse, simultáneamente o en sucesión, con otros compuestos. Estos compuestos pueden ser fertilizantes, herbicidas, crioprotectores, tensioactivos, detergentes, jabones pesticidas, aceites inactivos, polímeros, y/o formulaciones portadores biodegradables o de liberación a lo largo del tiempo que permiten la dosificación a largo plazo de una zona diana tras una única aplicación de la formulación. También pueden ser herbicidas selectivos, insecticidas químicos, virulicidas, microbicidas, amebicidas, pesticidas, 25 fungicidas, bactericidas, nematocidas, molusquicidas o mezclas de varias de estas preparaciones, si se desea, junto con otros portadores aceptables en agricultura, tensioactivos o adyuvantes de fomento de la aplicación empleados habitualmente en la técnica de formulación. Los portadores y adyuvantes adecuados puede ser sólidos o líquidos y corresponder a las sustancias empleadas habitualmente en la tecnología de formulación, por ejemplo sustancias minerales naturales o regeneradas, disolventes, dispersantes, agentes humectantes, agentes de adhesividad, 30 aglutinantes o fertilizantes. Asimismo, las formulaciones pueden prepararse en "cebos" comestibles o confeccionarse en "trampas" para plagas para permitir la alimentación o la ingestión por una plaga diana de la formulación pesticida.

Los métodos de aplicación de un componente activo de la presente invención o una composición agroquímica de la presente invención que contiene al menos una de las proteínas pesticidas producidas por las cepas bacterianas de la presente invención incluyen aplicación foliar, recubrimiento de semillas y aplicación al suelo. El número de 35 aplicaciones y la tasa de aplicación dependen de la intensidad de infestación por la plaga correspondiente.

La composición puede formularse como un polvo, polvo fino, microgránulo, gránulo, una pulverización, emulsión, un coloide, una disolución, o similar, y puede prepararse mediante medios convencionales tales como desecación, liofilización, homogenación, extracción, filtración, centrifugación, sedimentación o concentración de un cultivo de 40 células que comprende el polipéptido. En todas de tales composiciones que contienen al menos un polipéptido pesticida de este tipo, el polipéptido puede estar presentes en una concentración de desde aproximadamente el 1% hasta aproximadamente el 99% en peso.

Pueden destruirse plagas de lepidópteros, dípteros, heterópteros, nematodos o coleópteros o reducirse su número en una zona dada mediante los métodos de la invención, o pueden aplicarse de manera profiláctica a una zona del entorno para impedir la infestación por una plaga susceptible. Preferiblemente la plaga ingiere, o está en contacto 45 con, una cantidad eficaz como pesticida del polipéptido. Por "cantidad eficaz como pesticida" se entiende una cantidad del pesticida que puede provocar la muerte a al menos una plaga, o reducir perceptiblemente el crecimiento, la alimentación o el desarrollo fisiológico normal de la plaga. Esta cantidad variará dependiendo de factores tales como, por ejemplo, las plagas diana específicas que van a controlarse, el entorno, la ubicación, la planta, el cultivo o el sitio agrícola específico que va a tratarse, las condiciones del entorno y el método, la tasa, 50 concentración, estabilidad y cantidad de aplicación de la composición de polipéptido eficaz como pesticida. Las formulaciones también pueden variar con respecto a las condiciones climáticas, consideraciones ambientales y/o la frecuencia de aplicación y/o intensidad de infestación de la plaga.

Las composiciones pesticidas descritas pueden prepararse formulando o bien la célula bacteriana, suspensión cristalina y/o de esporas o bien el componente de proteína aislada con el portador aceptable en agricultura adecuado. Las composiciones pueden formularse antes de la administración en medios apropiados tales como liofilizados, secados por congelación, desecados, o en un portador acuoso, medio o diluyente adecuado, tal como 55 solución salina u otro tampón. Las composiciones formuladas pueden estar en forma de un polvo fino o material

granular, o una suspensión en aceite (vegetal o mineral), o emulsiones en agua o aceite/agua, o como polvo humectable, o en combinación con cualquier otro material portador adecuado para aplicación agrícola. Los portadores agrícolas adecuados pueden ser sólidos o líquidos y se conocen bien en la técnica. El término "portador aceptable en agricultura" cubre todos los adyuvantes, componentes inertes, dispersantes, tensioactivos, agentes de adhesividad, aglutinantes, etc. que se usan habitualmente en la tecnología de formulación de pesticidas; estos los conocen bien los expertos en la formulación de pesticidas. Las formulaciones pueden mezclarse con uno o más adyuvantes sólidos o líquidos y prepararse mediante diversos medios, por ejemplo, mediante mezclado, combinación y/o molienda de manera homogénea de la composición pesticida con adyuvantes adecuados usando técnicas de formulación convencionales. Se describen formulaciones y métodos de aplicación adecuados en la patente estadounidense n.º 6.468.523.

Las plantas también pueden tratarse con una o más composiciones químicas, incluyendo uno o más herbicidas, insecticidas o fungicidas. Las composiciones químicas a modo de ejemplo incluyen: herbicidas para frutas/hortalizas: atrazina, bromacil, diuron, glifosato, linuron, metribuzin, simazina, trifluralina, fluazifop, glufosinato, halosulfuron Gowan, paraquat, propizamida, setoxidim, butafenacil, halosulfuron, indaziflam; insecticidas para frutas/hortalizas: aldicarb, *Bacillus thuriangiensis*, carbarilo, carbofuran, clorpirifós, cipermetrina, deltametrina, diazinón, malatión, abamectina, ciflutrina/beta-ciflutrina, esfenvalerato, lambda-cihalotrina, acequinocilo, bifenazato, metoxifeno, novaluron, cromafeno, tiaclopid, dinotefurano, fluacipirim, tolfenpirad, clotianidina, espiroclorfen, gamma-cihalotrina, espiromesifeno, espinosad, rinaxipir, ciazipir, espinoteram, triflumuron, espirotetramat, imidaclopid, flubendiamida, tiodicarb, metaflumizona, sulfoxaflor, ciflumetofeno, cianopirafeno, imidaclopid, clotianidina, tiametoxam, espinotoram, tiodicarb, flonicamida, metiocarb, emamectina-benzoato, indoxacarb, foztiazato, fenamifós, cadusafós, piriproxifeno, óxido de fenbutatina, hexiazox, metomil, 4-[[[(6-clorpiridin-3-il)metil](2,2-difluoretil)amino]furan-2(5H)-ona]; fungicidas para frutas/hortalizas: carbendazima, clorotalonil, EBDC, azufre, tiofanato-metilo, azoxistrobina, cimoxanil, fluazinam, fosetil, iprodiona, kresoxim-metilo, metalaxil/mefenoxam, trifloxistrobina, etaboxam, iprovalicarbo, trifloxistrobina, fenhexamida, fumarato de oxpoconazol, ciazofamida, fenamidona, zoxamida, picoxistrobina, piraclostrobina, ciflufenamida, boscalid; herbicidas para cereales: isoproturon, bromoxinil, ioxinil, fenoxis, clorsulfuron, clodinafop, diclofop, diflufenican, fenoxaprop, florasulam, fluroxipir, metsulfuron, triasulfuron, flucarbazona, yodosulfuron, propoxycarbazona, picolinafeno, mesosulfuron, beflubutamida, pinoxaden, amidosulfuron, tifensulfuron, tribenuron, flupirsulfuron, sulfosulfuron, pirasulfotol, piroxulam, flufenacet, tralcoxidim, piroxasulfon; fungicidas para cereales: carbendazima, clorotalonil, azoxistrobina, ciproconazol, ciprodinil, fenpropimorph, epoxiconazol, kresoxim-metilo, quinoxifeno, tebuconazol, trifloxistrobina, simeconazol, picoxistrobina, piraclostrobina, dimoxistrobina, protioconazol, fluoxastrobina; insecticidas para cereales: dimetoato, lambda-cihalotrina, deltametrina, alfa-cipermetrina, 13-ciflutrina, bifentrina, imidaclopid, clotianidina, tiametoxam, tiaclopid, acetamiprid, dinotefurano, clorpirifós, metamidofós, oxidemeton-metilo, pirimicarb, metiocarb; herbicidas para maíz: atrazina, alaclor, bromoxinil, acetoclor, dicamba, clopiralid, (s)-dimetenamida, glufosinato, glifosato, isoxaflutol, (s)-metolaclor, mesotriona, nicosulfuron, primisulfuron, rimsulfuron, sulcotriona, foramsulfuron, topramezona, tembotriona, saflufenacil, thiencazazona, flufenacet, piroxasulfon; insecticidas para maíz: carbofuran, clorpirifós, bifentrina, fipronil, imidaclopid, lambda-cihalotrina, teflutrina, terbufós, tiametoxam, clotianidina, espiromesifeno, flubendiamida, triflumuron, rinaxipir, deltametrina, tiodicarb, beta-ciflutrina, cipermetrina, bifentrina, lufenuron, triflumuron, teflutrina, tebupirimfós, etiprol, ciazipir, tiaclopid, acetamiprid, dinotefurano, avermectina, metiocarb, espiroclorfen, espirotetramat; fungicidas para maíz: fenitropan, tiram, protioconazol, tebuconazol, trifloxistrobina; herbicidas para arroz: butaclor, propanil, azimsulfuron, bensulfuron, cihalofop, daimuron, fentrazamida, imazosulfuron, mefenacet, oxaziclomefona, pirazosulfuron, piributicarb, quinlorac, tiobencarb, indanofan, flufenacet, fentrazamida, halosulfuron, oxaziclomefona, benzobencilon, pirifitalida, penoxsulam, bispiribaco, oxadiargilo, etoxisulfuron, pretilaclor, mesotriona, tefuritriona, oxadiazona, fenoxaprop, pirimisulfan; insecticidas para arroz: diazinón, fenitrotión, fenobucarb, monocrotofos, benfuracarb, buprofezina, dinotefurano, fipronil, imidaclopid, isoprocarb, tiaclopid, cromafeno, tiaclopid, dinotefurano, clotianidina, etiprol, flubendiamida, rinaxipir, deltametrina, acetamiprid, tiametoxam, ciazipir, espinosad, espinotoram, emamectina-benzoato, cipermetrina, clorpirifós, cartap, metamidofós, etofenprox, triazofós, 4-[[[(6-clorpiridin-3-il)metil](2,2-difluoretil)amino]furan-2(5H)-ona, carbofuran, benfuracarb; fungicidas para arroz: tiofanato-metilo, azoxistrobina, carpropamida, edifenfós, ferimzona, isondanfós, isoprotiolo, pencicuron, sondanazol, piroquilon, triclazol, trifloxistrobina, diclocimet, fenoxanil, simeconazol, tiadinil; herbicidas para algodón: diuron, fluometuron, MSMA, oxifluorfen, prometrina, trifluralina, carfentrazona, cletodim, fluazifop-butilo, glifosato, norflurazon, pendimetalina, piritiobaco-sodio, trifloxisulfuron, tepraloxidim, glufosinato, flumioxazina, tidiazuron; insecticidas para algodón: acefato, aldicarb, clorpirifós, cipermetrina, deltametrina, malatión, monocrotofos, abamectina, acetamiprid, emamectina-benzoato, imidaclopid, indoxacarb, lambda-cihalotrina, espinosad, tiodicarb, gamma-cihalotrina, espiromesifeno, piridialilo, flonicamida, flubendiamida, triflumuron, rinaxipir, beta-ciflutrina, espirotetramat, clotianidina, tiametoxam, tiaclopid, dinotefurano, flubendiamida, ciazipir, espinosad, espinotoram, gamma-cihalotrina, 4-[[[(6-clorpiridin-3-il)metil](2,2-difluoretil)amino]furan-2(5H)-ona, tiodicarb, avermectina, flonicamida, piridialilo, espiromesifeno, sulfoxaflor, profenofós, triazofós, endosulfan; fungicidas para algodón: etridiazol, metalaxilo, quintozeno; herbicidas para soja: alaclor, bentazona, trifluralina, clorimuron-etilo, cloransulam-metilo, fenoxaprop, fomesafeno, fluazifop, glifosato, imazamox, imazaquin, imazetapir, (S)-metolaclor, metribuzin, pendimetalina, tepraloxidim, glufosinato; insecticidas para soja: lambda-cihalotrina, metomil, paratión, tiocarb, imidaclopid, clotianidina, tiametoxam, tiaclopid, acetamiprid, dinotefurano, flubendiamida, rinaxipir, ciazipir, espinosad, espinotoram, emamectina-benzoato, fipronil, etiprol, deltametrina, beta-ciflutrina, gamma y lambda-cihalotrina, 4-[[[(6-clorpiridin-3-il)metil](2,2-difluoretil)amino]furan-

2(5H)-ona, espirotetramat, espinodiclofeno, triflumuron, flonicamida, tiodicarb, beta-ciflutrina; fungicidas para soja: azoxistrobina, ciproconazol, epoxiconazol, flutriafol, piraclostrobina, tebuconazol, trifloxistrobina, prothioconazol, tetraconazol; herbicidas para remolacha azucarera: cloridazon, desmedifam, etofumesato, fenmedifam, trialato, clopiralid, fluazifop, lenacil, metamitron, quinmerac, cicloxidim, triflurosulfuron, tepraloxidim, quizalofop; insecticidas para remolacha azucarera: imidacloprid, clotianidina, tiametoxam, tiacloprid, acetamiprid, dinetofurano, deltametrina, β -ciflutrina, γ /lambda-cihalotrina, 4-[[[6-clorpiridin-3-il)metil](2,2-difluoretil)amino]furan-2(5H)-ona, teflutrina, rinaxipir, ciaxipir, fipronil, carbofurano; herbicidas para canola: clopiralid, diclofop, fluazifop, glufosinato, glifosato, metazaclor, trifluralina etametsulfuron, quinmerac, quizalofop, cletodim, tepraloxidim; fungicidas para canola: azoxistrobina, carbendazima, fludioxonil, iprodiona, procloraz, vinclozolin; insecticidas para canola: carbofurano, organofosfatos, piretroides, tiacloprid, deltametrina, imidacloprid, clotianidina, tiametoxam, acetamiprid, dinetofurano, β -ciflutrina, γ y lambda-cihalotrina, tau-fluvalerato, etiprol, espinosad, espinotoram, flubendiamida, rinaxipir, ciazipir, 4-[[[6-clorpiridin-3-il)metil](2,2-difluoretil)amino]furan-2(5H)-ona.

“Plaga” incluye pero no se limita a, los insectos, hongos, bacterias, nematodos, ácaros, garrapatas, y similares. Las plagas de insectos incluyen los insectos seleccionados de los órdenes *Coleoptera*, *Diptera*, *Hymenoptera*, *Lepidoptera*, *Mallophaga*, *Homoptera*, *Hemiptera*, *Orthoptera*, *Thysanoptera*, *Dermoptera*, *Isoptera*, *Anoplura*, *Siphonaptera*, *Trichoptera*, etc., particularmente *Coleoptera*, *Lepidoptera* y *Diptera*.

El orden *Coleoptera* incluye los subórdenes *Adephaga* y *Polyphaga*. El suborden *Adephaga* incluye las superfamilias *Caraboidea* y *Gyrinoidea*, mientras que el suborden *Polyphaga* incluye las superfamilias *Hydrophiloidea*, *Staphylinoidea*, *Cantharoidea*, *Cleroidea*, *Elateroidea*, *Dascilloidea*, *Dryopoidea*, *Byrrhoidea*, *Cucujoidea*, *Meloidea*, *Mordelloidea*, *Tenebrionoidea*, *Bostrichoidea*, *Scarabaeoidea*, *Cerambycoidea*, *Chrysomeloidea* y *Curculionoidea*. La superfamilia *Caraboidea* incluye las familias *Cicindelidae*, *Carabidae* y *Dytiscidae*. La superfamilia *Gyrinoidea* incluye la familia *Gyrinidae*. La superfamilia *Hydrophiloidea* incluye la familia *Hydrophilidae*. La superfamilia *Staphylinoidea* incluye las familias *Silphidae* y *Staphylinidae*. La superfamilia *Cantharoidea* incluye las familias *Cantharidae* y *Lampyridae*. La superfamilia *Cleroidea* incluye las familias *Cleridae* y *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*, *Bombilidae* 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 *Acalyptratae* y *Calypttratae*. La sección *Acalyptratae* incluye las familias *Otiidae*, *Tephritidae*, *Agromyzidae* y *Drosophilidae*. La sección *Calypttratae* incluye las familias *Hippoboscidae*, *Oestridae*, *Tachinidae*, *Anthomyiidae*, *Muscidae*, *Calliphoridae* y *Sarcophagidae*.

