

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 630 059**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/32** (2006.01)

**C12N 15/82** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.03.2013 PCT/US2013/029647**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.09.2013 WO13134523**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.03.2013 E 13710270 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.04.2017 EP 2822961**

54 Título: **Gen Axmi335 de la toxina de Bacillus thuringiensis y procedimientos para su uso**

30 Prioridad:

**08.03.2012 US 201261608303 P**

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

**17.08.2017**

73 Titular/es:

**ATHENIX CORP. (100.0%)  
3500 Paramount Parkway  
Morrisville, NC 27560, US**

72 Inventor/es:

**SAMPSON, KIMBERLY, S.;  
THAYER, REBECCA y  
LEHTINEN, DUANE**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

ES 2 630 059 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 Axmi335 de la toxina de *Bacillus thuringiensis* y procedimientos para su uso

5 **Referencia cruzada a solicitudes relacionadas**

Esta solicitud reivindica prioridad de la solicitud de patente provisional de EE. UU. n.º 61/608.303, presentada de conformidad con el 35 U.S.C. § 111(b) el 8 de marzo de 2012.

10 **Campo de la invención**

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

15 **Antecedentes de la invención**

*Bacillus thuringiensis* es una bacteria del suelo formadora de esporas grampositiva que se caracteriza por su capacidad para producir inclusiones cristalinas que son específicamente tóxicas para determinados órdenes y especies de insectos, pero son inofensivas para las plantas y otros organismos no diana. Por esta razón, se pueden usar composiciones que comprenden cepas de *Bacillus thuringiensis* o sus proteínas insecticidas como insecticidas ambientalmente aceptables para controlar vectores de insectos o plagas de insectos agrícolas para una variedad de enfermedades humanas o animales.

25 Las proteínas cristalinas (Cry) (delta-endotoxinas) de *Bacillus thuringiensis* tienen actividad insecticida potente predominantemente frente a larvas de lepidópteros, hemípteros, dípteros y coleópteros. Estas proteínas también han demostrado actividad frente a los órdenes de las plagas de *Hymenoptera*, *Homoptera*, *Phthiraptera*, *Mallophaga* y *Acari*, así como otros órdenes de invertebrados tales como *Nemathelminthes*, *Platyhelminthes* y *Sarcomastigophora* (Feitelson (1993) The *Bacillus thuringiensis* family tree. In *Advanced Engineered Pesticides*, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y.). Estas proteínas se clasificaron originalmente como CryI a CryV basándose fundamentalmente en su actividad insecticida. Las clases principales fueron *Lepidoptera*-específica (I), *Lepidoptera*- y *Diptera*-específica (II), *Coleoptera*-específica (III), *Diptera*-específica (IV) y nematodo-específica (V) y (VI). Las proteínas se clasificaron adicionalmente en subfamilias; a las proteínas más altamente relacionadas en cada familia se les asignaron letras divisionales, tales como *Cry1A*, *Cry1B*, *Cry1C*, etc. Incluso a las proteínas más estrechamente relacionadas en cada tipo se les dieron nombres, tales como *Cry1C1*, *Cry1C2*, etc.

Recientemente se describió una nueva nomenclatura para los genes Cry basándose en la homología de secuencias aminoacídicas en lugar de la especificidad de la diana de insecto (Crickmore *et al.* (1998) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:807-813). En la nueva clasificación, a cada toxina se le asigna un nombre único que incorpora un rango primario (un número arábigo), un rango secundario (una letra mayúscula), un rango terciario (una letra minúscula) y un rango cuaternario (otro número arábigo). En la nueva clasificación, los números romanos se han intercambiado por números arábigos en el rango primario. Las proteínas con menos de un 45 % de identidad de secuencia tienen rangos primarios diferentes, y los criterios para los rangos secundario y terciario son un 78 % y un 95 %, respectivamente.

La proteína cristalina no presenta actividad insecticida hasta que se haya ingerido y solubilizado en el intestino medio del insecto. La protoxina ingerida se hidroliza mediante proteasas en el tubo digestivo del insecto en una molécula tóxica activa. (Höfte and Whiteley (1989) *Microbiol. Rev.* 53:242-255). Esta toxina se une a los receptores apicales del borde en cepillo en el intestino medio de las larvas diana y se inserta en la membrana apical creando canales iónicos o poros, lo que da como resultado la muerte de las larvas.

Las delta-endotoxinas generalmente tienen cinco dominios de secuencia conservados y tres dominios estructurales conservados (véase, por ejemplo, de Maagd *et al.* (2001) *Trends Genetics* 17:193-199). El primer dominio estructural conservado consiste en siete hélices alfa y está implicado en la inserción en la membrana y en la formación de poros. El dominio II consiste en tres láminas beta dispuestas en una configuración en clave griega, y el dominio III consiste en dos láminas beta antiparalelas en una formación de "bizcocho enrollado" (de Maagd *et al.*, 2001, *supra*). Los dominios II y III están implicados en el reconocimiento y unión al receptor, y, por lo tanto, se consideran determinantes de la especificidad de la toxina.

60 Aparte de las delta-endotoxinas, existen varias otras clases conocidas de toxinas proteicas plaguicidas. Las toxinas VIP1/VIP2 (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. 5.770.696) son toxinas plaguicidas binarias que presentan una fuerte actividad sobre insectos mediante un mecanismo que se cree que implica endocitosis mediada por receptor seguida de toxificación celular, similar al modo de acción de otras toxinas binarias ("A/B"). Las toxinas A/B, tales como VIP, C2, CDT, CST, o las toxinas letal y adematosa de *B. anthracis*, interaccionan inicialmente con células diana por medio de una unión mediada por receptor de componentes "B" como monómeros. A continuación, estos monómeros forman homoheptámeros. A continuación, el complejo receptor-heptámero de "B" actúa como una

plataforma de acoplamiento que posteriormente se une y permite la translocación de un componente(s) "A" enzimático(s) en el citosol por medio de endocitosis mediada por receptor. Una vez dentro del citosol de la célula, los componentes "A" inhiben la función celular normal, por ejemplo, ADP-ribosilación de G-actina, o niveles intracelulares crecientes de AMP cíclico (AMPc). Véase Barth *et al.* (2004) *Microbiol Mol Biol Rev* 68:373-402.

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

Se aceptan los siguientes documentos:

- Rang *et al* (2005) *Applied and Environmental Microbiology*, 71(10): 6276-6281, que aborda una proteína relacionada con Vip3 de *Bacillus thuringiensis*;
- documento WO 03/075655, que aborda proteínas Vip3 y procedimientos de uso;
- documento US 2010/004176, que aborda AXMI-115, AXMI-113, AXMI-005, AXMI-163 y AXMI-184: proteínas insecticidas y procedimientos para su uso; y
- Crickmore *et al* (1998) *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(3): 807-813, que aborda la revisión de la nomenclatura de las proteínas cristalinas plaguicidas de *Bacillus 807-thuringiensis*.

### Sumario de la invención

Se describen composiciones y procedimientos para conferir actividad plaguicida a bacterias, plantas, células vegetales, tejidos y semillas. Las composiciones comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican secuencias para polipéptidos plaguicidas e insecticidas, vectores que comprenden estas moléculas de ácido nucleico, y células huésped que comprenden los vectores. Las composiciones también comprenden las secuencias polipeptídicas plaguicidas y anticuerpos para estos polipéptidos. Se pueden usar las secuencias nucleotídicas en casetes de expresión o construcciones de ADN para su transformación y expresión en organismos, comprendiendo microorganismos y plantas. Las secuencias aminoacídicas o nucleotídicas pueden ser secuencias sintéticas que se han diseñado para su expresión en un organismo comprendiendo, pero sin limitarse a, un microorganismo o una planta. Las composiciones también comprenden bacterias, plantas, células vegetales, tejidos y semillas que comprenden la secuencia nucleotídica de la invención.

En particular, se proporcionan moléculas de ácido nucleico aisladas o recombinantes que codifican una proteína plaguicida. De ahí que la presente invención proporcione una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia nucleotídica que codifica una secuencia aminoacídica que tiene actividad plaguicida, donde dicha secuencia nucleotídica se selecciona del grupo que consiste en:

- a) la secuencia nucleotídica expuesta en la SEQ ID NO: 1 o 3;
- b) una secuencia nucleotídica que codifica un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 2 o 4;
- c) una secuencia nucleotídica que codifica un polipéptido que comprende una secuencia aminoacídica que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 2 o 4.

La presente invención proporciona adicionalmente

- un vector que comprende una molécula de ácido nucleico de la invención;
- una célula huésped que contiene una molécula de ácido nucleico recombinante de la invención;
- una planta transgénica que comprende dicha célula huésped; y
- una semilla transgénica que comprende una molécula de ácido nucleico de la invención.

Adicionalmente, están englobadas secuencias aminoacídicas correspondientes a la proteína plaguicida. De ahí que la presente invención proporcione adicionalmente un polipéptido recombinante que comprende una secuencia nucleotídica que codifica una secuencia aminoacídica que tiene actividad plaguicida, donde dicha secuencia nucleotídica se selecciona del grupo que consiste en:

- a) la secuencia nucleotídica expuesta en la SEQ ID NO: 1 o 3;
- b) una secuencia nucleotídica que codifica un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 2 o 4;
- c) una secuencia nucleotídica que codifica un polipéptido que comprende una secuencia aminoacídica que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 2 o 4.

Se proporcionan procedimientos para producir los polipéptidos de la invención y para usar estos polipéptidos para

controlar o destruir una plaga de lepidópteros, hemípteros, coleópteros, nematodos o dípteros. De ahí que la presente invención proporcione un procedimiento para proteger una planta de una plaga, que comprende expresar en una planta o célula de la misma una molécula de ácido nucleico recombinante de la invención.

5 La presente invención proporciona adicionalmente un procedimiento para incrementar el rendimiento en una planta que comprende cultivar en un campo una planta o una semilla de la misma que tiene incorporada de manera estable en su genoma una construcción de ADN que comprende una molécula de ácido nucleico recombinante de la invención; donde dicho campo está infestado con una plaga frente a la que dicho polipéptido tiene actividad plaguicida. También se hace referencia a procedimientos y kits para detectar los ácidos nucleicos y polipéptidos de la invención en una muestra.

10 Las composiciones y procedimientos de la invención son útiles para la producción de organismos con tolerancia o resistencia a plagas potenciada, específicamente bacterias y plantas. Estos organismos y composiciones que comprenden los organismos son deseables para propósitos agrícolas. Las composiciones de la invención también son útiles para generar proteínas alteradas o mejoradas que tienen actividad plaguicida, o para detectar la presencia de proteínas o ácidos nucleicos plaguicidas en productos u organismos.