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

Las plagas de insectos de la invención para los principales cultivos incluyen: maíz: *Ostrinia nubilalis*, barrenador europeo del maíz; *Agrotis ipsilon*, gusano cortador grasiento; *Helicoverpa zea*, gusano de la cápsula de maíz; *Spodoptera frugiperda*, gusano cogollero del maíz; *Diatraea grandiosella*, barrenador del maíz del suroeste; *Elasmopalpus lignosellus*, barrenador menor del tallo del maíz; *Diatraea saccharalis*, barrenador de la caña de azúcar; *Diabrotica virgifera*, gusano de la raíz del maíz del oeste; *Diabrotica longicornis barberi*, gusano de la raíz del maíz del norte; *Diabrotica undecimpunctata howardi*, gusano de la raíz del maíz del sur; *Melanotus* spp., gusanos alambre; *Cyclocephala borealis*, rozador enmascarado del norte (gusano blanco); *Cyclocephala immaculata*, rozador enmascarado del sur (gusano blanco); *Popillia japonica*, escarabajo japonés; *Chaetocnema pulicaria*, pulguilla del maíz; *Sphenophorus maidis*, gorgojo del maíz; *Rhopalosiphum maidis*, pulgón de las hojas del maíz; *Anuraphis maidiradicis*, pulgón de la raíz del maíz; *Blissus leucopterus leucopterus*, chinche; *Melanoplus femurrubrum*, saltamontes de patas rojas; *Melanoplus sanguinipes*, saltamontes migratorio; *Hylemya platura*, mosca de las semillas; *Agromyza parvicornis*, minador de hojas de mancha de maíz; *Anaphothrips obscurus*, trips de hierba; *Solenopsis milesta*, hormiga ladrona; *Tetranychus urticae*, araña roja; sorgo: *Chilo partellus*, barrenador del sorgo; *Spodoptera frugiperda*, gusano cogollero del maíz; *Helicoverpa zea*, gusano de la cápsula de maíz; *Elasmopalpus lignosellus*, barrenador menor del tallo del maíz; *Feltia subterranea*, gusano graneado; *Phyllophaga crinita*, gusano blanco; *Eleodes*, *Conoderus* y *Aeolus* spp., gusanos alambre; *Oulema melanopus*, crisomela de los cereales; *Chaetocnema pulicaria*, pulguilla del maíz; *Sphenophorus maidis*, gorgojo del maíz; *Rhopalosiphum maidis*; pulgón de las hojas del maíz; *Sipha flava*, pulgón amarillo de la caña de azúcar; *Blissus leucopterus leucopterus*, chinche; *Contarinia sorghicola*, mosquita del sorgo; *Tetranychus cinnabarinus*, araña roja del clavel; *Tetranychus urticae*, araña roja; trigo: *Pseudaletia unipunctata*, gusano cogollero; *Spodoptera frugiperda*, gusano cogollero del maíz; *Elasmopalpus lignosellus*, barrenador menor del tallo del maíz; *Agrotis orthogonia*, gusano cortador occidental;

Elasmopalpus lignosellus, barrenador menor del tallo del maíz; *Oulema melanopus*, crisomela de los cereales; *Hypera punctata*, gorgojo del trébol; *Diabrotica undecimpunctata howardi*, gusano de la raíz del maíz del sur; pulgón ruso del trigo; *Schizaphis graminum*, pulgón verde de los cereales; *Macrosiphum avenae*, pulgón inglés de las gramíneas; *Melanoplus femurrubrum*, saltamontes de patas rojas; *Melanoplus differentialis*, saltamontes diferencial; *Melanoplus sangatinipes*, saltamontes migratorio; *Mayetiola destructor*, mosquito del trigo; *Sitodiplosis mosellana*, mosquita del trigo; *Meromyza americana*, mosca del tallo del trigo; *Hylemya coarctata*, mosca gris del trigo; *Frankliniella fusca*, trips del tabaco; *Cephus cinctus*, mosca de sierra del trigo; *Aceria tulipae*, ácaro blanco del trigo; girasol: *Suleima helianthana*, polilla de las yemas del girasol; *Homoeosoma electellum*, polilla del girasol; *Zygommatia exclamatoris*, escarabajo del girasol; *Bothyrus gibbosus*, escarabajo de la zanahoria; *Neolasioptera murtfeldtiana*, mosquita de las semillas de girasol; algodón: *Helioesta virescens*, gusano de las yemas del algodón; *Helicoverpa zea*, gusano de las cápsulas del algodón; *Spodoptera exigua*, gusano cogollero de la remolacha; *Pectinophora gossypiella*, gusano rosado del algodón; *Anthonomus grandis*, picudo del algodón; *Aphis gossypii*, pulgón del algodón; *Pseudatomoscelis seriatus*, pulguilla del algodón; *Trialeurodes abutilonea*, mosca blanca de alas con franjas; *Lygus lineolaris*, chinche manchador; *Melanoplus femurrubrum*, saltamontes de patas rojas; *Melanoplus differentialis*, saltamontes diferencial; *Thrips tabaci*, trips de la cebolla; *Frankliniella fusca*, trips del tabaco; *Tetranychus cinnabarinus*, arañuela roja del clavel; *Tetranychus urticae*, arañuela roja; Arroz: *Diatraea saccharalis*, barrenador de la caña de azúcar; *Spodoptera frugiperda*, gusano cogollero del maíz; *Helicoverpa zea*, gusano de la cápsula de maíz; *Colaspis brunnea*, colaspis de la uva; *Lissorhoptus oryophilus*, gorgojo acuático del arroz; *Sitophilus oryzae*, gorgojo del arroz; *Nephotettix nigropictus*, chicharrita del arroz; *Blissus leucopterus leucopterus*, chinche; *Acrosternum hilare*, chinche hediondo verde; soja: *Pseudoplusia includens*, oruga agrimensora de la soja; *Anticarsia gemmatilis*, oruga de las leguminosas; *Plathypena scabra*, gusano verde del trébol; *Ostrinia nubilalis*, barrenador europeo del maíz; *Agrotis ipsilon*, gusano cortador grasiento; *Spodoptera exigua*, gusano cogollero de la remolacha; *Helioesta virescens*, gusano de las yemas del algodón; *Helicoverpa zea*, gusano de las cápsulas del algodón; *Epilachna varivestis*, escarabajo del frijol mexicano; *Myzus persicae*, pulgón verde del melocotonero; *Empoasca fabae*, chicharrita de la patata; *Acrosternum hilare*, chinche hediondo verde; *Melanoplus femurrubrum*, saltamontes de patas rojas; *Melanoplus differentialis*, saltamontes diferencial; *Hylemya platura*, mosca de las semillas; *Sericothrips variabilis*, trips de la soja; *Thrips tabaci*, trips de la cebolla; *Tetranychus turkestanii*, arañuela de la fresa; *Tetranychus urticae*, arañuela roja; cebada: *Ostrinia nubilalis*, barrenador europeo del maíz; *Agrotis ipsilon*, gusano cortador grasiento; *Schizaphis graminum*, pulgón verde de los cereales; *Blissus leucopterus leucopterus*, chinche; *Acrosternum hilare*, chinche hediondo verde; *Euschistus servus*, chinche hediondo pardo; *Delia platura*, mosca de las semillas; *Mayetiola destructor*, mosquito del trigo; *Petrobia latens*, ácaro pardo del trigo; colza: *Brevicoryne brassicae*, pulgón de la col; *Phyllotreta cruciferae*, pulguilla; *Mamestra configurata*, gusano soldado Bertha; *Plutella xylostella*, polilla de la cola; *Delia* spp., mosquillas de la raíz.

Los nematodos incluyen nematodos parasitarios tales como nematodos de la raíz, heteroderas y nematodos de los prados, incluyendo *Heterodera* spp., *Meloidogyne* spp. y *Globodera* spp.; particularmente miembros de los heteroderas, incluyendo, pero sin limitarse a, *Heterodera glycines* (heterodera de la soja); *Heterodera schachtii* (heterodera de la remolacha); *Heterodera avenae* (heterodera de los cereales); y *Globodera rostochiensis* y *Globodera pallida* (nematodos dorados de la patata). Los nematodos de los prados incluyen *Pratylenchus* spp.

Métodos para aumentar el rendimiento vegetal

Se proporcionan métodos para aumentar el rendimiento vegetal. Los métodos comprenden proporcionar una planta o célula vegetal que expresa un polinucleótido que codifica para la secuencia pesticida de polipéptido dada a conocer en el presente documento y hacer crecer la planta o a semilla de la misma en un campo infestado con una plaga frente a la que dicho polipéptido tiene actividad pesticida. En algunas realizaciones, el polipéptido tiene actividad pesticida frente a una plaga de lepidópteros, coleópteros, dípteros, hemípteros o nematodos, y dicho campo está infestado con una plaga de lepidópteros, hemípteros, dípteros o nematodos.

Tal como se define en el presente documento, el "rendimiento" de la planta se refiere a la cualidad y/o cantidad de biomasa producida por la planta. Por "biomasa" se entiende cualquier producto de planta medido. Un aumento de la producción de biomasa es cualquier mejora en el rendimiento del producto de planta medido. El aumento del rendimiento vegetal tiene varias aplicaciones comerciales. Por ejemplo, el aumento de la biomasa de hojas de planta puede aumentar el rendimiento de hortalizas de hoja para consumo humano o animal. Adicionalmente, puede usarse el aumento de la biomasa de hojas para aumentar la producción de productos industriales o farmacéuticos derivados de plantas. Un aumento del rendimiento puede comprender cualquier aumento estadísticamente significativo incluyendo, pero sin limitarse a, un aumento de al menos el 1%, un aumento de al menos el 3%, un aumento de al menos el 5%, un aumento de al menos el 10%, un aumento de al menos el 20%, de al menos el 30%, de al menos el 50%, de al menos el 70%, de al menos el 100% o un aumento mayor del rendimiento en comparación con una planta que no expresa la secuencia pesticida.

En métodos específicos, se aumenta el rendimiento vegetal como resultado de una resistencia a plagas mejorada de una planta que expresa una proteína pesticida dada a conocer en el presente documento. La expresión de la proteína pesticida da como resultado una capacidad reducida de una plaga para infestar o alimentarse con la planta, mejorando por tanto el rendimiento vegetal.

Se ofrecen los siguientes ejemplos a modo de ilustración y no a modo de limitación.

Parte experimental

Ejemplo 1. Identificación de una proteína activa frente al gusano de la raíz del maíz del oeste de la cepa ATX 2024.

- 5 Se identificó la proteína AXMI-205 activa del gusano de la raíz del maíz del oeste mediante una combinación de análisis bioquímico y genómico de la cepa ATX 2024.

Se identificó ATX2024 como cepa activa en bioensayo de *Diabrotica virgifera* (gusano de la raíz del maíz del oeste o WCRW, *Western corn rootworm*) que mostraba una actividad de sensibilidad al calor. Se realizaron el fraccionamiento y la purificación de proteínas en materiales de cultivo de ATX2024 de la siguiente manera:

- 10 Se hicieron crecer células de ATX2024 en medios adecuados (tales como medios C2 o medios CYS complementados con trehalosa; no siendo crítica la elección de medios para la invención) durante 3 días a 37°C. También puede realizarse la incubación a 30°C. Se recogieron los sedimentos celulares y se perturbaron las células en tampón A (acetato de sodio 20 mM/cloruro de sodio 5 mM, pH 5) usando una celda de alta presión de "prensa francesa".

- 15 Se clarificaron los lisados mediante centrifugación y se dializaron frente a acetato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 50 mM, pH 5,0. Entonces se cargó la muestra dializada sobre una columna de intercambio catiónico SP Sepharose™ de 20 ml (GE Healthcare). Se eluyeron las proteínas con un gradiente salino lineal en tampón A desde cloruro de sodio 50 mM hasta 1 M a lo largo de 20 volúmenes de columna. También puede realizarse la elución a lo largo de 10 volúmenes de columna.

- 20 Se reunieron las fracciones activas y se dializaron frente a tampón B (Tris-HCl 20 mM/NaCl 50 mM, pH 7 o pH 8). Entonces se cargaron las fracciones activas dializadas en una columna de intercambio aniónico Sepharose Q de 5 ml. Pueden usarse otras columnas de intercambio aniónico, por ejemplo, la columna de intercambio aniónico SOURCE™Q de 1,7 ml. Se eluyeron las proteínas con un gradiente salino lineal en tampón A desde NaCl 50 mM hasta 1 M. Se sometieron a prueba las fracciones recogidas para determinar la actividad sobre WCRW y se observaron fracciones con actividad sobre WCRW. Se identificó una banda de proteína de aproximadamente 52 kDa como que se correlacionaba con la actividad de las fracciones. Esta proteína se denomina en el presente documento banda de proteína n.º 10.

- 30 Entonces se reunieron las fracciones activas y se concentraron, y se sometieron a SDS-PAGE. Se aisló la parte del gel resultante correspondiente a la banda de proteína n.º 10, y se envió para análisis mediante análisis tanto de secuenciación N-terminal como de espectrometría de masas en tándem con tiempo de vuelo por desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI-TOF-TOF) tal como se conoce en la técnica.

La comparación de los datos de MALDI-TOF-TOF de la banda de proteína n.º 10 no mostró coincidencias en una base de datos de proteínas conocidas.

- 35 La secuenciación de aminoácidos del extremo N-terminal de la banda de proteína n.º 10 dio como resultado una secuencia peptídica N-terminal que no mostró coincidencias con secuencias de proteína conocidas cuando se comparó con una base de datos secuencias de proteína conocidas.

Ejemplo 2. Secuenciación genómica de ATX2024

Se identificó la secuencia génica completa de la cepa seleccionada de la siguiente manera:

- 40 El ADN total contiene una mezcla de algunos o de todos de los siguientes: ADN genómico, plásmidos de diverso tamaño; cromosomas de fago; otras moléculas extracromosómicas no caracterizadas.

Cizalladura mecánica o enzimática del ADN extracromosómico para generar fragmentos con distribución de tamaños.

Secuenciación del ADN fragmentado mediante métodos conocidos en la técnica.

Ejemplo 3. Coincidencia de datos N-terminales y de MALDI-TOF-TOF con datos de secuencia genómica:

- 45 Se generó un conjunto de supuestos marcos de lectura abiertos (ORF) codificados por los datos de secuencia para ATX2024 mediante la extracción de todos los posibles ORF de las lecturas de secuencia generadas a partir de

ATX2024. Se compararon datos de secuenciación N-terminal de la banda de proteína n.º 10 (anteriormente) con el conjunto de ORF de ATX2024 usando el algoritmo BLAST. Se encontraron dos lecturas que codificaban para supuestos fragmentos de proteína con alta homología con los datos de secuencia N-terminal.

- 5 De manera similar, se compararon los datos de MALDI-TOF-TOF de la banda de proteína n.º 10 con el conjunto de ORF de ATX2024 usando el programa Mascot (www.matrixscience.com; Perkins *et al.* (1999) *Electrophoresis* 20(18):3551-67). Se encontró que siete lecturas codificaban para supuestos fragmentos de proteína que tienen coincidencias significativas con picos presentes en el conjunto de datos de MALDI-TOF-TOF.

Se reunieron las lecturas de secuencia de ADN identificadas a partir del análisis de datos N-terminales y de MALDI-TOF-TOF para proporcionar una secuencia génica preliminar.

- 10 Se usaron estrategias de TAIL-PCR para obtener la secuencia flanqueante adyacente a los datos de secuencia génica preliminar. Se reunieron conjuntamente las secuencias de los productos de PCR resultantes con los datos genómicos originales de ATX2024 para proporcionar una secuencia génica terminada para el marco de lectura abierto que codifica para la banda de proteína n.º 10. Este marco de lectura abierto se designa como Axmi205 (SEQ ID NO:1), y la proteína codificada por el marco de lectura abierto como AXMI-205 (SEQ ID NO:2, 3 ó 4).

- 15 Entonces se amplificó la región genómica que codifica para AXMI-205 a partir del genoma de ATX2024, se clonó y se obtuvo la secuencia de ADN de este clon. La secuencia de ADN de este clon en la región que abarca Axmi205 se proporciona como SEQ ID NO:12.

La comparación de AXMI-205 con bases de datos de secuencias de proteína conocidas muestra que AXMI-205 es una proteína única, que muestra muy poca homología (el 20% o menos) con proteínas conocidas.

- 20 De manera interesante, AXMI-205 sí que muestra baja homología, pero posiblemente significativa, con una amplia clase de proteínas vagamente relacionadas denominadas a menudo proteínas MACPF (Rosado *et al.*, *Cellular Microbiology* (2008) 10(9), 1765-1774). Se ha propuesto que estas proteínas desempeñan papeles en procesos tales como respuesta inmunitaria y protección frente al ataque bacteriano. AXMI-205 es idéntica en el 20% a una proteína de *Clavibacter michiganensis* (SEQ ID NO:14; n.º de registro GENBANK YP_001223127, Gartemann *et al.*, *J. Bacteriol.* 190 (6), 2138-2149 (2008)) y una identidad del 13% con una proteína de *Photobacterium luminescens* (SEQ ID NO:15; n.º de registro GENBANK ZQ22_A; Rosado, C.J., *et al.*, *Science* 317 (5844), 1548-1551 (2007)). Aunque estas identidades en porcentaje son bajas, pueden identificarse bloques de conservación de aminoácidos entre estas proteínas a partir de la inspección de la figura 1.
- 25

Ejemplo 3. Expresión heteróloga de AXMI-205

- 30 Se clonó el marco de lectura abierto de Axmi205 en un vector de expresión de *E. coli* basado en (1) vector de fusión de unión a maltosa para producir pAX6911, y (2) un vector de expresión basado en pRSF1b para producir pAX7011.

- Para la expresión en *E. coli*, se transformó BL21*DE3 con o bien pAX6911, o bien pAX7011 o bien plásmidos de control. Se inoculó una colonia individual transformada con el vector en LB complementado con kanamicina y se hizo crecer durante la noche a 37°C. Al día siguiente, se inoculó medio nuevo por duplicado con el 1% de cultivo durante la noche y se hizo crecer a 37°C hasta la fase logarítmica. Posteriormente, se indujeron los cultivos con IPTG 1 mM durante 3 horas a 37°C o durante la noche a 20°C. Se suspendió cada sedimento celular en tampón carbonato de sodio 50 mM, pH 10,5 complementado con DTT 1 mM y se sonicó. El análisis mediante SDS-PAGE detectó la expresión de una proteína correspondiente al tamaño predicho de AXMI-205. En el caso del vector de fusión de pMal, pAX6911, se observó mediante PAGE una proteína que concuerda con el tamaño predicho para la fusión pMAL-AXMI-205.
- 35
- 40

Ejemplo 4. Actividad pesticida de AXMI-205

- Se purificó la proteína de fusión a partir de lisados de clones de *E. coli* tal como recomienda el proveedor (New England Biolabs), y se escindió o bien con factor Xa o bien con tripsina. Se confirmó mediante análisis de SDS-PAGE la escisión de la proteína de fusión purificada. Se sometieron a prueba la proteína purificada de pAX6911 que contenía AXMI-205 y o bien se escindió pAX6911 con factor Xa o tripsina, o bien la proteína no escindida en ensayos en insectos con controles apropiados en un tampón que se componía de Tris 20 mM, DTT 1 mM, NaCl 50 mM. También se sometieron a prueba extractos solubles de pAX7011 que expresaba AXMI-205 de esta manera. Después de dos días, las muestras que contenían AXMI-205 presentaron una fuerte actividad de retraso del crecimiento y confirieron mortalidad para el gusano de la raíz del maíz del oeste. La tabla 1 muestra una descripción de las asignaciones de puntuación usadas en el presente documento, y la tabla 2 resume las actividades observadas a partir de muestras de AXMI-205.
- 45
- 50

Tabla 1. Descripción del sistema de puntuación

Puntuación	Descripción
0	sin efecto observado
1	retraso del crecimiento no uniforme leve
2	retraso del crecimiento no uniforme moderado
3	retraso del crecimiento uniforme moderado a grave
4	mortalidad (<100%) con retraso del crecimiento uniforme
5	Mortalidad completa

Tabla 2. Actividad pesticida de muestras de AXMI-205

Muestra	Actividad sobre WCRW (2 días)	Mortalidad en porcentaje
Fusión Axmi205-MBP (de pAX6911)	3,0	25%
Fusión Axmi205- MBP escindida con factor Xa	3,0	25%
Fusión Axmi205- MBP escindida con tripsina	3,0	25%
Axmi205 en extracto soluble de pAX7011	3,0	0%
Control de tampón	0	0%

Ejemplo 5. Ensayos adicionales para determinar la actividad pesticida

5 Pueden someterse a prueba las secuencias de nucleótidos de la invención para determinar su capacidad para producir proteínas pesticidas. La capacidad de una proteína pesticida para actuar como pesticida sobre una plaga se evalúa a menudo de varios modos. Un modo bien conocido en la técnica es realizar un ensayo de alimentación. En un ensayo de alimentación de este tipo, se expone la plaga a una muestra que contiene o bien compuestos que van a someterse a prueba o bien muestras de control. A menudo esto se realiza poniendo el material que va a someterse a prueba, o una dilución adecuada de tal material, sobre un material que ingerirá la plaga, tal como una dieta artificial. El material que va a someterse a prueba puede componerse de un líquido, sólido o una suspensión.

10 El material que va a someterse a prueba puede ponerse sobre la superficie y luego permitir que se seque. Alternativamente, el material que va a someterse a prueba puede mezclarse con una dieta artificial fundida, luego dispensarse a la cámara de ensayo. La cámara de ensayo puede ser, por ejemplo, una taza, un plato o un pocillo de una placa de microtitulación.

15 Los ensayos para parásitos chupadores (por ejemplo, pulgones) pueden implicar separar el material de prueba del insecto mediante una división, de manera ideal una parte que pueden perforar las partes chupadoras de la boca 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 sacarosa, para fomentar la ingestión del compuesto de prueba.

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

25 Se conocen en la técnica otros métodos y enfoques para someter a ensayo plagas, y pueden hallarse, por ejemplo en Robertson y Preisler, eds. (1992) *Pesticide bioassays with arthropod*, CRC, Boca Raton, FL. Alternativamente, se describen comúnmente ensayos en las revistas *Arthropod Management Tests* y *Journal of Economic Entomology* o mediante comentario con miembros de la Sociedad Americana de Entomología (ESA).

Ejemplo 6. Genes sintéticos.

Se diseñaron genes sintéticos que codifican para AXMI-205. *Axmi205v01.02* se expone en SEQ ID NO:9. *Axmi205v01.03* se expone en SEQ ID NO:10. *Axmi205v01.04* se expone en SEQ ID NO:11.

30 Ejemplo 7. Variantes de AXMI-205.

Para identificar regiones y posiciones en la parte C-terminal de AXMI-205 que son funcionalmente importantes, se sometieron a ensayos mutantes de barrido de alanina en la región correspondiente a las posiciones de aminoácido 307-536 de SEQ ID NO:2. Se generaron los mutantes de alanina de manera sintética (Geneart, Burlingame, CA) y se organizaron en un vector de expresión derivado de pAX3577 para la expresión en *E. coli* (pAX3577 contiene *Axmi205v01.03* en pRSF1b (Invitrogen)).

Partiendo del mutante S307A, se sustituyó cada segundo residuo por una alanina. El último mutante de alanina en esta serie fue K535A. En total, se reunieron 101 mutantes de alanina.

Se transformaron los mutantes de alanina reunidos, así como pAX3577, en células BL21*DE3 y se sembraron en placa sobre LB + kanamicina (100 µg/ml). Se cogieron colonias nuevas y se llevaron a 8 ml de medio líquido de LB + kanamicina (100 µg/ml) y se hicieron crecer en bloques de 24 pocillos profundos a 37°C y 300 rpm hasta que se alcanzó una DO600 nm de 0,6. Se añadió IPTG hasta una concentración final de 0,5 mM y se incubaron los cultivos durante unas 18 horas más a 20°C. Se determinó la DO600 nm y se recogieron las células mediante centrifugación (10 minutos a 4000 rpm, 4°C). Se resuspendieron los sedimentos celulares en Tris 20 mM/HCl pH 7,4, NaCl 150 mM, DTT 1 mM a una densidad de 20 DO600/ml. Se perturbaron las células mediante batido con esferas y se obtuvieron extractos solubles después de centrifugación a 4500 rpm durante 15 minutos a 4°C.

Se sometieron a ensayo los extractos para determinar la actividad frente a WCRW en cuatro réplicas por variante cada uno. Después de cinco y seis días, se determinaron las puntuaciones de toxicidad para el gusano de la raíz promediando las puntuaciones de las cuatro réplicas. Se examinaron 266 variantes en este examen primario, proporcionando una cobertura de 3 veces de la biblioteca. Se secuenciaron las variantes que puntuaron por encima y por debajo de la puntuación de la secuencia de tipo natural de Axmi205.

Se encontró que los siguientes mutantes de alanina (con relación a SEQ ID NO:2) eran activos sobre WCRW: S307A, D315A, V317A, S349A, G351A, K353A, V355A, D395A, G399A, W407A, G419A, P355A, P435A, S443A, K465A, V467A, F483A, P487A, S495A, D497A, E499A, K509A, y I513A. El mutante de alanina E499A se designó como Axmi205(evo24) (SEQ ID NO:5) y el mutante de alanina V467A se designó como Axmi205(evo25) (SEQ ID NO:6).

Ejemplo 8. Actividad de truncamientos de axmi-205

Se construyeron varios truncamientos de axmi-205 y se sometieron a prueba para determinar la actividad sobre el gusano de la raíz del maíz. Se construyeron truncamientos C-terminales que eliminaron o bien 10, 20, 30, 34 o bien 71 aminoácidos del extremo C-terminal de la proteína AXMI-205 (SEQ ID NO:2).

El clon pAX7106 expresó una fusión de MBP que, después de escisión con factor Xa, produjo la proteína AXMI-205(trunc10) (SEQ ID NO:7), que carece de 10 aminoácidos del extremo C-terminal con relación a AXMI-205. El clon pAX7106 expresó una proteína de fusión de MBP que, después de escisión con factor Xa, produjo la proteína AXMI-205(trunc20) (SEQ ID NO:8), que carece de 20 aminoácidos del extremo C-terminal con relación a AXMI-205. Tanto AXMI-205(trunc10) como AXMI-205(trunc20) demostraron actividad sobre WCRW, mientras que un truncamiento de 30 aminoácidos no lo hizo.

Ejemplo 9. Vectorización de genes para expresión en plantas

Las regiones codificantes de la invención se conectan con secuencias promotoras y terminadoras apropiadas para la expresión en plantas. Tales secuencias se conocen bien 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 35S del VMCo para la expresión en dicotiledóneas, y los terminadores nos o PinII. También se conocen bien en la técnica técnicas para producir y confirmar constructos promotor - gen - terminador.

En un aspecto de la invención, se diseñan y generan secuencias de ADN sintéticas. Estas secuencias sintéticas tienen una secuencia de nucleótidos alterada con relación a la secuencia original, pero codifican para proteínas que son esencialmente idénticas a la proteína AXMI-205 original (por ejemplo, SEQ ID NO:9-12).

En otro aspecto de la invención, se diseñan versiones modificadas de los genes sintéticos de tal manera que el péptido resultante se dirige a un orgánulo vegetal, tal como el retículo endoplasmático o el apoplasto. Se conocen en la técnica secuencias peptídicas que se sabe que dan como resultado el direccionamiento de proteínas de fusión a orgánulos vegetales. Por ejemplo, se sabe en la técnica que la región N-terminal del gen de la fosfatasa ácida del altramuz blanco, *Lupinus albus* (GI ID de GENBANK®:14276838, Miller *et al.* (2001) Plant Physiology 127: 594-606) da como resultado el direccionamiento al retículo endoplasmático de proteínas heterólogas. Si la proteína de fusión resultante también contiene una secuencia de retención en retículo endoplasmático que comprende el péptido extremo N-terminal-lisina-ácido aspártico-ácido glutámico-leucina (es decir, el motivo "KDEL", SEQ ID NO:13) en el extremo C-terminal, la proteína de fusión se direccionará al retículo endoplasmático. Si la proteína de fusión carece de una secuencia de direccionamiento al retículo endoplasmático en el extremo C-terminal, la proteína se direccionará al retículo endoplasmático, pero en última instancia se verá secuestrada en el apoplasto.

Por tanto, este gen codifica para una proteína de fusión que contiene los treinta y un aminoácidos N-terminales del gen de la fosfatasa ácida del altramuz blanco, *Lupinus albus* (GI ID de GENBANK®:14276838, Miller *et al.*, 2001, citado anteriormente) fusionada al extremo N-terminal de la secuencia de aminoácidos de la invención, así como la secuencia KDEL en el extremo C-terminal. Por tanto, se predice que la proteína resultante se direcciona al retículo endoplasmático de la planta tras la expresión en una célula vegetal.

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

5 Ejemplo 10. Vectorización de genes para expresión en plantas

El ADN de región codificante de los genes de la invención se conecta operativamente con secuencias promotoras y terminadoras apropiadas para la expresión en plantas. Tales secuencias se conocen bien 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 35S del VMCo para la expresión en dicotiledóneas, y los terminadores nos o PinII. También se conocen bien en la técnica técnicas para producir y confirmar constructos promotor - gen - terminador.

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

Ejemplo 11. Transformación de células de maíz con los genes de proteínas pesticidas descritos en el presente documento

Se recogen de la mejora manera espigas de maíz 8-12 días después de la polinización. Se aíslan los embriones de las espigas y se prefieren aquellos embriones de 0,8-1,5 mm de tamaño para su uso en la transformación. Se siembran en placa los embriones con el escutelo hacia arriba en medios de incubación adecuados, tales como medios DN62A5S (sales N6 3,98 g/l; vitaminas N61 ml/l (disolución madre 1000x); L-asparagina 800 mg/l; mio-inositol 100 mg/l; L-prolina 1,4 g/l; casaminoácidos 100 mg/l; sacarosa 50 g/l; 2,4-D 1 ml/l (disolución madre 1 mg/ml)). Sin embargo, son adecuados y se conocen en la técnica medios y sales distintos de DN62A5S. Se incuban los embriones durante la noche a 25°C en la oscuridad. Sin embargo, no es necesario *per se* incubar los embriones durante la noche.

Se transfieren los explantes resultantes a cuadrados de malla (30-40 por placa), se transfieren sobre medios osmóticos durante aproximadamente 30-45 minutos, luego se transfieren a una placa de irradiación (véanse, por ejemplo, la publicación PCT n.º WO/0138514 y la patente estadounidense n.º 5.240.842).