### Descripción detallada

20 La presente invención se dirige a composiciones y procedimientos para regular la tolerancia o resistencia 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. Por "tolerancia" se entiende una alteración o reducción del movimiento, alimentación, reproducción u otras funciones de la plaga. Los procedimientos implican transformar organismos con una secuencia nucleotídica que codifica una proteína plaguicida de la invención. En particular, las secuencias nucleotídicas de la invención son útiles para preparar plantas y microorganismos que poseen actividad plaguicida. De esta manera, se proporcionan bacterias, plantas, células vegetales, tejidos vegetales y semillas transformadas. Las composiciones son ácidos nucleicos y proteínas plaguicidas de *Bacillus* u otras especies. Las secuencias encuentran uso en la construcción de vectores de expresión para su posterior transformación en organismos de interés, como sondas para el aislamiento de otros genes homólogos (o parcialmente homólogos), y para la generación de proteínas plaguicidas alteradas mediante procedimientos conocidos en la técnica, tales como intercambio de dominios o barajado de ADN, por ejemplo, con los miembros de las familias Cry1, Cry2 y Cry9 de endotoxinas. Las proteínas encuentran uso en el control o destrucción de poblaciones de plagas de lepidópteros, hemípteros, coleópteros, dípteros y nematodos y para producir composiciones con actividad plaguicida.

35 Por "toxina plaguicida" o "proteína plaguicida" se entiende una toxina que tiene actividad tóxica frente a una o más plagas, comprendiendo, pero sin limitarse a, miembros de los órdenes *Lepidoptera*, *Diptera* y *Coleoptera*, o el filo *Nematoda*, o una proteína que tiene homología con dicha proteína. Se han aislado proteínas plaguicidas a partir de organismos que comprenden, por ejemplo, *Bacillus sp.*, *Clostridium bifermentans* y *Paenibacillus popilliae*. Las proteínas plaguicidas comprenden secuencias aminoacídicas deducidas a partir de las secuencias nucleotídicas de longitud completa divulgadas en el presente documento, y secuencias aminoacídicas que son más cortas que las secuencias de longitud completa, debido al uso de un sitio de inicio alternativo en dirección 3' o bien debido al procesamiento que produce una proteína más corta que tiene actividad plaguicida. Se puede producir el procesamiento en el organismo donde se expresa la proteína, o en la plaga después de la ingestión de la proteína.

45 De esta manera, en el presente documento se proporcionan secuencias nucleotídicas aisladas o recombinantes novedosas que confieren actividad plaguicida. Estas secuencias nucleotídicas codifican polipéptidos con homología con toxinas VIP3 conocidas. También se proporcionan las secuencias aminoacídicas de las proteínas plaguicidas. La proteína resultante 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

55 Un aspecto de la invención se refiere a moléculas de ácido nucleico aisladas o recombinantes que comprenden secuencias nucleotídicas que codifican proteínas y polipéptidos plaguicidas o porciones biológicamente activas de los mismos.

60 En particular, la presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico recombinante que comprende una secuencia nucleotídica que codifica una secuencia aminoacídica que tiene actividad plaguicida, donde dicha secuencia nucleotídica se selecciona del grupo que consiste en:

- a) la secuencia nucleotídica expuesta en la SEQ ID NO: 1 o 3;
- b) una secuencia nucleotídica que codifica un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 2 o 4;
- 65 c) una secuencia nucleotídica que codifica un polipéptido que comprende una secuencia aminoacídica que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia aminoacídica de la

SEQ ID NO: 2 o 4.

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 proteínas con regiones de homología de secuencias. También se hace referencia a secuencias nucleotídicas que se pueden hibridar con las secuencias nucleotídicas de la invención en condiciones rigurosas como se define en otra parte en el presente documento. Como se usa en el presente documento, se entiende que el término "molécula de ácido nucleico" comprende moléculas de ADN (por ejemplo, ADN recombinante, ADNc o ADN genómico) y moléculas de ARN (por ejemplo, ARNm) y análogos del ADN o ARN generados usando análogos de nucleótidos. La molécula de ácido nucleico puede ser monocatenaria o bicatenaria, pero es preferentemente ADN bicatenario.

En el presente documento se usa una secuencia de ácido nucleico (o ADN) "aislada" o "recombinante" para hacer referencia a una secuencia de ácido nucleico (o ADN) que ya no está en su entorno natural, por ejemplo, *in vitro* o en una célula huésped vegetal o bacteriana recombinante. En algunos modos de realización, un ácido nucleico aislado o recombinante está libre de secuencias (preferentemente secuencias que codifican proteínas) que flanquean de manera natural el ácido nucleico (es decir, secuencias localizadas en los extremos 5' y 3' del ácido nucleico) en el ADN genómico del organismo a partir del cual deriva el ácido nucleico. Para los propósitos de la invención, "aislado", cuando se usa para hacer referencia a moléculas de ácido nucleico excluye cromosomas aislados. Por ejemplo, en diversos modos de realización, la molécula de ácido nucleico aislada que codifica la delta-endotoxina puede contener menos de aproximadamente 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2 kb, 1 kb, 0,5 kb o 0,1 kb de secuencias nucleotídicas que flanquean de manera natural la molécula de ácido nucleico en el ADN genómico de la célula a partir de la que deriva el ácido nucleico. En diversos modos de realización, una proteína delta-endotoxina que está sustancialmente libre de material celular comprende preparaciones de proteína que tienen menos de aproximadamente un 30 %, 20 %, 10 % o 5 % (en peso seco) de proteína no delta-endotoxina (a la que se también se hace referencia en el presente documento como "proteína contaminante").

Las secuencias nucleotídicas que codifican las proteínas de la presente invención comprenden la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 1 o 3, y variantes, fragmentos y complementos de la misma que codifican un polipéptido que comprende una secuencia aminoacídica que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 2 o 4. Por "complemento" se entiende una secuencia nucleotídica que es suficientemente complementaria con respecto a una secuencia nucleotídica dada, de tal manera que se puede hibridar con la secuencia nucleotídica dada para formar de este modo un dúplex estable. La secuencia aminoacídica correspondiente para la proteína plaguicida codificada por estas secuencias nucleotídicas se expone en la SEQ ID NO: 2 o 4.

Las moléculas de ácido nucleico que son fragmentos de estas secuencias nucleotídicas que codifican proteínas plaguicidas también están englobadas por la presente invención siempre que codifiquen un polipéptido que comprenda una secuencia aminoacídica que tenga al menos un 95 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 2 o 4. Por lo tanto, por "fragmento" se entiende una porción de la secuencia nucleotídica que codifica una proteína plaguicida. Un fragmento de una secuencia nucleotídica codifica una porción biológicamente activa de una proteína plaguicida. Las moléculas de ácido nucleico que son fragmentos de una secuencia nucleotídica que codifica una proteína plaguicida comprenden al menos aproximadamente 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1350, 1400 nucleótidos contiguos o hasta el número de nucleótidos presentes en una secuencia nucleotídica de longitud completa que codifica una proteína plaguicida divulgada en el presente documento, dependiendo del uso pretendido. Por nucleótidos "contiguos" se entiende residuos nucleotídicos que están inmediatamente adyacentes entre sí. Los fragmentos de las secuencias nucleotídicas de la presente invención codifican fragmentos de proteína que retienen la actividad biológica de la proteína plaguicida y, por tanto, retienen la actividad plaguicida. De esta manera, también están englobados fragmentos biológicamente activos de los polipéptidos divulgados en el presente documento. Por "retiene la actividad" se entiende que el fragmento tiene al menos aproximadamente un 30 %, al menos aproximadamente un 50 %, al menos aproximadamente un 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o más alto de la actividad plaguicida de la proteína plaguicida. En un modo de realización, la actividad plaguicida es actividad coleopterocida. En otro modo de realización, la actividad plaguicida es actividad lepidopterocida. En otro modo de realización, la actividad plaguicida es actividad nematocida. En otro modo de realización, la actividad plaguicida es actividad dipterocida. En otro modo de realización, la actividad plaguicida es actividad hemiptericida. Los procedimientos para medir la actividad plaguicida se conocen bien en la técnica. Véase, por ejemplo, Czaplá and 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 de EE. UU. n.º 5.743.477.

Un fragmento de una secuencia nucleotídica que codifica una proteína plaguicida que codifica una porción biológicamente activa de una proteína de la invención codifica al menos aproximadamente 15, 25, 30, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 400, 450 aminoácidos contiguos o hasta el número total de aminoácidos presentes en una proteína plaguicida de longitud completa de la invención. En algunos modos de realización, el fragmento es un fragmento de escisión proteolítica. Por ejemplo, el fragmento de escisión proteolítica puede tener un truncamiento en el extremo N o uno en el extremo C de al menos aproximadamente 100 aminoácidos, aproximadamente 120, aproximadamente 130, aproximadamente 140, aproximadamente 150 o aproximadamente

160 aminoácidos en relación con la SEQ ID NO: 2 o 4. En algunos modos de realización, los fragmentos englobados en el presente documento resultan de la eliminación del dominio de cristalización en el extremo C, por ejemplo, mediante proteólisis o mediante inserción de un codón finalizador en la secuencia codificante.

5 Las proteínas plaguicidas preferentes de la presente invención se codifican por una secuencia nucleotídica suficientemente idéntica a la secuencia nucleotídica de la SEQ ID NO: 1 o 3, o las proteínas plaguicidas son suficientemente idénticas a la secuencia aminoacídica expuesta en la SEQ ID NO: 2 o 4. Por "suficientemente idéntica" se entiende una secuencia nucleotídica o aminoacídica que tiene al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o mayor de identidad de secuencia en comparación con una secuencia de referencia usando uno de los  
10 programas de alineación descritos en el presente documento que usan parámetros estándar. Un experto en la técnica reconocerá que estos valores se pueden ajustar apropiadamente para determinar la identidad correspondiente de proteínas codificadas por dos secuencias nucleotídicas teniendo en cuenta la redundancia de codones, la similitud de aminoácidos, la posición del marco de lectura y similares.

15 Para determinar el porcentaje de identidad de dos secuencias aminoacídicas o de dos ácidos nucleicos, las secuencias se alinean para propósitos de comparación óptima. El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, porcentaje de identidad = número de posiciones idénticas/número total de posiciones (por ejemplo, posiciones solapantes) x 100). En un modo de realización, las dos secuencias son de la misma longitud. En otro modo de realización, el porcentaje de identidad se calcula en la totalidad de la secuencia de referencia (es decir, la secuencia divulgada en el presente documento como cualquiera de las SEQ ID NO: 1-4). El porcentaje de identidad entre dos secuencias se puede determinar usando técnicas similares a las descritas a continuación, dejando o sin dejar huecos. Al calcular el porcentaje de identidad, típicamente se cuentan los emparejamientos exactos. Un hueco, es decir, una posición en una alineación donde está presente un residuo en una secuencia, pero no en la otra, se considera como una  
20 posición con residuos no idénticos.

La determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias se puede lograr usando un algoritmo matemático. Un ejemplo no limitante 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. Dicho algoritmo se incorpora en los programas BLASTN y BLASTX de Altschul *et al.* (1990) J. Mol. Biol. 215:403. Las búsquedas de nucleótidos con BLAST se pueden realizar con el programa BLASTN, puntuación = 100, longitud de palabra = 12, para obtener secuencias nucleotídicas homólogas a las moléculas de ácido nucleico similar a plaguicida de la invención. Las búsquedas de proteínas con BLAST se pueden realizar con el programa BLASTX, puntuación = 50, longitud de palabra = 3, para obtener secuencias aminoacídicas homólogas a las moléculas de proteína plaguicida de la invención. Para obtener alineaciones con hueco para propósitos de comparación, se puede utilizar Gapped BLAST (en BLAST 2.0) como se describe en Altschul *et al.* (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389. De manera alternativa, se puede usar PSI-Blast para realizar una búsqueda iterativa que detecte las relaciones distantes entre moléculas. Véase Altschul *et al.* (1997) *supra*. Cuando se utilizan los programas BLAST, Gapped BLAST y PSI-Blast, se pueden usar los parámetros por defecto de los programas respectivos (por ejemplo, BLASTX y BLASTN). La alineación también se puede realizar manualmente mediante inspección.