Se aceleran constructos de ADN diseñados con los genes de la invención en células vegetales en tejido vegetal usando un acelerador de haz de aerosol, usando condiciones esencialmente tal como se describe en la publicación PCT n.º WO/0138514. Después de la irradiación, se incuban los embriones durante aproximadamente 30 min en medios osmóticos, y se ponen en medios de incubación durante la noche a 25°C en la oscuridad. Para evitar dañar indebidamente los explantes irradiados, se incuban durante al menos 24 horas antes de la transferencia a medios de recuperación. Entonces se extienden los embriones sobre medios de periodo de recuperación, durante aproximadamente 5 días, 25°C en la oscuridad, luego se transfieren a medios de selección. Se incuban los explantes en medios de selección durante hasta ocho semanas, dependiendo de la naturaleza y las características de la selección particular utilizada. Después del periodo de selección, se transfiere el callo resultante a medios de maduración de embriones, hasta que se observa la formación de embriones somáticos maduros. Entonces se ponen los embriones somáticos maduros resultantes con baja luz, y se inicia el proceso de regeneración mediante métodos conocidos en la técnica. Se permite que enraícen los brotes resultantes en medios de enraizado, y se transfieren las plantas resultantes a macetas de vivero y se propagan como plantas transgénicas.

Materiales

Medios DN62A5S

Componentes	Por litro	Fuente
Mezcla de sales basales N6 de Chu (n.º de prod. C 416)	3,98 g/l	Phytotechnology Labs
Disolución de vitaminas N6 de Chu (n.º de prod. C 149)	1 ml/l (de disolución madre 1000x)	Phytotechnology Labs
L-Asparagina	800 mg/l	Phytotechnology Labs
Mio-inositol	100 mg/l	Sigma
L-Prolina	1,4 g/l	Phytotechnology Labs
Casaminoácidos	100 mg/l	Fisher Scientific
Sacarosa	50 g/l	Phytotechnology Labs
2,4-D (n.º de prod. D-7299)	1 ml/l (de disolución madre 1 mg/ml)	Sigma

Se ajusta el pH de la disolución a pH 5,8 con KOH 1 N/KCl 1 N, se añade Gelrite (Sigma) a una concentración de hasta 3g/l, y se esterilizan en autoclave los medios. Después de enfriar hasta 50°C, se añaden 2 ml/l de una disolución madre 5 mg/ml de nitrato de plata (Phytotechnology Labs).

5 Ejemplo 12. Transformación de genes de la invención en células vegetales mediante transformación mediada por *Agrobacterium*

Se recogen de la mejor manera espigas de maíz 8-12 días después de la polinización. Se aíslan los embriones de las espigas y se prefieren aquellos embriones de 0,8-1,5 mm de tamaño para su uso en la transformación. Se siembran en placa los embriones con el escutelo hacia arriba en medios de incubación adecuados, y se incuban durante la noche a 25°C en la oscuridad Sin embargo, no es necesario *per se* incubar los embriones durante la noche. Se ponen en contacto los embriones con una cepa de *Agrobacterium* que contiene los vectores apropiados para la transferencia mediada por el plásmido Ti durante aproximadamente 5-10 min, y luego se siembran en placa sobre medios de cocultivo durante aproximadamente 3 días (25°C en la oscuridad). Después del cocultivo, se transfieren los explantes a medios de periodo de recuperación durante aproximadamente cinco días (a 25°C en la oscuridad). Se incuban los explantes en medios de selección durante hasta ocho semanas, dependiendo de la naturaleza y las características de la selección particular utilizada. Después del periodo de selección, se transfiere el callo resultante a medios de maduración de embriones, hasta que se observa la formación de embriones somáticos maduros. Entonces se ponen los embriones somáticos maduros resultantes con baja luz, y se inicia el proceso de regeneración tal como se conoce en la técnica.

20 Ejemplo 13. Protección de plantas transgénicas que expresan Axmi205 frente al daño de la raíz tras la infestación con gusano de la raíz del maíz

Se obtuvieron plantas de maíz transgénicas transformadas con cualquiera de dos versiones de Axmi205 (*Axmi205* (SEQ ID NO:1) o *Axmi205v01.03* (SEQ ID NO:10)) mediante transformación mediada por *Agrobacterium*. Se seleccionaron las plantas que mostraron mediante análisis por PCR que contenían el constructo de Axmi205 apropiado, y se transfirieron a recipientes guía de raíces.

25 Para plantas que contenían *Axmi205* o *Axmi205v01.03* se trasplantaron a recipientes guía de raíces y se propagaron durante aproximadamente tres semanas. Entonces se infestó cada planta individual con ~125 huevos del gusano de la raíz del maíz (*Diabrotica virgifera*) sin diapausa. Se observó que más del 90% de los huecos habían eclosionado en un plazo de 24 horas desde la infestación. Se analizaron las plantas para determinar la expresión de la proteína AXMI-205 mediante análisis de inmunotransferencia de tipo Western usando un anticuerpo anti-AXMI-205. Se seleccionaron las plantas que expresaron cantidades detectables de AXMI-205 para el análisis. Después de quince días, se evaluó la cantidad de daño de la raíz en cada planta usando la escala 1 de lesiones de nudos del Estado de Iowa (Oleson, J.D., Y. Park, T.M. Nowatzki, y J.J. Tollefson. 2005. J. Econ Entomol. 98(1): 1-8). La tabla 3 muestra que ambas formas de AXMI-205 dieron como resultado menor daño de la raíz que las plantas control infestadas de la misma manera. En experimentos similares, las plantas que contenían o bien *Axmi205v01.02* o bien *Axmi205v01.04* demostraron clasificaciones de raíces mejoradas en comparación con los controles no transformados (no mostrados).

Tabla 3. Daño de la raíz de maíz transgénico que expresa Axmi-205

Transgén	Número de plantas	Puntuación de raíz promedio	Varianza
Plantas de control (sin transgén)	35	2,44	0,23
Axmi205	16	1,11	0,5
Axmi205v01.03	12	0,81	0,43

40 Todas las publicaciones y solicitudes de patente mencionadas en la memoria descriptiva son indicativas del nivel de experiencia de los expertos en la técnica a la que pertenece esta invención. Todas las publicaciones y solicitudes de patente se incorporan al presente documento como referencia en la misma extensión que si se indicara específica e individualmente que se incorpora como referencia cada publicación o solicitud de patente individual.

Aunque se ha descrito la invención anterior en cierto detalle a modo de ilustración y ejemplo para los fines de claridad de comprensión, resultará obvio que pueden ponerse en práctica determinados cambios y modificaciones dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Lista de secuencias

- <110> Desai, Nalini
 Hinson, Jill
 Balusubramanian, Deepa
 5 Sampson, Kimberly S.
 Tomso, Daniel J.
 Lehtinen, Duane Alan
 Duck, Nicholas B.
- <120> GEN PESTICIDA AXMI-205 Y MÉTODOS PARA SU USO
- 10 <130> APA066US01
- <150> Documento 61/222.778
 <151> 02-07-2009
- <160> 15
- <170> PatentIn versión 3.5
- 15 <210> 1
 <211> 1608
 <212> ADN
 <213> *Chromobacterium* sp.
- <400> 1
- | | |
|--|------|
| atggcatccg cagcaaatgc aggtcagctt ggcaacctcc ccggcgttac ttccatgggc | 60 |
| atgggctatg acgtgaatgg tttgtacgcc agccccgaaa gcctgcttgg ccaacccttg | 120 |
| ttcgatttcg gcggcgagct ggacagcatc gaaatcgagg gccgcagcta cacctttccc | 180 |
| cgcagcatgc atgtacacac ctatttccat tccgacttca aacaggatgt cagcaaggaa | 240 |
| atcgaagagt atcgggagaa aatgagccag cacgtgggcy tgtccggccg ctacaagttg | 300 |
| ttcagcgctt cgctgagcgt ggatttcacc accacggacc agcaactgac cgagattacc | 360 |
| tacagctcca cccgcgaagc ccatgtgctg tggtagatca gcctgcctgg cgcggccacg | 420 |
| ctgcgttcga tgctgcgccg cgatttccgc gacgacctga acaaccccaa tatgccggcc | 480 |
| atggagctgt tcaagcgcta tgggtccctac tacatatcgg aagcggcggt gggcggccgg | 540 |
| ctggactaca gcgcggccag caagaccttg aagatggaca gcagccagtc gctgtccacc | 600 |
| accgccgaaa tgccttaciaa ggcgctggtg ggcgagatca agatcgagca tggctcggag | 660 |
| atggaaaagc aggtcaacag cttccgcagc aactccacca tccgtctcac cgccaccggc | 720 |
| ggcaagccgg gcatgaccga tcgcatactg cacggtccgg attcgcagca ggcgttctcg | 780 |
| caatgggcyg aatcgctgct cgactatgcy acgctgatgg acttttccac cgaaagcctg | 840 |
| caaccgatct gggcgctggc cgacaagccc gagcgccgcg tcgagcttga ggacgccttc | 900 |
| cccgaattca tgaagcagtc gcagcagtc atccccagg tggacaaggt gctgctgatg | 960 |
| gacgcgcggc cgcctatggt gaaggctggg gaggatagcy gctccggcgc gtcggaggat | 1020 |
| ctggctgtgt tcaatcccag cacctccaat ggctacaaga tggttggcca gttcggctcag | 1080 |

ES 2 609 332 T3

cgcaaccatg ccagcgtggc ggatggccat gcgccgattt tcaaggatct gttcgatctg 1140
 ggcgtgctga aggcgccggt gggttggcag cgggtgtggg acgacgccgg ctccggcaag 1200
 tccaaggact acgcgtgctg gcgcgcgatt ccgccgcagg gctaccgcgc gctgggcat 1260
 gtgatgatgc tggccaccag cggctataac ccgccgaatc tgccggacta tgtttgctg 1320
 catcaaagcc tgtgcgcgga tgtgcagacg ctgcaaaacc ggggtgtggtg ggacaagggc 1380
 accggcgcgc gcaaggatgt cagcctgtgg caaccgggagc cggccggcgc ggtggcgtcc 1440
 tcttgcttcg ccggcgtgcc taattacaac aaccgcccc attccggcga catcgagcgc 1500
 ttgcgcgga gcatcgcgctg cgtgaagacc agcgcgatcg cgtccatgca ggaaatgaag 1560
 tccatgctca gccagcacca aggcattgaa gcgatgatgt ccaagctg 1608

<210> 2

<211> 536

<212> PRT

5 <213> *Chromobacterium* sp.

<400> 2

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

ES 2 609 332 T3

Ser Lys Asp Tyr Ala Cys Trp Arg Ala Ile Pro Pro Gln Gly Tyr Arg
 405 410 415

Ala Leu Gly Asp Val Met Met Leu Ala Thr Ser Gly Tyr Asn Pro Pro
 420 425 430

Asn Leu Pro Asp Tyr Val Cys Val His Gln Ser Leu Cys Ala Asp Val
 435 440 445

Gln Thr Leu Gln Asn Arg Val Trp Trp Asp Lys Gly Thr Gly Ala Arg
 450 455 460

Lys Asp Val Ser Leu Trp Gln Pro Gly Ala Ala Gly Ala Val Ala Ser
 465 470 475 480

Ser Cys Phe Ala Gly Val Pro Asn Tyr Asn Asn Pro Pro Asn Ser Gly
 485 490 495

Asp Ile Glu Arg Leu Arg Gly Ser Ile Ala Cys Val Lys Thr Ser Ala
 500 505 510

Ile Ala Ser Met Gln Glu Met Lys Ser Met Leu Ser Gln His Gln Gly
 515 520 525

Met Glu Ala Met Met Ser Lys Leu
 530 535

<210> 3

<211> 518

<212> PRT

5 <213> *Chromobacterium* sp.

<400> 3

Met Gly Met Gly Tyr Asp Val Asn Gly Leu Tyr Ala Ser Pro Glu Ser
 1 5 10 15

Leu Leu Gly Gln Pro Leu Phe Asp Phe Gly Gly Glu Leu Asp Ser Ile
 20 25 30

Glu Ile Glu Gly Arg Ser Tyr Thr Phe Pro Arg Ser Met His Val His
 35 40 45

Thr Tyr Phe His Ser Asp Phe Lys Gln Asp Val Ser Lys Glu Ile Glu
 50 55 60

Glu Tyr Arg Glu Lys Met Ser Gln His Val Gly Val Ser Gly Arg Tyr
 65 70 75 80

ES 2 609 332 T3

Lys Leu Phe Ser Ala Ser Leu Ser Val Asp Phe Thr Thr Thr Asp Gln
 85 90 95
 Gln Leu Thr Glu Ile Thr Tyr Ser Ser Thr Arg Glu Ala His Val Leu
 100 105 110
 Trp Tyr Ile Ser Leu Pro Gly Ala Ala Thr Leu Arg Ser Met Leu Arg
 115 120 125
 Arg Asp Phe Arg Asp Asp Leu Asn Asn Pro Asn Met Pro Ala Met Glu
 130 135 140
 Leu Phe Lys Arg Tyr Gly Pro Tyr Tyr Ile Ser Glu Ala Ala Val Gly
 145 150 155 160
 Gly Arg Leu Asp Tyr Ser Ala Ala Ser Lys Thr Leu Lys Met Asp Ser
 165 170 175
 Ser Gln Ser Leu Ser Thr Thr Ala Glu Met Ser Tyr Lys Ala Leu Val
 180 185 190
 Gly Glu Ile Lys Ile Glu His Gly Ser Glu Met Glu Lys Gln Val Asn
 195 200 205
 Ser Phe Arg Ser Asn Ser Thr Ile Arg Leu Thr Ala Thr Gly Gly Lys
 210 215 220
 Pro Gly Met Thr Asp Arg Ile Leu His Gly Pro Asp Ser Gln Gln Ala
 225 230 235 240
 Phe Ser Gln Trp Ala Glu Ser Leu Leu Asp Tyr Ala Thr Leu Met Asp
 245 250 255
 Phe Ser Thr Glu Ser Leu Gln Pro Ile Trp Ala Leu Ala Asp Lys Pro
 260 265 270
 Glu Arg Arg Val Glu Leu Glu Asp Ala Phe Pro Glu Phe Met Lys Gln
 275 280 285
 Ser Gln Gln Ser Ile Pro Lys Val Asp Lys Val Leu Leu Met Asp Ala
 290 295 300
 Arg Pro Pro Met Val Lys Ala Gly Glu Asp Ser Gly Ser Gly Ala Ser
 305 310 315 320
 Glu Asp Leu Ala Val Phe Asn Pro Ser Thr Ser Asn Gly Tyr Lys Met
 325 330 335

ES 2 609 332 T3

Val Gly Gln Phe Gly Gln Arg Asn His Ala Ser Val Ala Asp Gly His
 340 345 350
 Ala Pro Ile Phe Lys Asp Leu Phe Asp Leu Gly Val Leu Lys Ala Pro
 355 360 365
 Val Gly Trp Gln Arg Val Trp Asp Asp Ala Gly Ser Gly Lys Ser Lys
 370 375 380
 Asp Tyr Ala Cys Trp Arg Ala Ile Pro Pro Gln Gly Tyr Arg Ala Leu
 385 390 400
 Gly Asp Val Met Met Leu Ala Thr Ser Gly Tyr Asn Pro Pro Asn Leu
 405 410 415
 Pro Asp Tyr Val Cys Val His Gln Ser Leu Cys Ala Asp Val Gln Thr
 420 425 430
 Leu Gln Asn Arg Val Trp Trp Asp Lys Gly Thr Gly Ala Arg Lys Asp
 435 440 445
 Val Ser Leu Trp Gln Pro Gly Ala Ala Gly Ala Val Ala Ser Ser Cys
 450 455 460
 Phe Ala Gly Val Pro Asn Tyr Asn Asn Pro Pro Asn Ser Gly Asp Ile
 465 470 475 480
 Glu Arg Leu Arg Gly Ser Ile Ala Cys Val Lys Thr Ser Ala Ile Ala
 485 490 495
 Ser Met Gln Glu Met Lys Ser Met Leu Ser Gln His Gln Gly Met Glu
 500 505 510
 Ala Met Met Ser Lys Leu
 515

<210> 4

<211> 516

<212> PRT

5 <213> *Chromobacterium* sp.

<400> 4

Met Gly Tyr Asp Val Asn Gly Leu Tyr Ala Ser Pro Glu Ser Leu Leu
 1 5 10 15
 Gly Gln Pro Leu Phe Asp Phe Gly Gly Glu Leu Asp Ser Ile Glu Ile
 20 25 30

ES 2 609 332 T3

Glu Gly Arg Ser Tyr Thr Phe Pro Arg Ser Met His Val His Thr Tyr
 35 40 45
 Phe His Ser Asp Phe Lys Gln Asp Val Ser Lys Glu Ile Glu Glu Tyr
 50 55 60
 Arg Glu Lys Met Ser Gln His Val Gly Val Ser Gly Arg Tyr Lys Leu
 65 70 75 80
 Phe Ser Ala Ser Leu Ser Val Asp Phe Thr Thr Thr Asp Gln Gln Leu
 85 90 95
 Thr Glu Ile Thr Tyr Ser Ser Thr Arg Glu Ala His Val Leu Trp Tyr
 100 105 110
 Ile Ser Leu Pro Gly Ala Ala Thr Leu Arg Ser Met Leu Arg Arg Asp
 115 120 125
 Phe Arg Asp Asp Leu Asn Asn Pro Asn Met Pro Ala Met Glu Leu Phe
 130 135 140
 Lys Arg Tyr Gly Pro Tyr Tyr Ile Ser Glu Ala Ala Val Gly Gly Arg
 145 150 155 160
 Leu Asp Tyr Ser Ala Ala Ser Lys Thr Leu Lys Met Asp Ser Ser Gln
 165 170 175
 Ser Leu Ser Thr Thr Ala Glu Met Ser Tyr Lys Ala Leu Val Gly Glu
 180 185 190
 Ile Lys Ile Glu His Gly Ser Glu Met Glu Lys Gln Val Asn Ser Phe
 195 200 205
 Arg Ser Asn Ser Thr Ile Arg Leu Thr Ala Thr Gly Gly Lys Pro Gly
 210 215 220
 Met Thr Asp Arg Ile Leu His Gly Pro Asp Ser Gln Gln Ala Phe Ser
 225 230 235 240
 Gln Trp Ala Glu Ser Leu Leu Asp Tyr Ala Thr Leu Met Asp Phe Ser
 245 250 255
 Thr Glu Ser Leu Gln Pro Ile Trp Ala Leu Ala Asp Lys Pro Glu Arg
 260 265 270
 Arg Val Glu Leu Glu Asp Ala Phe Pro Glu Phe Met Lys Gln Ser Gln
 275 280 285

ES 2 609 332 T3

Gln Ser Ile Pro Lys Val Asp Lys Val Leu Leu Met Asp Ala Arg Pro
 290 295 300

Pro Met Val Lys Ala Gly Glu Asp Ser Gly Ser Gly Ala Ser Glu Asp
 305 310 315 320

Leu Ala Val Phe Asn Pro Ser Thr Ser Asn Gly Tyr Lys Met Val Gly
 325 330 335

Gln Phe Gly Gln Arg Asn His Ala Ser Val Ala Asp Gly His Ala Pro
 340 345 350

Ile Phe Lys Asp Leu Phe Asp Leu Gly Val Leu Lys Ala Pro Val Gly
 355 360 365

Trp Gln Arg Val Trp Asp Asp Ala Gly Ser Gly Lys Ser Lys Asp Tyr
 370 375 380

Ala Cys Trp Arg Ala Ile Pro Pro Gln Gly Tyr Arg Ala Leu Gly Asp
 385 390 395 400

Val Met Met Leu Ala Thr Ser Gly Tyr Asn Pro Pro Asn Leu Pro Asp
 405 410 415

Tyr Val Cys Val His Gln Ser Leu Cys Ala Asp Val Gln Thr Leu Gln
 420 425 430

Asn Arg Val Trp Trp Asp Lys Gly Thr Gly Ala Arg Lys Asp Val Ser
 435 440 445

Leu Trp Gln Pro Gly Ala Ala Gly Ala Val Ala Ser Ser Cys Phe Ala
 450 455 460

Gly Val Pro Asn Tyr Asn Asn Pro Pro Asn Ser Gly Asp Ile Glu Arg
 465 470 475 480

Leu Arg Gly Ser Ile Ala Cys Val Lys Thr Ser Ala Ile Ala Ser Met
 485 490 495

Gln Glu Met Lys Ser Met Leu Ser Gln His Gln Gly Met Glu Ala Met
 500 505 510

Met Ser Lys Leu
 515

<210> 5

<211> 536

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> AXMI-205(evo24)

ES 2 609 332 T3

<400> 5

Met Ala Ser Ala Ala Asn Ala Gly Gln Leu Gly Asn Leu Pro Gly Val
 1 5 10 15

Thr Ser Met Gly Met Gly Tyr Asp Val Asn Gly Leu Tyr Ala Ser Pro
 20 25 30

Glu Ser Leu Leu Gly Gln Pro Leu Phe Asp Phe Gly Gly Glu Leu Asp
 35 40 45

Ser Ile Glu Ile Glu Gly Arg Ser Tyr Thr Phe Pro Arg Ser Met His
 50 55 60

Val His Thr Tyr Phe His Ser Asp Phe Lys Gln Asp Val Ser Lys Glu
 65 70 75 80

Ile Glu Glu Tyr Arg Glu Lys Met Ser Gln His Val Gly Val Ser Gly
 85 90 95

Arg Tyr Lys Leu Phe Ser Ala Ser Leu Ser Val Asp Phe Thr Thr Thr
 100 105 110

Asp Gln Gln Leu Thr Glu Ile Thr Tyr Ser Ser Thr Arg Glu Ala His
 115 120 125

Val Leu Trp Tyr Ile Ser Leu Pro Gly Ala Ala Thr Leu Arg Ser Met
 130 135 140

Leu Arg Arg Asp Phe Arg Asp Asp Leu Asn Asn Pro Asn Met Pro Ala
 145 150 155 160

Met Glu Leu Phe Lys Arg Tyr Gly Pro Tyr Tyr Ile Ser Glu Ala Ala
 165 170 175

Val Gly Gly Arg Leu Asp Tyr Ser Ala Ala Ser Lys Thr Leu Lys Met
 180 185 190

Asp Ser Ser Gln Ser Leu Ser Thr Thr Ala Glu Met Ser Tyr Lys Ala
 195 200 205

Leu Val Gly Glu Ile Lys Ile Glu His Gly Ser Glu Met Glu Lys Gln
 210 215 220

ES 2 609 332 T3

Val Asn Ser Phe Arg Ser Asn Ser Thr Ile Arg Leu Thr Ala Thr Gly
 225 230 235 240

Gly Lys Pro Gly Met Thr Asp Arg Ile Leu His Gly Pro Asp Ser Gln
 245 250 255

Gln Ala Phe Ser Gln Trp Ala Glu Ser Leu Leu Asp Tyr Ala Thr Leu
 260 265 270

Met Asp Phe Ser Thr Glu Ser Leu Gln Pro Ile Trp Ala Leu Ala Asp
 275 280 285

Lys Pro Glu Arg Arg Val Glu Leu Glu Asp Ala Phe Pro Glu Phe Met
 290 295 300

Lys Gln Ser Gln Gln Ser Ile Pro Lys Val Asp Lys Val Leu Leu Met
 305 310 315 320

Asp Ala Arg Pro Pro Met Val Lys Ala Gly Glu Asp Ser Gly Ser Gly
 325 330 335

Ala Ser Glu Asp Leu Ala Val Phe Asn Pro Ser Thr Ser Asn Gly Tyr
 340 345 350

Lys Met Val Gly Gln Phe Gly Gln Arg Asn His Ala Ser Val Ala Asp
 355 360 365

Gly His Ala Pro Ile Phe Lys Asp Leu Phe Asp Leu Gly Val Leu Lys
 370 375 380

Ala Pro Val Gly Trp Gln Arg Val Trp Asp Asp Ala Gly Ser Gly Lys
 385 390 395 400

Ser Lys Asp Tyr Ala Cys Trp Arg Ala Ile Pro Pro Gln Gly Tyr Arg
 405 410 415

Ala Leu Gly Asp Val Met Met Leu Ala Thr Ser Gly Tyr Asn Pro Pro
 420 425 430

Asn Leu Pro Asp Tyr Val Cys Val His Gln Ser Leu Cys Ala Asp Val
 435 440 445

Gln Thr Leu Gln Asn Arg Val Trp Trp Asp Lys Gly Thr Gly Ala Arg
 450 455 460

Lys Asp Val Ser Leu Trp Gln Pro Gly Ala Ala Gly Ala Val Ala Ser

ES 2 609 332 T3

Leu Arg Arg Asp Phe Arg Asp Asp Leu Asn Asn Pro Asn Met Pro Ala
 145 150 155 160
 Met Glu Leu Phe Lys Arg Tyr Gly Pro Tyr Tyr Ile Ser Glu Ala Ala
 165 170 175
 Val Gly Gly Arg Leu Asp Tyr Ser Ala Ala Ser Lys Thr Leu Lys Met
 180 185 190
 Asp Ser Ser Gln Ser Leu Ser Thr Thr Ala Glu Met Ser Tyr Lys Ala
 195 200 205
 Leu Val Gly Glu Ile Lys Ile Glu His Gly Ser Glu Met Glu Lys Gln
 210 215 220
 Val Asn Ser Phe Arg Ser Asn Ser Thr Ile Arg Leu Thr Ala Thr Gly
 225 230 235 240
 Gly Lys Pro Gly Met Thr Asp Arg Ile Leu His Gly Pro Asp Ser Gln
 245 250 255
 Gln Ala Phe Ser Gln Trp Ala Glu Ser Leu Leu Asp Tyr Ala Thr Leu
 260 265 270
 Met Asp Phe Ser Thr Glu Ser Leu Gln Pro Ile Trp Ala Leu Ala Asp
 275 280 285
 Lys Pro Glu Arg Arg Val Glu Leu Glu Asp Ala Phe Pro Glu Phe Met
 290 295 300
 Lys Gln Ser Gln Gln Ser Ile Pro Lys Val Asp Lys Val Leu Leu Met
 305 310 315 320
 Asp Ala Arg Pro Pro Met Val Lys Ala Gly Glu Asp Ser Gly Ser Gly
 325 330 335
 Ala Ser Glu Asp Leu Ala Val Phe Asn Pro Ser Thr Ser Asn Gly Tyr
 340 345 350
 Lys Met Val Gly Gln Phe Gly Gln Arg Asn His Ala Ser Val Ala Asp
 355 360 365
 Gly His Ala Pro Ile Phe Lys Asp Leu Phe Asp Leu Gly Val Leu Lys
 370 375 380
 Ala Pro Val Gly Trp Gln Arg Val Trp Asp Asp Ala Gly Ser Gly Lys

ES 2 609 332 T3

Val His Thr Tyr Phe His Ser Asp Phe Lys Gln Asp Val Ser Lys Glu
 65 70 75 80
 Ile Glu Glu Tyr Arg Glu Lys Met Ser Gln His Val Gly Val Ser Gly
 85 90 95
 Arg Tyr Lys Leu Phe Ser Ala Ser Leu Ser Val Asp Phe Thr Thr Thr
 100 105 110
 Asp Gln Gln Leu Thr Glu Ile Thr Tyr Ser Ser Thr Arg Glu Ala His
 115 120 125
 Val Leu Trp Tyr Ile Ser Leu Pro Gly Ala Ala Thr Leu Arg Ser Met
 130 135 140
 Leu Arg Arg Asp Phe Arg Asp Asp Leu Asn Asn Pro Asn Met Pro Ala
 145 150 155 160
 Met Glu Leu Phe Lys Arg Tyr Gly Pro Tyr Tyr Ile Ser Glu Ala Ala
 165 170 175
 Val Gly Gly Arg Leu Asp Tyr Ser Ala Ala Ser Lys Thr Leu Lys Met
 180 185 190
 Asp Ser Ser Gln Ser Leu Ser Thr Thr Ala Glu Met Ser Tyr Lys Ala
 195 200 205
 Leu Val Gly Glu Ile Lys Ile Glu His Gly Ser Glu Met Glu Lys Gln
 210 215 220
 Val Asn Ser Phe Arg Ser Asn Ser Thr Ile Arg Leu Thr Ala Thr Gly
 225 230 235 240
 Gly Lys Pro Gly Met Thr Asp Arg Ile Leu His Gly Pro Asp Ser Gln
 245 250 255
 Gln Ala Phe Ser Gln Trp Ala Glu Ser Leu Leu Asp Tyr Ala Thr Leu
 260 265 270
 Met Asp Phe Ser Thr Glu Ser Leu Gln Pro Ile Trp Ala Leu Ala Asp
 275 280 285
 Lys Pro Glu Arg Arg Val Glu Leu Glu Asp Ala Phe Pro Glu Phe Met
 290 295 300
 Lys Gln Ser Gln Gln Ser Ile Pro Lys Val Asp Lys Val Leu Leu Met