Otro ejemplo no limitante de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de secuencias es el algoritmo de ClustalW (Higgins *et al.* (1994) Nucleic Acids Res. 22:4673-4680). ClustalW compara secuencias y alinea la totalidad de la secuencia de ADN o aminoacídica, y, de esta manera, puede proporcionar datos sobre la conservación de secuencias de toda la secuencia aminoacídica. El algoritmo de ClustalW se usa en varios paquetes de programas informáticos de análisis de ADN/aminoácidos disponibles comercialmente, tales como el módulo ALIGNX de Vector NTI Program Suite (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA). Después de la alineación de las secuencias aminoacídicas con ClustalW, se puede evaluar el porcentaje de identidad aminoacídica. Un ejemplo no limitante de un programa informático útil para el análisis de alineaciones de ClustalW es GENEDOC™. GENEDOC™ (Karl Nicholas) permite la evaluación de la similitud e identidad aminoacídica (o ADN) entre múltiples proteínas. Otro ejemplo no limitante de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de secuencias es el algoritmo de Myers y Miller (1988) CABIOS 4:11-17. Este algoritmo se incorpora al programa ALIGN (versión 2.0), que forma parte del GCG Wisconsin Genetics Software Package, Version 10 (disponible de Accelrys, Inc., 9685 Scranton Rd., San Diego, CA, EE. UU.). Cuando se utiliza el programa ALIGN para comparar secuencias aminoacídicas, se puede usar una tabla de residuos por peso con PAM120, una penalización por longitud de hueco de 12 y una penalización por hueco de 4.

A menos que se indique de otro modo, se usa GAP Versión 10, que usa el algoritmo de Needleman y Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48(3):443-453, para determinar la similitud o identidad de secuencia usando los siguientes parámetros: % de identidad y % de similitud para una secuencia nucleotídica usando un peso de GAP de 50 y un peso de longitud de 3, y la matriz de puntuación nwsgapdna.cmp; % de identidad o % de similitud para una secuencia aminoacídica usando un peso de GAP de 8 y un peso de longitud de 2, y el programa de puntuación BLOSUM62. También se pueden usar programas equivalentes. Por "programa equivalente" se entiende cualquier programa de comparación de secuencias que, para dos secuencias cualquiera en cuestión, genera una alineación que tiene emparejamientos de residuos de nucleótidos idénticos y un porcentaje de identidad de secuencia idéntico

cuando se compara con la alineación correspondiente generada por GAP Version 10.

La invención también engloba moléculas de ácido nucleico variantes siempre que codifiquen un polipéptido que comprenda una secuencia aminoacídica que tenga al menos un 95 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 2 o 4. Las "variantes" de las secuencias nucleotídicas que codifican la proteína plaguicida comprenden las secuencias que codifican las proteínas plaguicidas divulgadas en el presente documento, pero que difieren de forma conservadora debido a la redundancia del código genético, así como las que son suficientemente idénticas como se analiza anteriormente. Las variantes alélicas naturales se pueden identificar con el uso de técnicas de biología molecular bien conocidas, tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y técnicas de hibridación como se esboza a continuación. Las secuencias nucleotídicas variantes también comprenden secuencias nucleotídicas derivadas sintéticamente que se han generado, por ejemplo, usando mutagénesis dirigida a sitio, pero que todavía codifican las proteínas plaguicidas divulgadas en la presente invención como se analiza a continuación. Las proteínas variantes englobadas por la presente invención son biológicamente activas, es decir, continúan poseyendo la actividad biológica deseada de la proteína natural, es decir, la actividad plaguicida. Por "retiene la actividad" se entiende que la variante tiene al menos aproximadamente un 30 %, al menos aproximadamente un 50 %, al menos aproximadamente un 70 % o al menos aproximadamente un 80 % de la actividad plaguicida de la proteína natural. Los procedimientos para medir la actividad plaguicida se conocen bien en la técnica. Véase, por ejemplo, Czapla and 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 de EE. UU. n.º 5.743.477.

El experto en la técnica apreciará adicionalmente que se pueden introducir cambios por mutación de las secuencias nucleotídicas de la invención, dando lugar de este modo a cambios en la secuencia aminoacídica de las proteínas plaguicidas codificadas, sin alterar la actividad biológica de las proteínas. De esta manera, se pueden crear moléculas de ácido nucleico aisladas variantes introduciendo una o más sustituciones, adiciones o deleciones nucleotídicas en la secuencia nucleotídica correspondiente divulgada en el presente documento, de tal manera que se introduzcan una o más sustituciones, adiciones o deleciones aminoacídicas en la proteína codificada siempre que codifiquen un polipéptido que comprenda una secuencia aminoacídica que tenga al menos un 95 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 2 o 4. Las mutaciones se pueden introducir mediante técnicas estándar, tales como mutagénesis dirigida a sitio y mutagénesis mediada por PCR. Dichas secuencias nucleotídicas variantes también están englobadas por la presente invención siempre que codifiquen un polipéptido que comprenda una secuencia aminoacídica que tenga al menos un 95 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 2 o 4.

Por ejemplo, se pueden hacer sustituciones aminoacídicas conservadoras en uno o más residuos de aminoácidos no esenciales previstos. Un residuo de aminoácido "no esencial" es un residuo que se puede alterar a partir de la secuencia natural de una proteína plaguicida sin alterar la actividad biológica, mientras que se requiere un residuo de aminoácido "esencial" para la actividad biológica. Una "sustitución aminoacídica conservadora" es aquella donde el residuo aminoacídico se reemplaza por un residuo aminoacídico que tiene una cadena lateral similar. Las familias de residuos aminoacídicos que tienen cadenas laterales similares se han definido en la técnica. Estas familias comprenden aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales ramificadas en beta (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina).

Se pueden hacer sustituciones aminoacídicas en regiones no conservadas que retienen la función. En general, dichas sustituciones no se hacen para los residuos aminoacídicos conservados, o para los residuos aminoacídicos que residen en un motivo conservado, donde dichos residuos son esenciales para la actividad de la proteína. Los ejemplos de residuos que se conservan y que pueden ser esenciales para la actividad de la proteína comprenden, 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 se conservan, pero que pueden permitir sustituciones aminoacídicas conservadoras y todavía retienen la actividad comprenden, por ejemplo, residuos que únicamente tienen sustituciones conservadoras entre todas las proteínas contenidas en una alineación de toxinas similares o relacionadas con las secuencias de la invención (por ejemplo, residuos que únicamente tienen sustituciones conservadoras entre todas las proteínas contenidas en la alineación de proteínas homólogas). Sin embargo, un experto en la técnica comprende que las variantes funcionales pueden tener alteraciones no conservadas o conservadas menores en los residuos conservados.

De manera alternativa, se pueden hacer secuencias nucleotídicas variantes introduciendo aleatoriamente mutaciones en toda o parte de la secuencia codificante, tales como mediante mutagénesis por saturación, y los mutantes resultantes se pueden cribar frente a su capacidad para conferir actividad plaguicida para identificar mutantes que retienen la actividad. Tras la mutagénesis, la proteína codificada se puede expresar de forma recombinante y la actividad de la proteína se puede determinar usando técnicas de ensayo estándar.

Usando procedimientos tales como PCR, hibridación y similares, se pueden identificar secuencias plaguicidas correspondientes, teniendo dichas secuencias identidad sustancial con respecto a las secuencias de la invención (es decir, siempre que codifiquen un polipéptido que comprenda una secuencia aminoacídica que tenga al menos un 95 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia aminoacídica de SEQ ID NO: 2 o 4). Véase, por ejemplo, Sambrook and Russell (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY) y Innis, *et al.* (1990) *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (Academic Press, NY).

En un procedimiento de hibridación, se puede usar toda o parte de la secuencia nucleotídica plaguicida para cribar genotecas de ADN<sub>g</sub> o ADN<sub>c</sub>. Los procedimientos para la construcción de dichas genotecas de ADN<sub>g</sub> o ADN<sub>c</sub> se conocen generalmente en la técnica y se divulgan en Sambrook y Russell, 2001, *supra*. Las denominadas sondas de hibridación pueden ser fragmentos de ADN genómico, fragmentos de ADN<sub>c</sub>, fragmentos de ARN u otros oligonucleótidos, y se pueden marcar con un grupo detectable, tal como <sup>32</sup>P o cualquier otro marcador detectable, tal como otros radioisótopos, un compuesto fluorescente, una enzima o un cofactor enzimático. Se pueden hacer sondas para hibridación marcando oligonucleótidos sintéticos basándose en la secuencia nucleotídica que codifica la proteína plaguicida conocida divulgada en el presente documento. Se pueden usar adicionalmente cebadores redundantes diseñados basándose en residuos aminoacídicos o nucleótidos conservados en la secuencia nucleotídica o secuencia aminoacídica codificada. La sonda comprende típicamente una región de secuencia nucleotídica que se hibrida en condiciones rigurosas con al menos aproximadamente 12, al menos aproximadamente 25, al menos aproximadamente 50, 75, 100, 125, 150, 175 o 200 nucleótidos consecutivos de una secuencia nucleotídica que codifica una proteína plaguicida de la invención o un fragmento o variante de la misma. Los procedimientos para la preparación de sondas para hibridación se conocen generalmente en la técnica y se divulgan en Sambrook and Russell, 2001, *supra*.

Por ejemplo, se puede usar toda una secuencia plaguicida divulgada en el presente documento, o una o más porciones de la misma, como una sonda que se pueda hibridar específicamente con correspondientes secuencias similares a proteína plaguicida y ARN mensajeros. Para conseguir la hibridación específica en una variedad de condiciones, dichas sondas comprenden secuencias que son únicas y son preferentemente de al menos aproximadamente 10 nucleótidos de longitud o al menos de aproximadamente 20 nucleótidos de longitud. Se pueden usar dichas sondas para amplificar las correspondientes secuencias plaguicidas a partir de un organismo elegido mediante PCR. Se puede usar esta técnica para aislar secuencias codificantes adicionales a partir de un organismo deseado o como un ensayo de diagnóstico para determinar la presencia de secuencias codificantes en un organismo. Las técnicas de hibridación comprenden cribado por hibridación de genotecas sembradas (placas o bien colonias, véase, por ejemplo, Sambrook *et al.* (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2.º ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York).