ES 2 609 332 T3

Met Ala Ser Ala Ala Asn Ala Gly Gln Leu Gly Asn Leu Pro Gly Val
1 5 10 15

Thr Ser Met Gly Met Gly Tyr Asp Val Asn Gly Leu Tyr Ala Ser Pro
20 25 30

Glu Ser Leu Leu Gly Gln Pro Leu Phe Asp Phe Gly Gly Glu Leu Asp
35 40 45

Ser Ile Glu Ile Glu Gly Arg Ser Tyr Thr Phe Pro Arg Ser Met His
50 55 60

Val His Thr Tyr Phe His Ser Asp Phe Lys Gln Asp Val Ser Lys Glu
65 70 75 80

Ile Glu Glu Tyr Arg Glu Lys Met Ser Gln His Val Gly Val Ser Gly
85 90 95

Arg Tyr Lys Leu Phe Ser Ala Ser Leu Ser Val Asp Phe Thr Thr Thr
100 105 110

Asp Gln Gln Leu Thr Glu Ile Thr Tyr Ser Ser Thr Arg Glu Ala His
115 120 125

Val Leu Trp Tyr Ile Ser Leu Pro Gly Ala Ala Thr Leu Arg Ser Met
130 135 140

Leu Arg Arg Asp Phe Arg Asp Asp Leu Asn Asn Pro Asn Met Pro Ala
145 150 155 160

Met Glu Leu Phe Lys Arg Tyr Gly Pro Tyr Tyr Ile Ser Glu Ala Ala
165 170 175

Val Gly Gly Arg Leu Asp Tyr Ser Ala Ala Ser Lys Thr Leu Lys Met
180 185 190

Asp Ser Ser Gln Ser Leu Ser Thr Thr Ala Glu Met Ser Tyr Lys Ala
195 200 205

Leu Val Gly Glu Ile Lys Ile Glu His Gly Ser Glu Met Glu Lys Gln
210 215 220

Val Asn Ser Phe Arg Ser Asn Ser Thr Ile Arg Leu Thr Ala Thr Gly
225 230 235 240

Gly Lys Pro Gly Met Thr Asp Arg Ile Leu His Gly Pro Asp Ser Gln

ES 2 609 332 T3

				245					250					255			
Gln	Ala	Phe	Ser 260	Gln	Trp	Ala	Glu	Ser 265	Leu	Leu	Asp	Tyr	Ala 270	Thr	Leu		
Met	Asp	Phe 275	Ser	Thr	Glu	Ser	Leu 280	Gln	Pro	Ile	Trp	Ala 285	Leu	Ala	Asp		
Lys	Pro 290	Glu	Arg	Arg	Val	Glu 295	Leu	Glu	Asp	Ala	Phe 300	Pro	Glu	Phe	Met		
Lys 305	Gln	Ser	Gln	Gln	Ser 310	Ile	Pro	Lys	Val	Asp 315	Lys	Val	Leu	Leu	Met		
Asp	Ala	Arg	Pro	Pro 325	Met	Val	Lys	Ala	Gly 330	Glu	Asp	Ser	Gly	Ser 335	Gly		
Ala	Ser	Glu	Asp 340	Leu	Ala	Val	Phe	Asn 345	Pro	Ser	Thr	Ser	Asn 350	Gly	Tyr		
Lys	Met	Val 355	Gly	Gln	Phe	Gly	Gln 360	Arg	Asn	His	Ala	Ser 365	Val	Ala	Asp		
Gly	His 370	Ala	Pro	Ile	Phe	Lys 375	Asp	Leu	Phe	Asp	Leu 380	Gly	Val	Leu	Lys		
Ala 385	Pro	Val	Gly	Trp	Gln 390	Arg	Val	Trp	Asp	Asp 395	Ala	Gly	Ser	Gly	Lys 400		
Ser	Lys	Asp	Tyr	Ala 405	Cys	Trp	Arg	Ala	Ile 410	Pro	Pro	Gln	Gly	Tyr 415	Arg		
Ala	Leu	Gly	Asp 420	Val	Met	Met	Leu	Ala 425	Thr	Ser	Gly	Tyr	Asn 430	Pro	Pro		
Asn	Leu	Pro 435	Asp	Tyr	Val	Cys	Val 440	His	Gln	Ser	Leu	Cys 445	Ala	Asp	Val		
Gln	Thr 450	Leu	Gln	Asn	Arg	Val 455	Trp	Trp	Asp	Lys	Gly 460	Thr	Gly	Ala	Arg		
Lys 465	Asp	Val	Ser	Leu	Trp 470	Gln	Pro	Gly	Ala	Ala 475	Gly	Ala	Val	Ala	Ser 480		
Ser	Cys	Phe	Ala	Gly 485	Val	Pro	Asn	Tyr	Asn 490	Asn	Pro	Pro	Asn	Ser 495	Gly		
Asp	Ile	Glu	Arg 500	Leu	Arg	Gly	Ser	Ile 505	Ala	Cys	Val	Lys	Thr 510	Ser	Ala		
Ile	Ala	Ser 515	Met														

ES 2 609 332 T3

<210> 9
 <211> 1608
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> secuencia sintética que codifica para AXMI-205

<400> 9

atggcctccg	ccgccaatgc	tggccagctg	ggcaacctcc	ccggcgtcac	ctccatgggc	60
atgggatatg	atgtcaatgg	cctctatgct	tctccagaga	gcttgctggg	gcagccgctc	120
tttgattttg	gaggagagct	ggacagcatc	gagatagaag	gaagaagcta	caccttccca	180
agaagcatgc	atgttcacac	ctacttccat	tcagatttca	agcaagatgt	cagcaaggag	240
atcgaggagt	acagggagaa	gatgagccag	catgttggag	tttctggaag	atacaagctc	300
ttctccgcct	ccctctccgt	ggacttcacc	accactgatc	agcagctgac	agagatcacc	360
tacagctcaa	caagagaagc	tcattgttct	tggtacatct	ccctccccgg	cgcggccacc	420
ttgaggagca	tgctgcgccg	cgacttcaga	gatgatctca	acaaccccaa	catgccggcc	480
atggagctct	tcaagagata	tggcccctac	tacatctcag	aagctgctgt	tggaggaagg	540
ctggactaca	gcgccgccag	caagaccttg	aagatggaca	gcagccaaag	cctctccacc	600
accgccgaga	tgagctacaa	ggcgctggtg	ggagagatca	agattgagca	tggatcagag	660
atggagaagc	aggtgaacag	cttcagaagc	aacagcacca	tcaggctcac	cgccactgga	720
ggaaagccag	ggatgacaga	caggattctt	catggacctg	acagccagca	ggccttctcc	780
caatgggagg	agagcttgct	ggattatgcc	accttgatgg	acttctcaac	agaaagcctc	840
cagcccatct	ggcgctcgc	cgacaagcca	gaaagaaggg	tggagctgga	ggatgccttc	900
cctgagttca	tgaagcaaag	tcagcagagc	atccccaaag	tggacaaggt	gctgctgatg	960
gatgcaaggc	cgccgatggt	gaaggctgga	gaagattctg	gatctggagc	ttcagaagat	1020
cttgctgtgt	tcaaccctc	caccagcaat	ggctacaaga	tgggtggcca	gtttggccaa	1080
aggaaccatg	cttctgttgc	tgatggccat	gctcccatct	tcaaggacct	cttcgacctc	1140
ggcgtgctga	aggctcctgt	tggatggcag	cgcgtctggg	atgatgctgg	atcagggag	1200
agcaaggatt	atgcttgctg	gagggccatc	cctcctcaag	gctacagagc	tcttgagat	1260
gtcatgatgc	tggccacctc	aggctacaac	cctccaaatc	ttccagatta	tgtttgtgtt	1320
catcaaagcc	tctgtgctga	tgttcaaacc	ctccagaaca	gggtttggtg	ggacaaagga	1380
actggagcaa	ggaaggatgt	cagcttgtgg	cagcctggag	ctgctggagc	tgtagcaagc	1440
agctgctttg	ctggagttcc	aaactacaac	aaccctccaa	actcaggaga	cattgagagg	1500
ctgagaggaa	gcattgcctg	cgtcaagacc	tccgccattg	cttccatgca	agagatgaag	1560
agcatgctct	cccagcatca	agggatggag	gccatgatga	gcaagctg		1608

10 <210> 10
 <211> 1608
 <212> ADN

ES 2 609 332 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia sintética que codifica para AXMI-205

<400> 10

	atggcctctg	ctgccaacgc	tggacaactc	ggcaacctac	caggtgtgac	ttccatgggc	60
	atgggatacg	acgtaaattg	cctttatgct	tctcctgaga	gcttgctggg	gcagccgctc	120
	tttgattttg	gaggagagct	ggacagcatc	gagatagaag	gaagaagcta	caccttccca	180
	agaagcatgc	atgttcacac	ctacttccat	tcagatttca	agcaagatgt	cagcaaggag	240
	atcgaggagt	acagggagaa	gatgagccag	catgttggag	tttctggaag	atacaagctc	300
	ttctccgcct	ccctctccgt	ggacttcacc	accactgatc	agcagctgac	agagatcacc	360
	tacagctcaa	caagagaagc	tcatgttctc	tggtacatct	ccctccccgg	cgcgccacc	420
	ttgaggagca	tgctgcgccg	cgacttcaga	gatgatctca	acaaccccaa	catgccggcc	480
	atggagctct	tcaagagata	tggcccctac	tacatctcag	aagctgctgt	tggaggaagg	540
	ctggactaca	gcgcccgcag	caagaccttg	aagatggaca	gcagccaaag	cctctccacc	600
	accgccgaga	tgagctacaa	ggcgtggtg	ggagagatca	agattgagca	tggatcagag	660
	atggagaagc	aggtgaacag	cttcagaagc	aacagcacca	tcaggctcac	cgccactgga	720
	ggaaagccag	ggatgacaga	caggattctt	catggacctg	acagccagca	ggccttctcc	780
	caatgggicg	agagcttgct	ggattatgcc	accttgatgg	acttctcaac	agaaagcctc	840
	cagcccatct	gggcgctcgc	cgacaagcca	gaaagaagg	tggagctgga	ggatgccttc	900
	cctgagttca	tgaagcaaag	tcagcagagc	atccccaaag	tggacaaggt	gctgctgatg	960
	gatgcaaggc	cgccgatggt	gaaggctgga	gaagattctg	gatctggagc	tcagaagat	1020
	cttgctgtgt	tcaaccctc	caccagcaat	ggctacaaga	tggaggccca	gtttgccaa	1080
	aggaaccatg	cttctgttgc	tgatggccat	gctcccatct	tcaaggacct	cttcgacctc	1140
	ggcgtgctga	aggctcctgt	tggatggcag	cgcgtctggg	atgatgctgg	atcagggag	1200
	agcaaggatt	atgcttgctg	gagggccatc	cctcctcaag	gctacagagc	tcttgagat	1260
	gtcatgatgc	tggccacctc	aggctacaac	cctccaaatc	ttccagatta	tgtttgtgtt	1320
5	catcaaagcc	tctgtgctga	tgttcaaacc	ctccaagaaca	gggtttggtg	ggacaaagga	1380
	actggagcaa	ggaaggatgt	cagcttgtgg	cagcctggag	ctgctggagc	tgtagcaagc	1440
	agctgctttg	ctggagttcc	aaactacaac	aaccctccaa	actcaggaga	cattgagagg	1500
	ctgagaggaa	gcattgcctg	cgtcaagacc	tccgccattg	cttccatgca	agagatgaag	1560
	agcatgctct	cccagcatca	agggatggag	gccatgatga	gcaagctg		1608

<210> 11

<211> 1608

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 609 332 T3

<223> secuencia sintética que codifica para AXMI-205

<400> 11

atggcgagtg ctgccaacgc cgggcagctg ggaaacctgc cggcgctgac cagcatgggg	60
atgggatatg atgtgaacgg gctctatgcg agcccggaga gcttgctggg gcagccgctc	120
tttgattttg gaggagagct ggacagcatc gagatagaag gaagaagcta caccttccca	180
agaagcatgc atgttcacac ctacttccat tcagatttca agcaagatgt cagcaaggag	240
atcgaggagt acagggagaa gatgagccag catgttggag tttctggaag atacaagctc	300
ttctccgcct ccctctccgt ggacttcacc accactgatc agcagctgac agagatcacc	360
tacagctcaa caagagaagc tcatgtttctc tggtacatct ccctccccgg cgcggccacc	420
ttgaggagca tgctgcgccg cgacttcaga gatgatctca acaaccccaa catgccggcc	480
atggagctct tcaagagata tggcccctac tacatctcag aagctgctgt tggaggaagg	540
ctggactaca gcgccgccag caagaccttg aagatggaca gcagccaaag cctctccacc	600
accgccgaga tgagctaaa ggcgctggtg ggagagatca agattgagca tggatcagag	660
atggagaagc aggtgaacag cttcagaagc aacagcacca tcaggctcac cgccactgga	720
ggaaagccag ggatgacaga caggattctt catggacctg acagccagca ggccttctcc	780
caatgggagg agagcttgct ggattatgcc accttgatgg acttctcaac agaaagcctc	840
cagcccatct gggcgctcgc cgacaagcca gaaagaaggg tggagctgga ggatgccttc	900
cctgagttca tgaagcaaag tcagcagagc atccccaaagg tggacaaggt gctgctgatg	960
gatgcaaggc cgccgatggt gaaggctgga gaagattctg gatctggagc ttcagaagat	1020
cttgctgtgt tcaaccctc caccagcaat ggctacaaga tgggtgggcca gtttggccaa	1080
aggaaccatg cttctgttgc tgatggccat gctcccatct tcaaggacct cttcgacctc	1140
ggcgtgctga aggctcctgt tggatggcag cgcgtctggg atgatgctgg atcagggag	1200
agcaaggatt atgcttgctg gagggccatc cctcctcaag gctacagagc tcttgagat	1260
gtcatgatgc tggccacctc aggctacaac cctccaaatc ttccagatta tgtttgtgtt	1320
catcaaagcc tctgtgctga tgttcaaacc ctccagaaca gggtttggtg ggacaaagga	1380
actggagcaa ggaaggatgt cagcttgtgg cagcctggag ctgctggagc tgtagcaagc	1440
agctgctttg ctggagttcc aaactacaac aaccctccaa actcaggaga cattgagagg	1500
ctgagaggaa gcattgcctg cgtcaagacc tccgccattg cttccatgca agagatgaag	1560
agcatgctct cccagcatca agggatggag gccatgatga gcaagctg	1608

5 <210> 12
 <211> 6403
 <212> ADN
 <213> *Chromobacterium* sp.

10 <220>
 <221> CDS
 <222> (1352)..(2959)

ES 2 609 332 T3

<400> 12

caccgcgcgc	tgaccgtggg	ccgggatctg	gacatgggcg	ggctggatta	cgctctgctg	60
gaagcgaggg	ggccgcagca	atggccgttg	cgctgctggcc	agacagaggg	ccaggcgagg	120
cgctacgtcg	acggcgtctt	cgccaccgac	gacggcaagg	cgcgtttcca	cgcgatcgat	180
taccggcctc	cggcggacaa	gatatcggcc	cactatccgt	tccgattgat	caccggccgt	240
ctgcgcgatc	aatggcacgg	catgagccgc	accgggcgcg	tgcccggcct	gttttcccac	300
agtccggagc	cggagctgcg	catgcatccg	gaagacgccg	agcggaggag	tctgcgcgac	360
ggcgatctgg	tccgcgtcgc	cagcaagcgc	gggctgtggg	tggtgccgct	gaagaccgac	420
ggcgatctga	cgcggggttg	cgtgttcgcc	gccatgcatt	ggagtcggca	gttcctcagc	480
agcggcggca	gcaacgaagc	aaccacctcg	gcggtcgacg	gattgtcgtt	ccagccggaa	540
ctcaagcacg	cggcgggtgaa	ggtggaaaag	gctgagctgc	cctggagggt	gctggcccg	600
ttgcgccatc	cggatttgtc	ggccttgca	gcggaattga	cgccgctggt	ggggaatatg	660
gcctatgcgg	cgatctcgct	ggcggcggga	aatgtcttgc	tggtgcgcgc	tgccgattcc	720
gctgccaggc	cggattggct	ggcgcgcttg	ctggacgcgc	tggcgctgcg	cccgggaccg	780
gatgcgctgg	agtaccgcga	cgacgggcga	ggcgtgctca	agcgcgtggc	ctggaatggc	840
gaccggctgg	cgggattggt	tttcgccggc	ggcgggcagg	cggaccgcga	cgcgggcgaa	900
agcttgctgc	aacggctgct	ggatggccag	ccatggctgg	ggccgcggca	tgccgcgttt	960
tctcccggcg	ggacgcgcgc	cgccaagcgg	gaccgcatcg	tgtgtcaatg	caagcaggtg	1020
ggcgaggccg	ccatthttgga	caggctgcgg	caggggcagg	acttggcgga	gttgaaggcc	1080
gagttggggg	gcggcgccgt	ctgcggttcc	tgcgcgccgg	agctggcgcg	aatggccgcc	1140
aacactgcgc	aaaacgtttg	agcgggcatg	cgcggtgga	tggcgcgttt	caaggatcga	1200
gaggcggatg	gccgtcgcgc	cttgttccag	cgcaaacgag	ttccgtaatt	ttactgatcg	1260