De esta manera, también se hace referencia a sondas para hibridación, así como secuencias nucleotídicas que se pueden hibridar con toda o una porción de una secuencia nucleotídica de la invención (por ejemplo, al menos aproximadamente 300 nucleótidos, al menos aproximadamente 400, al menos aproximadamente 500, 1000, 1200, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500 o hasta la longitud completa de una secuencia nucleotídica divulgada en el presente documento). La hibridación de dichas secuencias se puede llevar a cabo en condiciones rigurosas. Por "condiciones rigurosas" o "condiciones de hibridación rigurosas" se entiende las condiciones en las que una sonda se hibrida con su secuencia diana hasta un grado detectablemente mayor que con otras secuencias (por ejemplo, al menos 2 veces sobre el fondo). Las condiciones rigurosas son dependientes de la secuencia y son diferentes en diferentes circunstancias. Al controlar la rigurosidad de las condiciones de hibridación y/o lavado, se pueden identificar secuencias diana que son un 100 % complementarias con la sonda (sonda homóloga). De manera alternativa, se pueden ajustar las condiciones de rigurosidad para permitir algún emparejamiento erróneo en las secuencias de modo que se detecten grados más bajos de similitud (sonda heterógena). Generalmente, una sonda es menos de aproximadamente 1000 nucleótidos de longitud, preferentemente menos de 500 nucleótidos de longitud.

Típicamente las condiciones rigurosas son en las que la concentración de sal es más baja de aproximadamente 1,5 M de ion de Na, típicamente de aproximadamente 0,01 a 1,0 M de concentración de ion de Na (u otras sales) a pH 7,0 a 8,3 y la temperatura es al menos de aproximadamente 30 °C para sondas cortas (por ejemplo, de 10 a 50 nucleótidos) y al menos de aproximadamente 60 °C para sondas largas (por ejemplo, mayores de 50 nucleótidos). También se pueden conseguir condiciones rigurosas con la adición de agentes desestabilizantes, tales como formamida. Las condiciones de rigurosidad baja ejemplares comprenden hibridación con una solución tampón de formamida del 30 % al 35 %, NaCl 1 M, SDS (dodecilsulfato de sodio) al 1 % a 37°C y un lavado en 1X a 2X SSC (20X SSC = NaCl 3,0 M/citrato trisódico 0,3 M) a 50 a 55 °C. Las condiciones de rigurosidad moderada ejemplares comprenden hibridación en formamida del 40 al 45 %, NaCl 1,0 M, SDS al 1 % a 37 °C y un lavado en 0,5X a 1X SSC a 55 a 60 °C. Las condiciones de rigurosidad alta ejemplares comprenden hibridación en formamida al 50 %, NaCl 1 M, SDS al 1 % a 37 °C y un lavado en 0,1X SSC a 60 a 65 °C. Opcionalmente, los tampones de lavado pueden comprender aproximadamente SDS del 0,1 % a aproximadamente 1 %. La duración de la hibridación es generalmente de menos de aproximadamente 24 horas, usualmente de aproximadamente 4 a aproximadamente 12 horas.

La especificidad es típicamente la función de los lavados poshibridación, siendo los factores críticos la fuerza iónica

y la temperatura de la solución de lavado final. Para los híbridos ADN-ADN, la  $T_f$  se puede aproximar a partir de la ecuación de Meinkoth y Wahl (1984) Anal. Biochem. 138:267-284:  $T_f = 81,5 \text{ }^\circ\text{C} + 16,6 (\log M) + 0,41 (\%GC) - 0,61 (\% \text{ de form}) - 500/L$ ; donde M es la molaridad de cationes monovalentes, %GC es el porcentaje de nucleótidos de guanosa y citosina en el ADN, % de form es el porcentaje de formamida en la solución de hibridación y L es la longitud del híbrido en pares de bases. La  $T_f$  es la temperatura (bajo fuerza iónica y pH definidos) a la que un 50 % de una secuencia diana complementaria se hibrida con una sonda perfectamente emparejada. La  $T_f$  se reduce en aproximadamente 1 °C por cada 1 % de emparejamiento erróneos; de esta manera, se pueden ajustar la  $T_f$ , hibridación y/o condiciones de lavado para hibridar con secuencias de identidad deseada. Por ejemplo, si se buscan secuencias con  $\geq 90$  % de identidad, se puede disminuir la  $T_f$  10 °C. Generalmente, las condiciones rigurosas se seleccionan para que sean aproximadamente 5 °C más bajas que el punto de fusión térmica ( $T_f$ ) para la secuencia específica y su complemento a una fuerza iónica y pH definidos. Sin embargo, las condiciones fuertemente rigurosas pueden utilizar una hibridación y/o lavado a 1, 2, 3 o 4 °C por debajo del punto de fusión térmica ( $T_f$ ); las condiciones moderadamente rigurosas pueden utilizar una hibridación y/o lavado a 6, 7, 8, 9 o 10 °C por debajo del punto de fusión térmica ( $T_f$ ); las condiciones de rigurosidad baja pueden utilizar una hibridación y/o lavado a 11, 12, 13, 14, 15 o 20 °C por debajo del punto de fusión térmica ( $T_f$ ). Usando la ecuación, las composiciones de hibridación y lavado y la  $T_f$  deseada, los expertos en la técnica comprenderán que las variaciones en la rigurosidad de las soluciones de hibridación y/o lavado se describen de manera inherente. Si el grado deseado de emparejamiento erróneo da como resultado una  $T_f$  de menos de 45 °C (solución acuosa) o 32 °C (solución de formamida), es preferente incrementar la concentración de SSC de modo que se pueda usar una temperatura más alta. Se encuentre 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, New York); y Ausubel *et al.*, eds. (1995) Current Protocols in Molecular Biology, capítulo 2 (Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York). Véase Sambrook *et al.* (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2.º ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York).

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

Las proteínas plaguicidas también están englobadas en la presente invención. Por "proteína plaguicida" se entiende una proteína que tiene la secuencia aminoacídica expuesta en la SEQ ID NO: 2 o 4. También se proporcionan fragmentos, porciones biológicamente activas y variantes de la misma que tengan al menos un 95 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 2 o 4, y se pueden usar para poner en práctica los procedimientos de la presente invención. Una "proteína aislada" o una "proteína recombinante" se usa para hacer referencia a una proteína que ya no está en su entorno natural, por ejemplo, *in vitro* o en una célula huésped vegetal o bacteriana recombinante.

Los "fragmentos" o "porciones biológicamente activas" comprenden fragmentos de polipéptidos que comprenden secuencias aminoacídicas al menos un 95 % idénticas con respecto a la secuencia aminoacídica expuesta en la SEQ ID NO: 2 o 4 y que presentan actividad plaguicida. Una porción biológicamente activa de una proteína plaguicida puede ser un polipéptido que es, por ejemplo, 10, 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1050, 1100, 1150, 1200, 1250, 1300, 1350 o más aminoácidos de longitud. Dichas porciones biológicamente activas se pueden preparar mediante técnicas recombinantes y evaluar frente a su actividad plaguicida. Los procedimientos para medir la actividad plaguicida se conocen bien en la técnica. Véase, por ejemplo, Czaplá and 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 de EE. UU. n.º 5.743.477. Como se usa aquí, un fragmento comprende al menos 8 aminoácidos contiguos de la SEQ ID NO: 2 o 4. Sin embargo, la invención engloba otros fragmentos, tales como cualquier fragmento en la proteína mayor de aproximadamente 10, 20, 30, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1050, 1100, 1150, 1200, 1250, 1300, 1350 o más aminoácidos de longitud.

Por "variantes" se entienden las proteínas o polipéptidos que tienen una secuencia aminoacídica que sea al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia aminoacídica de cualquiera de la SEQ ID NO: 2 o 4. Las variantes también comprenden polipéptidos codificados por una molécula de ácido nucleico que se hibrida con la molécula de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 1 o 3, o un complemento de la misma, en condiciones rigurosas siempre que tengan al menos un 95 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 2 o 4. Las variantes comprenden polipéptidos que difieren en la secuencia aminoacídica debido a mutagénesis siempre que tengan al menos un 95 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 2 o 4. Las proteínas variantes englobadas por la presente invención son biológicamente activas, es decir, continúan poseyendo la actividad biológica deseada de la proteína natural, es decir, que retienen la actividad plaguicida. En algunos modos de realización, las variantes tienen actividad mejorada en relación con la proteína natural. Los procedimientos para medir la actividad plaguicida se conocen bien en la técnica. Véase, por ejemplo, Czaplá and 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 de EE. UU. n.º 5.743.477.

Los genes bacterianos, tales como los genes *axmi* de la presente invención, con bastante frecuencia poseen múltiples codones de inicio de metionina en proximidad al inicio del marco abierto de lectura. Con frecuencia, la iniciación de la traducción en uno o más de estos codones iniciadores da lugar a la generación de una proteína

funcional. Estos codones iniciadores pueden incluir codones ATG. Sin embargo, las bacterias tales como *Bacillus sp.* también reconocen el codón GTG como un codón iniciador, y las proteínas que inician la traducción en los codones GTG contienen una metionina en el primer aminoácido. En raras ocasiones, la traducción en sistemas bacterianos se puede iniciar en un codón TTG, aunque, en este caso, el TTG codifica una metionina. Además, con frecuencia no se determina a *priori* cuáles de estos codones se usan de manera natural en la bacteria. De esta manera, se entiende que el uso de uno de los codones de metionina alternativos también puede dar lugar a la generación de proteínas plaguicidas. Estas proteínas plaguicidas están englobadas en la presente invención y se pueden usar en los procedimientos de la presente invención. Se comprende que, cuando se expresan en plantas, es necesario alterar el codón iniciador alternativo a ATG para su traducción apropiada.

En diversos modos de realización de la presente invención, las proteínas plaguicidas comprenden secuencias aminoácidas deducidas a partir de las secuencias nucleotídicas de longitud completa divulgadas en el presente documento y secuencias aminoácidas que son más cortas que las secuencias de longitud completa debido al uso de un sitio de inicio alternativo en dirección 3'. De esta manera, la secuencia nucleotídica de la invención y/o vectores, células huésped y plantas que comprenden la secuencia nucleotídica de la invención (y procedimientos de fabricación y uso de la secuencia nucleotídica de la invención) pueden comprender una secuencia nucleotídica que codifica una secuencia aminoácida que corresponde a los residuos 2-800 de la SEQ ID NO: 2 (que se expone en el presente documento como la SEQ ID NO: 4), los residuos 35-800 de la SEQ ID NO: 2, los residuos 37-800 de la SEQ ID NO: 2 o los residuos 101-800 de la SEQ ID NO: 2.

También se hace referencia a los anticuerpos para los polipéptidos de la presente invención, o a variantes o fragmentos de los mismos. Los procedimientos para producir anticuerpos se conocen bien en la técnica (véase, por ejemplo, Harlow and Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY; patente de EE. UU. n.º 4.196.265).

De esta manera, también se hace referencia a anticuerpos, moléculas de unión a antígeno monocatenarias u otras proteínas que se unen específicamente a una o más de las moléculas de proteína o péptido de la invención y sus homólogos, fusiones o fragmentos. En un caso particularmente preferente, el anticuerpo se une específicamente a una proteína que tiene la secuencia aminoácida expuesta en la SEQ ID NO: 2 o 4 o un fragmento de la misma. En otro caso, el anticuerpo se une específicamente a una proteína de fusión que comprende una secuencia aminoácida seleccionada de la secuencia aminoácida expuesta en la SEQ ID NO: 2 o 4 o un fragmento de la misma.

Los anticuerpos se pueden usar para detectar cuantitativa o cualitativamente las moléculas de proteína o péptido de la invención o para detectar modificaciones postraduccionales de las proteínas. Como se usa en el presente documento, se dice que un anticuerpo o péptido se "une específicamente" a una molécula de proteína o péptido de la invención si dicha unión no se inhibe competitivamente por la presencia de moléculas no relacionadas.

#### **Variantes alteradas o mejoradas**

Se reconoce que las secuencias de ADN de una proteína plaguicida se pueden alterar mediante diversos procedimientos y que estas alteraciones pueden dar como resultado secuencias de ADN que codifican proteínas con secuencias aminoácidas diferentes de las codificadas por una proteína plaguicida de la presente invención siempre que tengan al menos un 95 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia aminoácida de la SEQ ID NO: 2 o 4. Esta proteína se puede alterar de diversas maneras que comprenden sustituciones, deleciones, truncamientos e inserciones aminoácidas de uno o más aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 o 4, que comprenden hasta aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7, aproximadamente 8, aproximadamente 9, aproximadamente 10, aproximadamente 15, aproximadamente 20, aproximadamente 25, aproximadamente 30, aproximadamente 35, aproximadamente 40, aproximadamente 45, aproximadamente 50, aproximadamente 55, aproximadamente 60, aproximadamente 65, aproximadamente 70, aproximadamente 75, aproximadamente 80, aproximadamente 85, aproximadamente 90, aproximadamente 100, aproximadamente 105, aproximadamente 110, aproximadamente 115, aproximadamente 120, aproximadamente 125, aproximadamente 130, aproximadamente 135, aproximadamente 140, aproximadamente 145, aproximadamente 150, aproximadamente 155 o más sustituciones, deleciones o inserciones aminoácidas. Los procedimientos para dichas manipulaciones se conocen generalmente en la técnica. Por ejemplo, las variantes de secuencias aminoácidas de una proteína plaguicida se pueden preparar mediante mutaciones en el ADN. Esto también se puede lograr mediante una de varias formas de mutagénesis y/o en evolución dirigida. En algunos aspectos, los cambios codificados en la secuencia aminoácida no afectan sustancialmente a la función de la proteína. Dichas variantes poseen la actividad plaguicida deseada. Sin embargo, se comprende que se puede mejorar la capacidad de una proteína plaguicida para conferir actividad plaguicida mediante el uso de dichas técnicas sobre las composiciones de la presente invención. Por ejemplo, se puede expresar una proteína plaguicida en células huésped que presentan altas tasas de incorporación errónea de bases durante la replicación del ADN, tales como XL-1 Red (Stratagene, La Jolla, CA). Después de la propagación en dichas cepas, se puede aislar el ADN (por ejemplo, preparando ADN plasmídico, o amplificando mediante PCR y clonando el fragmento de PCR resultante en un vector), cultivar las mutaciones de proteína plaguicida en una cepa no mutágena e identificar genes mutados con actividad plaguicida, por ejemplo, realizando un ensayo para someter

a prueba la actividad plaguicida. Generalmente, la proteína se mezcla y se usa en los ensayos de alimentación. Véase, por ejemplo, Marrone *et al.* (1985) *J. of Economic Entomology* 78:290-293. Dichos ensayos pueden incluir poner en contacto plantas con una o más plagas y determinar la capacidad de la planta para sobrevivir y/o provocar la muerte de las plagas. Los ejemplos de mutaciones que dan lugar a una toxicidad incrementada se encuentran en Schnepf *et al.* (1998) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:775-806.

De manera alternativa, se pueden hacer alteraciones en la secuencia proteínica de muchas proteínas en el extremo amino o carboxílico sin afectar sustancialmente a la actividad. Esto puede incluir inserciones, deleciones o alteraciones introducidas mediante procedimientos moleculares modernos, tales como PCR, comprendiendo amplificaciones por PCR, que alteren o extiendan la secuencia codificante de proteínas en virtud de la inclusión de secuencias que codifican aminoácidos en los oligonucleótidos utilizados en la amplificación por PCR. De manera alternativa, las secuencias proteínicas añadidas pueden incluir secuencias que codifican proteínas totales, tales como las usadas comúnmente en la técnica para generar fusiones de proteínas. Dichas proteínas de fusión con frecuencia se usan para (1) incrementar la expresión de una proteína de interés (2) introducir un dominio de unión, actividad enzimática o epítipo para facilitar la purificación de proteínas, la detección de proteínas o bien otros usos experimentales conocidos en la técnica (3) seleccionar como diana la secreción o traducción de una proteína en un orgánulo subcelular, tal como el espacio periplásmico de bacterias gramnegativas o el retículo endoplásmico de células eucariotas, el último de los cuales con frecuencia da como resultado la glucosilación de la proteína.

Las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas variantes de la presente invención también engloban secuencias derivadas de procedimientos mutágenos y recombinógenos tales como barajado de ADN siempre que tengan al menos un 95 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 2 o 4. Con dicho procedimiento, se pueden usar una o más regiones codificantes de proteínas plaguicidas diferentes para crear una nueva proteína plaguicida que posea las propiedades deseadas. De esta manera, se generan genotecas de polinucleótidos recombinantes a partir de una población de polinucleótidos de secuencias relacionadas que comprenden regiones de secuencia que tienen identidad de secuencia sustancial y se pueden recombinar de manera homóloga *in vitro* o *in vivo*. Por ejemplo, usando este enfoque, los motivos de secuencia que codifican un dominio de interés se pueden barajar entre un gen plaguicida de la invención y otros genes plaguicidas conocidos para obtener un nuevo gen que codifique una proteína con una propiedad de interés mejorada, tal como una actividad insecticida incrementada. En la técnica se conocen estrategias para dicho barajado de ADN. Véase, por ejemplo, Stemmer (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:10747-10751; Stemmer (1994) *Nature* 370:389-391; Cramer *et al.* (1997) *Nature Biotech.* 15:436-438; Moore *et al.* (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 de EE. UU. n.º 5.605.793 y 5.837.458.

El barajado o intercambio de dominios es otro mecanismo para generar proteínas plaguicidas alteradas. Los dominios se pueden intercambiar entre proteínas plaguicidas, lo que da como resultado toxinas híbridas o quiméricas con espectro diana o actividad plaguicida mejorada. Los procedimientos para generar proteínas recombinantes y someterlas a prueba frente a su actividad plaguicida se conocen bien en la técnica (véase, por ejemplo, Naimov *et al.* (2001) *Appl. Environ. Microbiol.* 67:5328-5330; de Maagd *et al.* (1996) *Appl. Environ. Microbiol.* 62:1537-1543; Ge *et al.* (1991) *J. Biol. Chem.* 266:17954-17958; Schnepf *et al.* (1990) *J. Biol. Chem.* 265:20923-20930; Rang *et al.* (1999) *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 2918-2925).

### **Vectores**

Se puede proporcionar una secuencia plaguicida de la invención en un casete de expresión para su expresión en una planta de interés. Por "casete de expresión vegetal" se entiende una construcción de ADN que puede dar como resultado la expresión de una proteína desde un marco abierto de lectura en una célula vegetal. Típicamente, éstos contienen un promotor y una secuencia codificante. Con frecuencia, dichas construcciones también contienen una región 3' no traducida. Dichas construcciones pueden contener una "secuencia señal" o "secuencia líder" para facilitar el transporte cotraduccional o postraduccional del péptido a determinadas estructuras intracelulares tales como el cloroplasto (u otro plástido), el retículo endoplásmico o el aparato de Golgi.

Por "secuencia señal" se entiende una secuencia que se sabe o sospecha que da lugar a un transporte cotraduccional o postraduccional del péptido en la totalidad de la membrana celular. En eucariotas, esto implica típicamente la secreción en el aparato de Golgi, con alguna glucosilación resultante. Las toxinas insecticidas de las bacterias se sintetizan con frecuencia como protoxinas, que se activan protolíticamente en el intestino de la plaga diana (Chang (1987) *Methods Enzymol.* 153:507-516). En algunos modos de realización de la presente invención, la secuencia señal se localiza en la secuencia natural o se puede derivar de una secuencia de la invención. Por "secuencia líder" se entiende cualquier secuencia que cuando se traduce, da como resultado una secuencia aminoacídica suficiente para activar el transporte cotraduccional de la cadena peptídica a un orgánulo subcelular. De esta manera, esto comprende secuencias líder que seleccionan como diana el transporte y/o glucosilación mediante el paso al retículo endoplásmico, el paso a vacuolas, plástidos, comprendiendo cloroplastos, mitocondrias y similares.

Por "vector de transformación vegetal" se entiende una molécula de ADN que es necesaria para la transformación

eficaz de una célula vegetal. Dicha molécula puede consistir en uno o más casetes de expresión vegetal y se puede organizar en más de una molécula de ADN "vector". Por ejemplo, los vectores binarios son vectores de transformación vegetal que utilizan dos vectores de ADN no contiguos para codificar todas las funciones requeridas que actúan en cis y trans para la transformación de células vegetales (Hellens and Mullineaux (2000) Trends in Plant Science 5:446-451). "Vector" hace referencia a una construcción de ácido nucleico diseñada para transferencia entre diferentes células huésped. "Vector de expresión" hace referencia a un vector que tiene la capacidad de incorporar, integrar y expresar fragmentos o secuencias de ADN heterógenas en una célula exógena. El casete comprende secuencias reguladoras en 5' y/o 3' enlazadas funcionalmente a una secuencia de la invención. Por "enlazada funcionalmente" se entiende un enlace funcional entre un promotor y una segunda secuencia, donde la secuencia promotora inicia y media la transcripción de la secuencia de ADN correspondiente a la segunda secuencia. Generalmente, enlazadas funcionalmente significa que las secuencias de ácido nucleico enlazadas son contiguas y, si fuera necesario, unen dos regiones codificantes de proteínas, contiguas y en el mismo marco de lectura. El casete puede contener adicionalmente al menos un gen adicional para que sea cotransformado en el organismo. De manera alternativa, el/los gen(es) adicional(es) se puede(n) proporcionar en múltiples casetes de expresión.

En diversos modos de realización, la secuencia nucleotídica de la invención está enlazada funcionalmente a un promotor, por ejemplo, un promotor vegetal. "Promotor" hace referencia a una secuencia de ácido nucleico que funciona para dirigir la transcripción de una secuencia codificante en dirección 3'. El promotor, junto con otras secuencias de ácido nucleico reguladoras transcripcionales y traduccionales (también denominadas "secuencias de control"), son necesarios para la expresión de una secuencia de ADN de interés.

Dicho casete de expresión está provisto de una pluralidad de sitios de restricción para la inserción de la secuencia plaguicida para que esté bajo la regulación transcripcional de las regiones reguladoras.

El casete de expresión comprende en la dirección 5'-3' de la transcripción una región de iniciación transcripcional y traduccional (es decir, un promotor), una secuencia de ADN de la invención y una región de terminación traduccional y transcripcional (es decir, región de terminación) funcional en las plantas. El promotor puede ser natural o análogo, o exógeno o heterógeno, con respecto al huésped vegetal y/o a la secuencia de ADN de la invención. Adicionalmente, el promotor puede ser la secuencia natural o, de manera alternativa, una secuencia sintética. Si el promotor es "natural" u "homólogo" con respecto al huésped vegetal, se entiende que el promotor se encuentra en la planta natural donde se introduce el promotor. Cuando el promotor es "exógeno" o "heterógeno" con respecto a la secuencia de ADN de la invención, se entiende que el promotor no sea el promotor natural para la secuencia de ADN enlazada funcionalmente de la invención.