ES 2 609 332 T3

gaggaccagc ggcattggccg tgggatgggc gctatatatc tagcggcggtt gtgaaaatgc 1320

cattcgatta taacgttaag aaaggaattc c atg gca tcc gca gca aat gca 1372
Met Ala Ser Ala Ala Asn Ala
1 5

ggt cag ctt ggc aac ctc ccc ggc gtt act tcc atg ggc atg ggc tat 1420
Gly Gln Leu Gly Asn Leu Pro Gly Val Thr Ser Met Gly Met Gly Tyr
10 15 20

gac gtg aat ggt ttg tac gcc agc ccg gaa agc ctg ctt ggc caa ccc 1468
Asp Val Asn Gly Leu Tyr Ala Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gly Gln Pro
25 30 35

ttg ttc gat ttc ggc ggc gag ctg gac agc atc gaa atc gag ggc cgc 1516
Leu Phe Asp Phe Gly Gly Glu Leu Asp Ser Ile Glu Ile Glu Gly Arg
40 45 50 55

agc tac acc ttt ccc cgc agc atg cat gta cac acc tat ttc cat tcc 1564
Ser Tyr Thr Phe Pro Arg Ser Met His Val His Thr Tyr Phe His Ser
60 65 70

gac ttc aaa cag gat gtc agc aag gaa atc gaa gag tat cgg gag aaa 1612
Asp Phe Lys Gln Asp Val Ser Lys Glu Ile Glu Glu Tyr Arg Glu Lys
75 80 85

atg agc cag cac gtg ggc gtg tcc ggc cgc tac aag ttg ttc agc gct 1660
Met Ser Gln His Val Gly Val Ser Gly Arg Tyr Lys Leu Phe Ser Ala
90 95 100

tcg ctg agc gtg gat ttc acc acc acg gac cag caa ctg acc gag att 1708
Ser Leu Ser Val Asp Phe Thr Thr Thr Asp Gln Gln Leu Thr Glu Ile
105 110 115

acc tac agc tcc acc cgc gaa gcc cat gtg ctg tgg tac atc agc ctg 1756
Thr Tyr Ser Ser Thr Arg Glu Ala His Val Leu Trp Tyr Ile Ser Leu
120 125 130 135

cct ggc gcg gcc acg ctg cgt tcg atg ctg cgc cgc gat ttc cgc gac 1804
Pro Gly Ala Ala Thr Leu Arg Ser Met Leu Arg Arg Asp Phe Arg Asp
140 145 150

gac ctg aac aac ccc aat atg ccg gcc atg gag ctg ttc aag cgc tat 1852
Asp Leu Asn Asn Pro Asn Met Pro Ala Met Glu Leu Phe Lys Arg Tyr
155 160 165

ggt ccc tac tac ata tcg gaa gcg gcg gtg ggc ggc cgg ctg gac tac 1900
Gly Pro Tyr Tyr Ile Ser Glu Ala Ala Val Gly Gly Arg Leu Asp Tyr
170 175 180

agc gcg gcc agc aag acc ttg aag atg gac agc agc cag tcg ctg tcc 1948
Ser Ala Ala Ser Lys Thr Leu Lys Met Asp Ser Ser Gln Ser Leu Ser
185 190 195

acc acc gcc gaa atg tcc tac aag gcg ctg gtg ggc gag atc aag atc 1996
Thr Thr Ala Glu Met Ser Tyr Lys Ala Leu Val Gly Glu Ile Lys Ile
200 205 210 215

gag cat ggc tcg gag atg gaa aag cag gtc aac agc ttc cgc agc aac 2044
Glu His Gly Ser Glu Met Glu Lys Gln Val Asn Ser Phe Arg Ser Asn
220 225 230

ES 2 609 332 T3

tcc Ser	acc Thr	atc Ile	cg Arg 235	ctc Leu	acc Thr	gcc Ala	acc Thr	ggc Gly 240	ggc Gly	aag Lys	ccg Pro	ggc Gly	atg Met 245	acc Thr	gat Asp	2092
cg Arg	ata Ile	ctg Leu 250	cac His	gg Gly	ccg Pro	gat Asp	tcg Ser 255	cag Gln	cag Gln	gcg Ala	ttc Phe	tcg Ser 260	caa Gln	tgg Trp	gcg Ala	2140
gaa Glu	tcg Ser 265	ctg Leu	ctc Leu	gac Asp	tat Tyr	gcg Ala 270	acg Thr	ctg Leu	atg Met	gac Asp	ttt Phe 275	tcc Ser	acc Thr	gaa Glu	agc Ser	2188
ctg Leu 280	caa Gln	ccg Pro	atc Ile	tgg Trp	gcg Ala 285	ctg Leu	gcc Ala	gac Asp	aag Lys	ccc Pro 290	gag Glu	cg Arg	cg Arg	gtc Val	gag Glu 295	2236
ctt Leu	gag Glu	gac Asp	gcc Ala	ttc Phe 300	ccc Pro	gaa Glu	ttc Phe	atg Met	aag Lys 305	cag Gln	tcg Ser	cag Gln	cag Gln	tcc Ser 310	atc Ile	2284
ccc Pro	aag Lys	gtg Val	gac Asp 315	aag Lys	gtg Val	ctg Leu	ctg Leu	atg Met 320	gac Asp	gcg Ala	cg Arg	ccg Pro	cct Pro 325	atg Met	gtg Val	2332
aag Lys	gct Ala	ggg Gly 330	gag Glu	gat Asp	agc Ser	ggc Gly 335	tcc Ser 335	ggc Gly	gcg Ala	tcg Ser	gag Glu	gat Asp 340	ctg Leu	gct Ala	gtg Val	2380
ttc Phe	aat Asn 345	ccc Pro	agc Ser	acc Thr	tcc Ser	aat Asn 350	ggc Gly	tac Tyr	aag Lys	atg Met	gtt Val 355	ggc Gly	cag Gln	ttc Phe	ggt Gly	2428
cag Gln 360	cg Arg	aac Asn	cat His	gcc Ala	agc Ser 365	gtg Val	gcg Ala	gat Asp	ggc Gly	cat His 370	gcg Ala	ccg Pro	att Ile	ttc Phe	aag Lys 375	2476
gat Asp	ctg Leu	ttc Phe	gat Asp	ctg Leu 380	ggc Gly	gtg Val	ctg Leu	aag Lys	gcg Ala 385	ccg Pro	gtg Val	ggt Gly	tgg Trp	cag Gln 390	cg Arg	2524
gtg Val	tgg Trp	gac Asp	gac Asp 395	gcc Ala	ggc Gly	tcc Ser	ggc Gly	aag Lys 400	tcc Ser	aag Lys	gac Asp	tac Tyr	gcg Ala 405	tgc Cys	tgg Trp	2572
cg Arg	gcg Ala	att Ile 410	ccg Pro	ccg Pro	cag Gln	ggc Gly 415	tac Tyr 415	cg Arg	gcg Ala	ctg Leu	ggc Gly 420	gat Asp 420	gtg Val	atg Met	atg Met	2620
ctg Leu 425	gcc Ala	acc Thr	agc Ser	ggc Gly	tat Tyr	aac Asn 430	ccg Pro	ccg Pro	aat Asn	ctg Leu	ccg Pro 435	gac Asp	tat Tyr	gtt Val	tgc Cys	2668
gtg Val 440	cat His	caa Gln	agc Ser	ctg Leu	tgc Cys 445	gcg Ala	gat Asp	gtg Val	cag Gln	acg Thr 450	ctg Leu	caa Gln	aac Asn	cg Arg	gtg Val 455	2716
tgg Trp	tgg Trp	gac Asp	aag Lys	ggc Gly 460	acc Thr	ggc Gly	gcg Ala	cg Arg	aag Lys 465	gat Asp	gtc Val	agc Ser	ctg Leu 470	tgg Trp	caa Gln	2764
ccg Pro	ggc Gly	gcg Ala	gcc Ala 475	ggc Gly	gcg Ala	gtg Val	gcg Ala	tcc Ser 480	tct Ser	tgc Cys	ttc Phe	gcc Ala	ggc Gly 485	gtg Val	cct Pro	2812

ES 2 609 332 T3

aat tac aac aac ccg ccc aat tcc ggc gac atc gag cgc ttg cgc ggc	2860
Asn Tyr Asn Asn Pro Pro Asn Ser Gly Asp Ile Glu Arg Leu Arg Gly	
490 495 500	
agc atc gca tgc gtg aag acc agc gcg atc gcg tcc atg cag gaa atg	2908
Ser Ile Ala Cys Val Lys Thr Ser Ala Ile Ala Ser Met Gln Glu Met	
505 510 515	
aag tcc atg ctc agc cag cac caa ggc atg gaa gcg atg atg tcc aag	2956
Lys Ser Met Leu Ser Gln His Gln Gly Met Glu Ala Met Met Ser Lys	
520 525 530 535	
ctg tgatccgggc ctgaccgggc aaaaaaaciaa ggctgccgga tggcagcctt	3009
Leu	
gttttatccc accgtctgcg ccaggcggga cgggttcagt tgaagcggta gtccaccgtc	3069
acgccgaccg tgcgcggcgc gcctatcacc cccagattgt tgccgcgggc cggaatctgg	3129
gcgtagagca cgccttggtt ggtcagattg ttgacgtagg cgcgtacccc ccagcggggc	3189
tcctcgtagc cgggtgttcag gttggccacg atgtagtcgc cggcgggtgcg ggccggatca	3249
ttggtgatgt ccgaatagta ggacccgacg cggttcaggc tgccgccaat atagaagtgt	3309
cgcggcagac gctgcttgaa gcccagggtg actgtcagat gcggcgcgta gttgaactga	3369
ttgccttgta tgccgggatt ggcggcgtcg gtgccggtca ccttggtgtt caacaggccg	3429
atgccggcgc tgaggggtcag cttcggcgtg acgcgcgctt tgctttccag ttccaggccg	3489
tagctttgcc cttccggaat attggtgaag cgcgacccca gtatggcctg gtagccggtg	3549
tactggttga agaaggcatt ggcggtgagg ctgacgcgct cgtccaggaa ggtggagcgg	3609
ctgctcagct cgtaggttgt gacctgttcc ttggtgaagg ttagtactt gttgtcgttg	3669
tccaggcccg agccgccggc gttgtagcct ttgcgcgcgg acaggcccag ggtggtgat	3729
gggctgtact ttagctcag gccggccttg ggcaggaaca aggtttcgcc gaggtcatag	3789
ctggcttgag cttcgtagct ctgtccgggg cccagcgtgg tgttgcgtcg ttgcatctcg	3849
cgttccgcgc ggccgccag attgaggctc cacttgtcgt ctacgccag cgtggcttcg	3909
ccgtaaaacg cctcggctctt gaggcgatcc ttggccgcta cgcgcggaga ggcgttcatg	3969
tcctggtcgc ggtcgtagta atagacccg accaagccgc tcagccagcc atcctgcggc	4029
gcgtaggcca ggcgggcctc ggcggtgttg cccttctcgt ccagcctcat gctgaatgcg	4089
ggcgtgtcgg aatctttgaa cgcgctgatg ttgtcggcgt ggcccagcag caggctggcg	4149
ctccaggcgt cattgatctg gtatcgcaga tcggcgtga cgggtgttgtt gaacgagtcc	4209
tgatagcgag cttcggtcga caggcgggtga tactggtagt cgaagtagtt gccgtcgacg	4269
tagttcaggt attcgcctt gttcttgcgg tgcgccaccg tcagcttggc ggtgaagccc	4329
ggcagcgcgc tgggcttcca cagcagcttg ccgcggaagc tgctgttttt cacttcggac	4389

ES 2 609 332 T3

gcgtcccagg gcatggcgcc cggataatcg atgtagctgt ggccgttcag gccttcggcg 4449
 gcgacgcgaa aagccagctc gtcggtgatc ggaccggaga tcatgccggc cagcgtcact 4509
 ttgccgtcct tattctcata gccggcgcgc agcgcgcctt cccagtcgaa agtcgggtcc 4569
 ttggtgttga ccacgatggc gccggccatg gtattgcggc cctgagtggg ggactgcggg 4629
 ccgcgagca cttctatctg ttccacgtcc catgggctgg cgtcgacgta gcgctggccg 4689
 ttccagcttt ccgacatgcc gtcaaccgtg gtgctgacgc gcgggcggga gccggagacc 4749
 agcgtgttgt agccggtgcc ggggcccgtg ccttccacgc cgcggatatt gatgatgccg 4809
 gcgccgttgg ccgtggcggt ggggggtggc gccgccgct catagaccga tttgatctcg 4869
 ccggtgtcgg tgtcgcgag caccgatacc gcggtggtgg tgtctttcag cgagcggttg 4929
 atcttctcgc cggtgacggt cacggtaggc agggcggcgt cttgttggc ggccggagcc 4989
 gccagcgcgg agtggggcag cgacatgcct cccaggcagg ccaaggccag cagggtggcg 5049
 tgggccaggg cgtcgcgctt gcggtgcggg agttttcca tcgttccaga ttcctcattg 5109
 tggttattgt cagattgacc gggggcggtt ctgcggcgtc gtctggctgg cgaggaatcg 5169
 ttggctaag cggcggacgg aactgtgggg ccggtgctga cccgttgaga tcggtgcgat 5229
 caacagatgc aaatgataat atttatcatt aacaatatgc aataacttaa cgcaatcga 5289
 attggccggt agcggccgca ttcattgcgc ggcctggatc ggtggagaac gttgtggaat 5349
 ggaatcaagt ggcagtggaa agcgcggctt ggctgcaaca cccggaagcg ggcaaaccgc 5409
 aatggtggga ccggctggcc gccgcggcg cgccgctgcg agagcggctg ccggacgggc 5469
 gcgtatgcgt gactttcctg tggcgggatc cggccggtgg tcccgccgct tcgtccatcg 5529
 tccgtgtgta cgccgacgtc aactccgtca ccgatcacca tagcccgcag ccgcaatcgt 5589
 tgtcccgcct gggcgatacc gacgtctggt ggtggcaggc ggtgttgcg gcggattggc 5649
 gcggtagtta cgcctatata ccggtagcgg ccggacagac gcctcccgtt cccggcggcg 5709
 atgtccgcca gagccggctt cttcatcgcg aatggtggct gagcatcatg gccaggccg 5769
 tcgccgatcc gctcaacccc gccgccgact accgcagcag ctggggcgcc agcttgtcgc 5829
 cgctgcatct gcccgacgcc ccggaccagt ccgcctgggc cgctgggac aaaaccgggc 5889
 agggggccga tccgcgccgc ctgacggaaa tccgctggga cagcgccatg ctcggcaagg 5949
 cgcgccgggt ctggatctac cacacggcg agatttctgt cggacaatgg gccgagaggc 6009
 cgctggcgat tttgctggac ggccagcatt gggcgacg cctgccgggt ttcgccgcgc 6069
 tggacgagga caccgccgc gggcgtttgc cggccgcgggt gtatttgctg atcgacagca 6129
 tcgacggcaa gcaccgcgag gaagacttgc cctgcaacgc cgattctgg gctggccttg 6189
 caaaggaact gctgccgag gcggctctga tcgcgccgtt cagcggccgg gccgattgca 6249
 ccgtggtggc cgggcagagc tatggcggcc tggctgccga _tgttcgccgg cctcaactgg 6309
 ccggaccgtt tcggctgcgt gctcagccag tccggctcgt tctggtggcc acacgtggaa 6369
 ttgcatgaaa aggcgcgcgc ggcaagcgcc cgcc 6403

ES 2 609 332 T3

<210> 13
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> péptido de direccionamiento al retículo endoplasmático
 <400> 13