La región de terminación puede ser natural con la región de iniciación transcripcional, puede ser natural con la secuencia de ADN enlazada funcionalmente de interés, puede ser natural con el huésped vegetal o se puede derivar de otra fuente (es decir, exógena o heterógena con respecto al promotor, la secuencia de ADN de interés, el huésped vegetal o cualquier combinación de los mismos). Las regiones de terminación convenientes están disponibles a partir del plásmido Ti de *A. tumefaciens*, tales como las regiones de terminación de octopina sintasa y nopalina sintasa. Véase también Guerineau *et al.* (1991) Mol. Gen. Genet. 262:141-144; Proudfoot (1991) Cell 64:671-674; Sanfacon *et al.* (1991) Genes Dev. 5:141-149; Mogen *et al.* (1990) Plant Cell 2: 1261-1272; Munroe *et al.* (1990) Gene 91:151-158; Ballas *et al.* (1989) Nucleic Acids Res. 17:7891-7903; and Joshi *et al.* (1987) Nucleic Acid Res. 15:9627-9639.

Cuando sea apropiado, el/los gen(es) se puede(n) optimizar para obtener una expresión incrementada en la célula huésped transformada. Es decir, los genes se pueden sintetizar usando codones preferentes por células huésped para obtener una expresión mejorada o se pueden sintetizar usando codones a una frecuencia de uso de codones preferentes por huésped. Generalmente, el contenido en GC del gen se incrementa. Véase, por ejemplo, Campbell and Gowri (1990) Plant Physiol. 92:1-11 para un análisis de un uso de codones preferentes por huésped. Están disponibles en la técnica procedimientos para sintetizar genes preferentes de plantas. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.ºs 5.380.831 y 5.436.391, la publicación de patente de EE.UU. n.º 20090137409 y Murray *et al.* (1989) Nucleic Acids Res. 17:477-498.

En un modo de realización, la proteína plaguicida selecciona como diana el cloroplasto para su expresión. De esta manera, si la proteína plaguicida no se inserta directamente en el cloroplasto, el casete de expresión contendrá adicionalmente un ácido nucleico que codifica un péptido de tránsito para dirigir la proteína plaguicida a los cloroplastos. Dichos péptidos de tránsito se conocen en la técnica. Véase, por ejemplo, Von Heijne *et al.* (1991) Plant Mol. Biol. Rep. 9:104-126; Clark *et al.* (1989) J. Biol. Chem. 264:17544-17550; Della-Cioppa *et al.* (1987) Plant Physiol. 84:965-968; Romer *et al.* (1993) Biochem. Biophys. Res. Commun. 196:1414-1421; and Shah *et al.* (1986) Science 233:478-481.

El gen plaguicida que va a seleccionar como diana el cloroplasto se puede optimizar para su expresión en el cloroplasto para explicar las diferencias en el uso de codones entre el núcleo de la planta y este orgánulo. De esta manera, se pueden sintetizar los ácidos nucleicos de interés usando codones preferentes por cloroplastos. Véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 5.380.831.

### Transformación vegetal

Los procedimientos de la invención implican introducir una construcción nucleotídica en una planta. Por "introducir" se entiende presentar a la planta la construcción nucleotídica de tal manera que la construcción gane acceso al interior de una célula de la planta. Los procedimientos de la invención no requieren que se use ningún procedimiento particular para introducir una construcción nucleotídica en una planta, únicamente que la construcción nucleotídica gane acceso al interior de al menos una célula de la planta. Los procedimientos para introducir construcciones nucleotídicas en plantas se conocen en la técnica comprendiendo, pero sin limitarse a, procedimientos de transformación estable, procedimientos de transformación transitoria y procedimientos mediados por virus.

Por "planta" se entiende plantas enteras, órganos de planta (por ejemplo, hojas, tallos, raíces, etc.), semillas, células vegetales, propágulos, embriones y progenie de los mismos. Las células vegetales pueden estar diferenciadas o no diferenciadas (por ejemplo, callo, células de 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 de estable" hace referencia a plantas que tienen incorporadas o integradas secuencias de ácido nucleico exógenas o fragmentos de ADN en la célula vegetal. Estas secuencias de ácido nucleico comprenden 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. "Heterógenas" hace referencia generalmente a las secuencias de ácido nucleico que no son endógenas a la célula o parte del genoma natural donde están presentes, y se han añadido a la célula mediante infección, transfección, microinyección, electroporación, microproyección o similares.

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

La transformación de las células vegetales se puede lograr mediante una de varias técnicas conocidas en la técnica. El gen plaguicida de la invención se puede modificar para obtener o potenciar la expresión en las células vegetales. Típicamente una construcción que expresa dicha proteína contiene un promotor para impulsar la transcripción del gen, así como una región 3' no traducida para permitir la terminación de la transcripción y la poliadenilación. La organización de dichas construcciones se conoce bien en la técnica. En algunos casos, puede ser útil genomanipular el gen de tal manera que se secrete el péptido resultante, o, de otro modo, se seleccione como diana en la célula vegetal. Por ejemplo, se puede genomanipular el gen para que contenga un péptido señal para facilitar la transferencia del péptido al retículo endoplásmico. También puede ser preferente genomanipular los casetes de expresión vegetal para que contengan un intrón, de manera que se requiera el procesamiento del ARNm del intrón para la expresión.

Típicamente, este "casete de expresión vegetal" se inserta en un "vector de transformación vegetal". Este vector de transformación vegetal puede comprender uno o más vectores de ADN necesarios para conseguir la transformación vegetal. Por ejemplo, es una práctica común en la técnica utilizar vectores de transformación vegetal que comprendan más de un segmento de ADN contiguo. Estos vectores se denominan con frecuencia en la técnica "vectores binarios". Los vectores binarios, así como los vectores con plásmidos auxiliares, se usan con mucha frecuencia para la transformación mediada por *Agrobacterium*, donde el tamaño y complejidad de los segmentos de ADN necesarios para conseguir una transformación eficaz es bastante grande, y es ventajoso separar funciones en moléculas de ADN separadas. Los vectores binarios contienen típicamente un vector plasmídico que contiene las secuencias que actúan en cis requeridas para la transferencia de ADN-T (tal como el borde izquierdo y el borde derecho), un marcador seleccionable que se genomanipula para que se pueda expresar en una célula vegetal y un "gen de interés" (un gen genomanipulado para que se pueda expresar en una célula vegetal para la que se desea la generación de plantas transgénicas). También están presentes en este vector plasmídico secuencias requeridas para la replicación bacteriana. Las secuencias que actúan en cis están dispuestas de una manera que permitan la transferencia eficaz en las células vegetales y la expresión en las mismas. Por ejemplo, el gen marcador seleccionable y el gen plaguicida están localizados entre los bordes izquierdo y derecho. Con frecuencia, un segundo vector plasmídico contiene los factores que actúan en trans que median la transferencia de ADN-T desde *Agrobacterium* a las células vegetales. Este plásmido contiene con frecuencia 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 la transferencia de ADN mediada por vir, como se entiende en la técnica (Hellens and Mullineaux (2000) Trends in Plant Science 5:446-451). Se pueden usar varios tipos de cepas de *Agrobacterium* (por ejemplo, LBA4404, GV3101, EHA101, EHA105, etc.) para la transformación vegetal. El segundo vector plasmídico no es necesario para transformar las plantas mediante otros procedimientos tales como microproyección, microinyección, electroporación, polietilenglicol, etc.

En general, los procedimientos de transformación vegetal implican la transferencia de ADN heterógeno en células

vegetales diana (por ejemplo, embriones maduros o no maduros, cultivos en suspensión, callo no diferenciado, protoplastos, etc.), seguido de la aplicación de un nivel umbral máximo de selección apropiada (dependiendo del gen marcador seleccionable) para recuperar las células vegetales transformadas a partir de un grupo de masa celular no transformada. Los explantes se transfieren típicamente a un nuevo suministro del mismo medio y se cultivan de manera rutinaria. Posteriormente, las células transformadas se diferencian en brotes después de su disposición en un medio de regeneración complementado con un nivel de umbral máximo de agente de selección. A continuación, los brotes se transfieren a un medio de enraizamiento selectivo para recuperar la plántula o brote enraizado. A continuación, la plántula transgénica se convierte en una planta madura y produce semillas fértiles (por ejemplo, Hiei *et al.* (1994) *The Plant Journal* 6:271-282; Ishida *et al.* (1996) *Nature Bio-technology* 14:745-750). Los explantes se transfieren típicamente a un nuevo suministro del mismo medio y se cultivan de manera rutinaria. Se encuentra una descripción general de las técnicas y procedimientos para generar plantas transgénicas en Ayres and Park (1994) *Critical Reviews in Plant Science* 13:219-239 y Bommineni and Jauhar (1997) *Maydica* 42:107-120. Puesto que el material transformado contiene muchas células, están presentes tanto las células transformadas como las no transformadas en cualquier porción de callo o tejido o grupo de células diana objetivo. La capacidad para destruir las células no transformadas y permitir que las células transformadas proliferen da como resultado cultivos de plantas transformadas. Con frecuencia, la capacidad para eliminar las células no transformadas es una limitación a la rápida recuperación de las células vegetales transformadas y la generación con éxito de plantas transgénicas.

Los protocolos de transformación, así como los protocolos para introducir secuencias nucleotídicas en plantas, pueden variar dependiendo del tipo de planta o célula vegetal, es decir, monocotiledónea o dicotiledónea, seleccionada como diana para la transformación. La generación de plantas transgénicas se puede realizar mediante uno de varios procedimientos, comprendiendo, pero sin limitarse a, microinyección, electroporación, transferencia génica directa, introducción de ADN heterógeno por *Agrobacterium* en células vegetales (transformación mediada por *Agrobacterium*), bombardeo de células vegetales con ADN exógeno y heterógeno adherido a partículas, aceleración de partículas balísticas, transformación por haz de aerosol (solicitud de EE. UU. publicada n.º 2001926941, patente de EE. UU. n.º 4.945.050, publicación internacional n.º WO 91/00915, solicitud publicada n.º 2002015066), transformación de Lec1 y diversos otros procedimientos no mediados directamente por partículas para transferir ADN.

Se conocen en la técnica procedimientos para la transformación de cloroplastos. Véase, por ejemplo, Svab *et al.* (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:8526-8530; Svab and Maliga (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:913-917; Svab and Maliga (1993) *EMBO J.* 12:601-606. El procedimiento se basa en la administración de un cañón de partículas de ADN que contiene un marcador seleccionable y la selección como diana del ADN con respecto al genoma del plástido a través de recombinación homóloga. Adicionalmente, la transformación de plástidos se puede lograr mediante transactivación de un transgén silencioso transmitido por plástidos mediante la expresión preferente de tejido de una ARN polimerasa codificada a nivel nuclear y dirigida por plástidos. Se ha informado de dicho sistema en McBride *et al.* (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:7301-7305.

Tras la integración de ADN exógeno y heterógeno en células vegetales, a continuación, 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 recién preparado. Mediante paso continuo y exposición con una selección apropiada, se identifican y hacen proliferar las células que se transforman con el vector plasmídico. A continuación, se pueden usar los procedimientos moleculares y bioquímicos para confirmar la presencia del gen heterógeno integrado de interés en el genoma de la planta transgénica.

Las células que se han transformado se pueden convertir en plantas según formas convencionales. Véase, por ejemplo, McCormick *et al.* (1986) *Plant Cell Reports* 5:81-84. A continuación, estas plantas se pueden cultivar, y polinizar con la misma cepa transformada o bien cepas diferentes y el híbrido resultante tiene expresión constitutiva de la característica fenotípica deseada identificada. Se pueden cultivar dos o más generaciones para asegurar que la expresión de la característica fenotípica deseada se mantiene y se hereda de manera de estable y, a continuación, se pueden recoger las semillas para asegurar que se ha conseguido la expresión de la característica fenotípica deseada. De esta manera, la presente invención proporciona una semilla transformada (también denominada "semilla transgénica") que tiene una construcción nucleotídica de la invención, por ejemplo, un casete de expresión de la invención, incorporada de manera de estable en su genoma.

#### **Evaluación de la transformación vegetal**

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

El análisis por PCR es un procedimiento rápido para cribar brotes, tejidos o células transformadas frente a la presencia de un gen incorporado en la etapa anterior antes de su trasplante en el suelo (Sambrook and Russell (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY). La PCR se lleva a cabo usando cebadores oligonucleotídicos específicos para el gen de interés o vector de

*Agrobacterium*, etc.

La transformación vegetal se puede confirmar mediante análisis de bandas Southern de ADN genómico (Sambrook and Russell, 2001, *supra*). 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. A continuación, la membrana o "banda" se sondea con, por ejemplo, un fragmento de ADN diana radiomarcado con <sup>32</sup>P para confirmar la integración del gen introducido en el genoma de la planta según técnicas estándar (Sambrook and Russell, 2001, *supra*).

En el análisis de bandas Northern, el ARN se aísla a partir de tejidos específicos de transformante, se fracciona en un gel de agarosa en formaldehído y se transfiere a un filtro de nailon según procedimientos estándar que se usan de manera rutinaria en la técnica (Sambrook and Russell, 2001, *supra*). A continuación, se somete a prueba la expresión del ARN codificado por el gen plaguicida hibridando el filtro con una sonda radiactiva derivada de un gen plaguicida mediante procedimientos conocidos en la técnica (Sambrook and Russell, 2001, *supra*).

Se pueden llevar a cabo ensayos bioquímicos, de bandas Western y similares en las plantas transgénicas para confirmar la presencia de una proteína codificada por el gen plaguicida mediante procedimientos estándar (Sambrook and Russell, 2001, *supra*) usando anticuerpos que se unen a uno o más epítopos presentes en la proteína plaguicida.

### **Actividad plaguicida en plantas**

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

Se han desarrollado una serie de marcadores para su uso con células vegetales, tales como resistencia a cloranfenicol, el aminoglucósido G418, higromicina o similares. También se pueden usar otros genes que codifican un producto implicado en el metabolismo del cloroplasto como marcadores seleccionables. Por ejemplo, los genes que proporcionan resistencia a herbicidas de plantas, tales como glifosato, bromoxinil o imidazolinona, pueden encontrar un uso particular. Se ha informado de dichos genes (Stalker *et al.* (1985) J. Biol. Chem. 263:6310-6314 (gen de la nitrilasa de resistencia a bromoxinil); y Sathasivan *et al.* (1990) Nucl. Acids Res. 18:2188 (gen de resistencia a imidazolinona AHAS). Adicionalmente, los genes divulgados en el presente documento son útiles como marcadores para evaluar la transformación de células bacterianas o vegetales. Los procedimientos para detectar la presencia de un transgén en una planta, órgano de planta (por ejemplo, hojas, tallos, raíces, etc.), semilla, célula vegetal, propágulo, embrión o progenie de los mismos se conocen bien en la técnica. En un modo de realización, la presencia del transgén se detecta sometiendo a prueba frente a la actividad plaguicida.

Las plantas fértiles que expresan una proteína plaguicida se pueden someter a prueba frente a la actividad plaguicida, y las plantas que muestran una actividad óptima se pueden seleccionar para su reproducción adicional. En la técnica están disponibles procedimientos para someter a ensayo la actividad de la plaga. Generalmente, la proteína se mezcla y se usa en los ensayos de alimentación. Véase, por ejemplo, Marrone *et al.* (1985) J. of Economic Entomology 78:290-293.

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

Las verduras comprenden, pero no se limitan a, tomates, lechuga, judías verdes, judías de Lima, guisantes y miembros del género *Curcumis*, tales como pepino, cantalupo y melón bordado. Las plantas ornamentales comprenden, pero no se limitan a, azalea, hortensia, hibisco, rosas, tulipanes, narcisos, petunias, claveles, flor de Pascua y crisantemo. Preferentemente, las plantas de la presente invención son plantas de cultivo (por ejemplo, maíz, sorgo, trigo, girasol, tomate, crucíferas, pimientos, patata, algodón, arroz, soja, remolacha azucarera, caña de azúcar, tabaco, cebada, planta de colza, etc.).

### **Uso en el control plaguicida**

En la técnica se conocen procedimientos generales para emplear cepas que comprenden una secuencia nucleotídica de la presente invención, o una variante de la misma, en el control de plagas o en la genomaniplación de otros organismos como agentes plaguicidas. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.º 5.039.523 y EP 0480762A2.

Se pueden usar las cepas de *Bacillus* que contienen una secuencia nucleotídica de la presente invención, o una variante de la misma, o los microorganismos que se han alterado genéticamente para que contengan un gen plaguicida de la invención y proteína para proteger productos y cultivos agrícolas de plagas. En un aspecto de la invención, se tratan células enteras, es decir, no lisadas de un organismo que produce toxina (plaguicida) con reactivos que prolongan la actividad de la toxina producida en la célula cuando la célula se aplica al entorno de la(s) plaga(s) diana.

De manera alternativa, el plaguicida se produce introduciendo un gen plaguicida en un huésped celular. La expresión del gen plaguicida da como resultado, directa o indirectamente, el mantenimiento y producción intracelular del plaguicida. En un aspecto de la presente invención, a continuación, estas células se tratan en condiciones que prolongan la actividad de la toxina producida en la célula cuando se aplica la célula al entorno de la(s) plaga(s) diana. El producto resultante retiene la toxicidad de la toxina. A continuación, estos plaguicidas encapsulados de manera natural se pueden formular según técnicas convencionales para su aplicación al entorno que hospeda una plaga diana, por ejemplo, suelo, agua y follaje de plantas. Véase, por ejemplo, el documento EPA 0192319, y las referencias citadas en el mismo. De manera alternativa, se pueden formular las células que expresan un gen de la presente invención para permitir la aplicación del material resultante como plaguicida.

Los ingredientes activos de la presente invención se aplican normalmente en forma de composiciones y se pueden aplicar al área de cultivo o planta que se va a tratar, simultánea o sucesivamente, con otros compuestos. Estos compuestos pueden ser fertilizantes, herbicidas, crioprotectores, tensioactivos, detergentes, jabones plaguicidas, aceites para el reposo vegetativo, polímeros y/o formulaciones de vehículos biodegradables o de liberación prolongada que permitan la dosificación a largo plazo de un área diana tras una única aplicación de la formulación. También pueden ser herbicidas selectivos, insecticidas químicos, viricida, microbicidas, amibicidas, plaguicidas, fungicidas, bactericidas, nematocidas, molusquicidas o mezclas de varias de estas preparaciones, si se desea, junto con adyuvantes que promueven la aplicación, tensioactivos o vehículos agrícolamente aceptables empleados habitualmente en el arte de la formulación. Los vehículos y adyuvantes adecuados pueden ser sólidos o líquidos y corresponden a las sustancias empleadas ordinariamente en la tecnología de formulación, por ejemplo, sustancias minerales naturales o regeneradas, disolventes, dispersantes, agentes humectantes, agentes de pegajosidad, aglutinantes o fertilizantes. Asimismo, se pueden preparar las formulaciones en "cebos" comestibles o diseñar en "trampas" para plagas para permitir la alimentación o ingestión por una plaga diana de la formulación plaguicida.

Los procedimientos de aplicación de un ingrediente activo de la presente invención o una composición agroquímica de la presente invención que contiene al menos una de las proteínas plaguicidas producidas por las cepas bacterianas de la presente invención comprenden la aplicación a las hojas, recubrimiento de las semillas y aplicación al suelo. El número de aplicaciones y la tasa de aplicación dependen de la intensidad de la infestación por la plaga correspondiente.

La presente invención también proporciona una composición que comprende el polipéptido de la invención. La composición se puede formular como un polvo, microesfera, gránulo, pulverización, emulsión, coloide, solución o similares, y se puede preparar mediante medios convencionales como desecación, liofilización, homogeneización, extracción, filtración, centrifugación, sedimentación o concentración de un cultivo de células que comprende el polipéptido. En todas de dichas composiciones que contienen al menos uno de dichos polipéptidos plaguicidas, el polipéptido puede estar presente en una concentración de desde aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 99 % en peso.

Las plagas de lepidópteros, hemípteros, dípteros o coleópteros se pueden destruir o reducir en número en un área dada mediante los procedimientos de la invención o se pueden aplicar profilácticamente a un área del entorno para prevenir la infestación por una plaga susceptible. Preferentemente, la plaga ingiere, o se pone en contacto con, una cantidad plaguicidamente eficaz del polipéptido. Por "cantidad plaguicidamente eficaz" se entiende una cantidad del plaguicida que puede producir la muerte de al menos una plaga, o reducir notablemente el crecimiento de plagas, la alimentación o el desarrollo fisiológico normal. Esta cantidad varía dependiendo de factores tales como, por ejemplo, las plagas diana específicas que se van a controlar, el entorno específico, la localización, la planta, el cultivo o el sitio agrícola que se va a tratar, las condiciones del entorno y el procedimiento, la tasa, la concentración, la estabilidad y la cantidad de aplicación de la composición polipeptídica plaguicidamente eficaz. Las formulaciones también pueden variar con respecto a las condiciones climáticas, consideraciones del entorno y/o frecuencia de aplicación y/o gravedad de la infestación por plagas.