Lys Asp Glu Leu
 1

10 <210> 14
 <211> 510
 <212> PRT
 <213> *Photorhabdus luminescens*
 <400>14

Met Ser Asn Asp Lys Thr Gly Lys Ser Leu Glu Gln Glu Asn Ser Glu
 1 5 10 15

Arg Asp Val Glu Ile Arg Asp Arg Asn Tyr Phe Arg Lys Leu Ser Leu
 20 25 30

Phe Asp Asp Thr Val Ile Ala Gly Ala Glu Met Ile Gly Thr Ser Tyr
 35 40 45

Asp Val Phe Gly Lys Tyr Cys Asn Val Gly Ser Cys Met Asn Ser Leu
 50 55 60

Phe Asp Glu Arg Lys Ile Asn Ala Ser Glu Asp Asn Phe Lys Lys Val
 65 70 75 80

Thr Ile Leu Gly Lys Thr Leu Lys Val Pro Tyr Tyr Ile Asp Cys Tyr
 85 90 95

Ser Val Gly Asp Leu Lys Tyr Thr Asn Ala Ser Gly Glu Ser Ile Glu
 100 105 110

Ser Tyr Gln Ser Asn Ile Ser Ser Lys Ser Arg Ile Lys Gly Asn Tyr
 115 120 125

Leu Phe Phe Ser Ala Ser Leu Lys Val Asp Phe Asp Thr Asp Ser Leu
 130 135 140

ES 2 609 332 T3

Thr Asp Phe Glu Asn Ala Phe Ser Arg Ile Gln Tyr Thr Tyr Asp Leu
 145 150 155 160
 Tyr Ile Leu Lys Ser Ser Ala Glu Ala Leu Lys Glu Phe Leu Lys Glu
 165 170 175
 Ser Val Lys Thr Ala Leu Asp Lys Ala Asp Thr Glu Glu Asp Met Asn
 180 185 190
 Asp Leu Phe Asn Thr Trp Gly Ser His Phe Leu Ser Gly Val Val Met
 195 200 205
 Gly Gly Cys Ala Gln Tyr Ser Ser Ser Thr Asn Lys Tyr Thr Ser Asn
 210 215 220
 Leu Thr Asn Ser Phe Asp Val Val Ala Ala Ala Ser Phe Ala Gly Phe
 225 230 235
 Ile Gly Leu Ser Ala Arg Thr Gly Asn Ser Phe Met Glu Asp Ile Lys
 245 250 255
 Lys Phe Arg Ser Ala Ser Asn Ile Lys Thr His Ala Ile Gly Gly Asp
 260 265 270
 Leu Ser Arg Phe Asp Pro Phe Gly Gly Ala Thr Ser Ala Asp Gln Pro
 275 280 285
 Ser Ala Glu Glu Ile Ala Ala Ala Lys Lys Ala Phe Glu Asp Trp Lys
 290 295 300
 Ala Ser Val Pro Asn Ala Pro Glu Leu Val Asn Phe Ala Asp Ser Asn
 305 310 315 320
 Pro Leu Thr Gly Ile Trp Glu Leu Cys Ser Asp Arg Thr Gln Lys Ala
 325 330 335
 Lys Leu Lys Lys His Phe Glu Thr Val Trp Ala Pro Ala Glu Ser Ala
 340 345 350
 Lys Arg Arg Val His Ala Asp Tyr Ile Asp Glu Ile Ile Ile Gly Ile
 355 360 365
 Asn Asn Thr Asn Thr Pro Pro Glu Gly Tyr Ile Gly Leu Lys Ser Thr
 370 375 380
 Lys Asp Glu Asn Leu Asn Ser Lys Gly Asn Ile Cys Leu Phe Met His

ES 2 609 332 T3

			100					105						110			
Ser	Ser	Ser	Met	Arg	Arg	Ser	Glu	Asn	Ala	Phe	Ser	Arg	Val	Glu	Gln		
		115					120					125					
Val	Val	Lys	Leu	Trp	Ser	Ile	Gly	Leu	Pro	Pro	Ser	Lys	Lys	Leu	Arg		
	130					135					140						
Glu	Leu	Leu	Ser	Gly	Ser	Phe	Leu	Glu	Ala	Leu	Asp	Gly	Leu	Pro	Ala		
145					150					155					160		
Ala	Ala	Ser	Thr	Ser	Glu	Glu	Gln	Ala	Glu	Tyr	Lys	Gly	Phe	Leu	Asp		
				165					170					175			
Thr	Trp	Gly	Ala	Phe	Tyr	Leu	Ser	Gly	Met	Leu	Ile	Gly	Gly	Lys	Thr		
			180					185					190				
Leu	Phe	Thr	Ser	Ser	Val	Asn	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Arg	Thr	Leu	Ser		
		195					200					205					
Ile	Ser	Val	Thr	Ala	Asp	Leu	Ser	Tyr	Lys	Ser	Val	Thr	Gly	Gln	Ile		
	210					215					220						
Ser	Asn	Glu	Asp	Lys	Ile	Lys	Tyr	Ala	Ser	Gln	Leu	Ser	Gln	Phe	Ala		
225					230					235					240		
Ser	Ser	Ser	Asn	Thr	Val	Lys	Asn	Ala	Phe	Gly	Gly	Asn	Pro	Ala	Leu		
				245					250					255			
Ala	Ser	Arg	Val	Phe	Asp	Gly	Arg	Val	Gln	Tyr	Asp	Glu	Trp	Ser	Ala		
			260					265					270				
Ser	Val	Ala	Gln	Asn	Pro	Val	Ile	Val	Arg	Phe	Asp	Gly	Thr	Arg	Pro		
		275					280					285					
Leu	Thr	Gly	Val	Trp	Thr	Leu	Cys	Ser	Thr	Pro	Glu	Arg	Gly	Lys	Ile		
	290					295					300						
Leu	Glu	Ser	Tyr	Phe	Asp	Asp	Lys	Trp	Ala	Pro	Ala	Arg	Ser	Leu	Glu		
305					310					315					320		
Leu	Ser	His	Phe	Pro	Asp	Val	Val	Asp	Asp	Leu	Thr	Val	Val	Val	Gly		
				325					330					335			
Asn	Asp	Asp	Gln	Pro	Pro	Val	Pro	Asp	Gly	Tyr	Thr	Lys	Asp	Asp	Tyr		
			340					345					350				

ES 2 609 332 T3

Asp Leu Asn Arg His Ala Gly Gly Lys Phe Ile Tyr Leu Cys Trp His
355 360 365

Lys Val Pro Val Ser Gly Leu Arg Lys Pro Lys Arg Val Leu Gln Ala
370 375 380

Met Gln Val Ile Tyr Asn Gly Asp Lys Val Pro Asp Gly Tyr Ser Lys
385 390 395 400

Ile Asn Val Asp Leu Asn Gln Gly Ala Gly Gly Asp Asp Val Phe Leu
405 410

Cys Met Lys Gln Gly Glu Tyr Gly Thr Asp Glu Asn Ile Leu Asp Val
420 425 430

Arg Val Ile Gly Gly Asn Asp Ser Phe Val Pro Ala Pro Tyr Gly Tyr
435 440 445

Lys Thr Leu Pro Gly Asp Leu Asn Lys Gly Ala Gly Gly Asp Tyr Val
450 455 460

Tyr Ile Ala Tyr Ala Asn
465 470

REIVINDICACIONES

1. Molécula de ácido nucleico recombinante que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en:
- a) la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1, o un complemento de la misma;
 - 5 b) una secuencia de nucleótidos que codifica para un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8; y
 - c) una secuencia de nucleótidos que codifica para un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 90% con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8, en la que dicha secuencia de aminoácidos tiene actividad pesticida.
- 10 2. Molécula de ácido nucleico recombinante según la reivindicación 1, en la que dicha secuencia de nucleótidos es:
- (a) una secuencia sintética que se ha diseñado para la expresión en una planta preferiblemente en la que dicha secuencia de nucleótidos se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 9, 10 u 11; o
 - (b) operativamente unida a un promotor que puede dirigir la expresión de dicha secuencia de nucleótidos en una célula vegetal, preferiblemente que comprende además una secuencia de nucleótidos que codifica para un polipéptido heterólogo.
- 15 3. Célula huésped que contiene la molécula de ácido nucleico recombinante según la reivindicación 2(b), preferiblemente que es una célula huésped bacteriana o es una célula vegetal.
4. Planta transgénica que comprende la célula huésped vegetal según la reivindicación 3, preferiblemente 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.
- 20 5. Polipéptido recombinante con actividad pesticida, seleccionado del grupo que consiste en:
- a) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8;
 - b) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 90% con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8, en la que dicha secuencia de aminoácidos tiene actividad pesticida; y
 - 25 c) un polipéptido que está codificado por la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1, preferiblemente que comprende además secuencias de aminoácidos heterólogas.
6. Anticuerpo que se une selectivamente al polipéptido según la reivindicación 5.
7. Composición que comprende el polipéptido según la reivindicación 5.
- 30 8. Composición según la reivindicación 7, en la que
- (a) dicha composición se selecciona del grupo que consiste en un polvo, polvo fino, microgránulo, gránulo, pulverización, emulsión, coloide y disolución;
 - (b) dicha composición se prepara mediante desecación, liofilización, homogeneización, extracción, filtración, centrifugación, sedimentación o concentración de un cultivo de células de *Bacillus thuringiensis*.
 - 35 (c) la composición comprende desde aproximadamente el 1% hasta aproximadamente el 99% en peso de dicho polipéptido.
9. Método para controlar una población de plaga de lepidópteros o coleópteros que comprende poner en contacto dicha población con una cantidad eficaz como pesticida del polipéptido según la reivindicación 5.
- 40 10. Método para destruir una plaga de lepidópteros o coleópteros, que comprende poner en contacto dicha plaga, o alimentar a dicha plaga, con una cantidad eficaz como pesticida del polipéptido según la reivindicación 5.

11. Método para producir un polipéptido con actividad pesticida, que comprende cultivar la célula huésped según la reivindicación 3 en condiciones en las que se expresa la molécula de ácido nucleico que codifica para el polipéptido.

5 12. Planta que tiene incorporado de manera estable en su genoma un constructo de ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para una proteína que tiene actividad pesticida, en la que dicha secuencia de nucleótidos se selecciona del grupo que consiste en:

a) la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1, 9, 10, 11 ó 12;

b) una secuencia de nucleótidos que codifica para un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8; y

10 c) una secuencia de nucleótidos que codifica para un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 90% con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8, en la que dicha secuencia de aminoácidos tiene actividad pesticida; en la que dicha secuencia de nucleótidos está operativamente unida a un promotor que dirige la expresión de una secuencia codificante en una célula vegetal.

15 13. Planta según la reivindicación 12, en la que dicha planta es una célula vegetal, preferiblemente en la que dicha semilla comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en:

a) la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:1, 9, 10, 11 ó 12;

b) una secuencia de nucleótidos que codifica para un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8; y

20 c) una secuencia de nucleótidos que codifica para un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 90% con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8, en la que dicha secuencia de aminoácidos tiene actividad pesticida.

14. Método para proteger a una planta frente a una plaga de insectos, que comprende expresar en una planta o célula de la misma una secuencia de nucleótidos que codifica para un polipéptido pesticida, en el que dicha secuencia de nucleótidos se selecciona del grupo que consiste en:

25 a) la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1, 9, 10, 11 ó 12;

b) una secuencia de nucleótidos que codifica para un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8; y

30 c) una secuencia de nucleótidos que codifica para un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 90% con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8, en la que dicha secuencia de aminoácidos tiene actividad pesticida, preferiblemente en la que dicha planta produce un polipéptido pesticida que tiene actividad pesticida frente a una plaga de lepidópteros o coleópteros.

ES 2 609 332 T3

```

*      20      *      40      *      60      *      80
Axmi205 : -----HASAANAGQLGNLPGVTSHGNGYDVNGLYASPESELLGQPLDFDGGELDSI----- : 50
Clavibacter : -----MSDFVVTETDTPRILPGVSLTGSTYDVF GDDATNDSAIQIFDUSKAEWGTT----- : 52
Photorhabdus : MSNDKTGKSLEQENSERDVEIRDNRNYFRKLSLFD DTVIAGAEMIGTSYDVF GKYCNVGSCHMSLDFDERKINASEDNFKKV : 80
                f          6pGv  G  YDvfG ya  S 6 q fd k e

*      100     *      120     *      140     *      160
Axmi205 : EIEGRSYTFPRSMHVHTYFHSDFKQDVSKEIEEYREKMSQHVGVSGRYKLFSA SLSVDFTTTDDQQLTEITYSSSTREAHVL : 130
Clavibacter : EINGTEYRIPKLMNAEGVAGSEYVSYGNVVEEYQOQLAASVAVSNGSNMFFSGSLETQFGSSSMRSENAFSRVEQVVKL : 132
Photorhabdus : TILGKTLKVPYYIDCYSVGD LKYTNASGESIESYQSNISSKSRIKGNYLFFSASLKVDFD TDSLTD FENAFSRIQYTYDL : 160
                eI G y P 6 v s S g 6EeYq 6s v 6sG y fFSaSL vdf 3 s Ena5Sr L

*      180     *      200     *      220     *      240
Axmi205 : WYISLPGAATLRSMRLRRDFRDDLN-----NPNMPANELFKRYGYYISEAAVGGRLDYSAASKTLEMDSSQSLSTT : 201
Clavibacter : WSIGLPPSKKRELLSGSFLEALDGLPAAASTSEEQAEYKGF LDTUGAFYLSGMLIGGKTLFTSSVNKLTVDRTLSISVT : 212
Photorhabdus : YILKSS-AEALKEFLKESVKTALD-----KADTEEDMNDLFNTUGSHFLSGVVMGGCAQYSSSTNKYTSNLTNSFDVV : 232
                5 6 lp a L4e L sf aLl          lf t5G 56Sg 5GG 53ss nkl t 1 3 S svt

*      260     *      280     *      300     *      320
Axmi205 : AEMSYKALVGEIKIEHGSEMEKQVNSFRSNSTIRLTATGGKPG-----MTDRILHGPDSQQAFSQWAESLLDYA : 270
Clavibacter : ADLSYKSVTGQISNEDKIRYASQLSQFASSSNTVKNAPGGNP-----ALASRVFDGRVQYDEWSASVAQNP : 278
Photorhabdus : AAASFAGFIG-LSARTGNSFMEDIKKFRSASNIKTHAIGGDLRSRFD PFGGATSADQPSAEEIAAAKKA FEDWKASVNPAP : 311
                A 55k G 6s e g q6 FrS Sni A GG p          a d a5 W a56 p

*      340     *      360     *      380     *      400
Axmi205 : TLMDFS-TESLQPIWALADKPEERVELEDAFPEFMKQSQSIPKVDKVL LMDARPPMVKAGEDSGSGASEDLAVFNPSTS : 349
Clavibacter : VIVRFDGTRFLTGVWTL CSTPERGKILESYFDDK WAP-----ARSLELSHFPPDVVD : 329
Photorhabdus : ELVMFADSNPLTGIWELCSDR TQKAKLKKHFETV WAP-----AESAKRRRVHADYID : 362
                66 F 3 pLtg6W Les per Le F wap          a S l vf d d

*      420     *      440     *      460     *      480
Axmi205 : NGYKMVGQFGQRNHASVADGHAFIFKDLFDLGV LKAPVGVQQRVUDDAGSGKSK--DYACWRAIPPQGYRALGDVMMMLATS : 427
Clavibacter : DLTVVVGND DQP-----PVPDGYTKDDYDLNRHAGGKF IYLCWHKVPVSGLRPKRVLQAMQV : 387
Photorhabdus : EIIIGINNTNTP-----PEGYIGLRS TKDENLNSKG-NICLFMHKAKYDPNIDNKDCITELKF : 419
                6gn qp          p p g 4 D n g iyLcwhk p g r kdV6

*      500     *      520     *      540     *      560
Axmi205 : GYNPPNLPDYVCVHQSLCADVQTLQNRVUUDKGTGARKDVSLWQP GAAAGAVASSCFAGVPNYMPPNSGDIERLRGSIAC : 507
Clavibacter : IYNGDKVPDGYSKINVDLNQ GAGDDVFLCHKQGEYGTDENILDVVRVIGG-NDSFVPAPYGYKTLPG----DLNKGAGGD : 462
Photorhabdus : ITVRDRSPEGDWVKIPQD IYISFNQYL YLCYLP AKYSAEKAIKDIQLLCS CGSSMILPYGYN DVLDERGERANATEDDN : 499
                iyn dk Pdg v          q lc k y d 6 d g S pygYn p ng

*      580
Axmi205 : VKTSAIASMQEMKSMLSQHOGMEAMMSKL : 536
Clavibacter : YVYIAYAN----- : 470
Photorhabdus : VHLYIYSAGUK----- : 510
                v y aya

```

FIG. 1