Las composiciones plaguicidas descritas se pueden preparar formulando la célula bacteriana, el cristal y/o la suspensión de esporas o bien el componente proteico aislado con el vehículo agrícolamente aceptable deseado. Las composiciones se pueden formular antes de su administración en un medio apropiado tal como liofilizado,

criodesecado, desecado, o en un vehículo, medio o diluyente adecuado acuoso, tal como solución salina u otro tampón. Las composiciones formuladas pueden estar en forma de un polvo o material granulado, o una suspensión en aceite (vegetal o mineral), o emulsiones de aceite/agua o agua, o como un polvo humectable, o en combinación con cualquier otro material de vehículo adecuado para su aplicación agrícola. Los vehículos agrícolas adecuados pueden ser sólidos o líquidos y se conocen bien en la técnica. El término "vehículo agrícola aceptable" abarca todos los adyuvantes, componentes inertes, dispersantes, tensioactivos, agentes de pegajosidad, aglutinantes, etc., que se usan ordinariamente en la tecnología de formulación de plaguicidas; estos se conocen bien por los expertos en la formulación de plaguicidas. Las formulaciones se pueden mezclar con uno o más adyuvantes sólidos o líquidos y preparar mediante diversos medios, por ejemplo, mezclando, combinando y/o triturando homogéneamente la composición plaguicida con adyuvantes adecuados usando técnicas de formulación convencionales. Las formulaciones y procedimientos de aplicación adecuados se describen en la patente de EE. UU. n.º 6.468.523.

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

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

El orden *Diptera* comprende los subórdenes *Nematocera*, *Brachycera* y *Cyclorrhapha*. El suborden *Nematocera* comprende las familias *Tipulidae*, *Psychodidae*, *Culicidae*, *Ceratopogonidae*, *Chironomidae*, *Simuliidae*, *Bibionidae* y *Cecidomyiidae*. El suborden *Brachycera* comprende las familias *Stratiomyidae*, *Tabanidae*, *Therevidae*, *Asilidae*, *Mydidae*, *Bombyliidae* y *Dolichopodidae*. El suborden *Cyclorrhapha* comprende los tipos *Aschiza* y *Aschiza*. El tipo *Aschiza* comprende las familias *Phoridae*, *Syrphidae* y *Conopidae*. El tipo *Aschiza* comprende las secciones *Acalyptratae* y *Calypttratae*. La sección *Acalyptratae* comprende las familias *Otitidae*, *Tephritidae*, *Agromyzidae* y *Drosophilidae*. La sección *Calypttratae* comprende las familias *Hippoboscidae*, *Oestridae*, *Tachinidae*, *Anthomyiidae*, *Muscidae*, *Calliphoridae* y *Sarcophagidae*.

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

Las plagas de insectos de la invención para los cultivos principales comprenden: Maíz: *Ostrinia nubilalis*, taladro del maíz europeo; *Agrotis ipsilon*, cucumilla negra; *Helicoverpa zea*, gusano del maíz; *Spodoptera frugiperda*, gusano trozador; *Diatraea grandiosella*, taladro del maíz del sudoeste; *Elasmopalpus lignosellus*, taladrador menor del maíz; *Diatraea saccharalis*, taladrador de la caña de azúcar; *Diabrotica virgifera*, gusano de la raíz del maíz; *Diabrotica longicornis barberi*, gusano de la raíz del maíz; *Diabrotica undecimpunctata howardi*, gusano de la raíz del maíz; *Melanotus* spp., gusanos de alambre; *Cyclocephala borealis*, escarabajo enmascarado del norte (gusano blanco); *Cyclocephala immaculata*, escarabajo enmascarado del sur (gusano blanco); *Popillia japonica*, escarabajo japonés; *Chaetocnema pulicaria*, pulguilla del maíz; *Sphenophorus maidis*, gorgojo del maíz; *Rhopalosiphum maidis*, pulgón verde del maíz; *Anuraphis maidiradicis*, pulgon de la raíz del maíz; *Blissus leucopterus*, chinche de los cereales; *Melanoplus femurrubrum*, saltamontes de patas rojas; *Melanoplus sanguinipes*, saltamontes migratorio; *Hylemyaplatura*, mosca de la semilla; *Agromyza parvicornis*, minador de la hoja del maíz; *Anaphothrips obscurus*, tripsos de las gramíneas; *Solenopsis milesta*, hormiga ladrona; *Tetranychus urticae*, araña de las legumbres; Sorgo: *Chilo partellus*, taladro del sorgo; *Spodoptera frugiperda*, gusano trozador; *Helicoverpa zea*, gusano del maíz; *Elasmopalpus lignosellus*, taladrador menor del maíz; *Feltia subterranea*, gusano de piel granulada; *Phyllophaga crinita*, gusano blanco; *Eleodes*, *Conoderus* y *Aeolus* spp., gusanos de alambre; *Oulema melanopus*, criocero de los cereales; *Chaetocnema pulicaria*, pulguilla del maíz; *Sphenophorus maidis*, gorgojo del maíz; *Rhopalosiphum maidis*, pulgón verde del maíz; *Sipha flava*, pulgón amarillo de la caña de azúcar; *Blissus leucopterus*, chinche de los cereales; *Contarinia sorghicola*, cecidemia del sorgo; *Tetranychus cinnabarinus*, araña roja carmín; *Tetranychus urticae*, araña amarilla común; Trigo: *Pseudaletia unipunctata*, gusano común; *Spodoptera frugiperda*, gusano trozador; *Elasmopalpus lignosellus*, taladrador menor del maíz; *Agrotis orthogonia*, agrotis occidental; *Elasmopalpus lignosellus*, taladrador menor del maíz; *Oulema melanopus*, criocero de los cereales; *Hypera punctata*, fitónomo del trébol; *Diabrotica undecimpunctata howardi*, gusano de la raíz del maíz; pulgón ruso del trigo; *Schizaphis graminum*,

pulgón verde; *Macrosiphum avenae*, pulgón de la espiga; *Melanoplus femurrubrum*, saltamontes de patas rojas; *Melanoplus differentialis*, saltamontes diferencial; *Melanoplus sanguinipes*, saltamontes migratorio; *Mayetiola destructor*, mosca de Hesse; *Sitodiplosis mosellana*, mosquito del trigo; *Meromyza americana*, gusanillo del tallo del trigo; *Hylemya coarctata*, mosca gris del trigo; *Frankliniella fusca*, tripsidos del tabaco; *Cephus cinctus*, gusano esqueletizador de la hoja; *Aceria tulipae*, ácaro blanco del bulbo; Girasol: *Suleima helianthana*, polilla de la yema de girasol; *Homoeosoma electellum*, palomilla de la cabezuela; *Zygogramma exclamationis*, escarabajos del girasol; *Bothyrus gibbosus*, escarabajo de la zanahoria; *Neolasioptra murtfeldiana*, mosquito de la semilla del girasol; Algodón: *Heliothis virescens*, gusano del algodón; *Helicoverpa zea*, gusano bellotero del algodón; *Spodoptera exigua*, gardama de la remolacha; *Pectinophora gossypiella*, gusano rosado del algodono; *Anthonomus grandis*, picudo del algodono; *Aphis gossypii*, pulgón del algodón; *Pseudatomoscelis seriatus*, saltamontes del algodón; *Trialetrodes abutilonea*, mosca blanca con bandas; *Lygus lineolaris*, chinche; *Melanoplus femurrubrum*, saltamontes de patas rojas; *Melanoplus* saltamontes diferencial; *Thrips tabaci*, tripsidos de la cebolla; *Frankliniella fusca*, tripsidos del tabaco; *Tetranychus cinnabarinus*, araña roja carmín; *Tetranychus urticae*, araña amarilla común; Arroz: *Diatraea saccharalis*, taladrador de la caña de azúcar; *Spodoptera frugiperda*, gusano trozador; *Helicoverpa zea*, gusano del maíz; *Colaspis brunnea*, *colaspis* de uva; *Lissorhoptus oryzophilus*, picudo acuático; *Sitophilus oryzae*, gorgojo del arroz; *Nephotettix nigropictus*, saltahojas del arroz; *Blissus leucopterus*, chinche de los cereales; *Acrosternum hilare*, chinche verde hedionda; Soja: *Pseudopiusia includens*, gusano medidor de la soja; *Anticarsia gemmatalis*, oruga de las leguminosas; *Plathypena scabra*, gusano verde del trébol; *Ostrinia nubilalis*, taladro del maíz europeo; *Agrotis ipsilon*, cucumilla negra; *Spodoptera exigua*, gardama de la remolacha; *Heliothis virescens*, gusano del algodón; *Helicoverpa zea*, gusano bellotero del algodón; *Epilachna varivestis*, gorgojo mejicano de las habas; *Myzus persicae*, pulgón verde del melocotonero; *Empoasca fabae*, saltahojas de la patata; *Acrosternum hilare*, chinche verde hedionda; *Melanoplus femurrubrum*, saltamontes de patas rojas; *Melanoplus differentialis*, saltamontes diferencial; *Hylemya platyura*, mosca de la semilla; *Sericothrips variabilis*, tripsidos de la soja; *Thrips tabaci*, tripsidos de la cebolla; *Tetranychus turkestanii*, araña de la fresa; *Tetranychus urticae*, araña amarilla común; Cebada: *Ostrinia nubilalis*, taladro del maíz europeo; *Agrotis ipsilon*, cucumilla negra; *Schizaphis graminum*, pulgón verde; *Blissus leucopterus*, chinche de los cereales; *Acrosternum hilare*, chinche verde hedionda; *Euschistus servus*, chinche parda hedionda; *Delia platyura* mosca de la semilla; *Mayetiola destructor*, mosca de Hesse; *Petrobia latens*, ácaro marrón del trigo; Planta de colza: *Brevicoryne brassicae*, pulgón de la col; *Phyllotreta cruciferae*, pulguilla; *Mamestra configurata*, gusano de las crucíferas; *Plutella xylostella*, palomilla de dorso diamante; *Delia ssp.*, moscas de la raíz.

Los nematodos comprenden nematodos parásitos, tales como nematodos lesionadores, del quiste y de los nudos de la raíz, comprendiendo *Heterodera* spp., *Meloidogyne* spp. y *Globodera* spp.; particularmente miembros de los nematodos del quiste, comprendiendo, pero sin limitarse a, *Heterodera glycines* (nematodo del quiste de la soja); *Heterodera schachtii* (nematodo del quiste de la remolacha); *Heterodera avenae* (nematodo del quiste de los cereales); y *Globodera rostochiensis* y *Globodera pallida* (nematodos del quiste de la patata). Los nematodos lesionadores comprenden *Pratylenchus* spp.

#### Procedimientos para incrementar el rendimiento de la planta

Se proporcionan procedimientos para incrementar el rendimiento de la planta. En particular, la presente invención proporciona un procedimiento para incrementar el rendimiento en una planta que comprende cultivar en un campo una planta o una semilla de la misma que tiene incorporada de manera de estable en su genoma una construcción de ADN que comprende una molécula de ácido nucleico recombinante de la invención; donde dicho campo está infestado con una plaga frente a la que dicho polipéptido tiene actividad plaguicida. Los procedimientos comprenden proporcionar una planta o célula vegetal que expresa un polinucleótido que codifica la secuencia polipeptídica plaguicida divulgada en el presente documento y cultivar la planta o una semilla de la misma en un campo infestado con (o susceptible de infestación por) una plaga frente a la que dicho polipéptido tiene actividad plaguicida. En algunos modos de realización, el polipéptido tiene actividad plaguicida frente a una plaga de lepidópteros, coleópteros, dípteros, hemípteros o nemátodos, y dicho campo está infestado con una plaga de lepidópteros, hemípteros, coleópteros, dípteros o nemátodos. Como se define en el presente documento, el "rendimiento" de la planta hace referencia a la calidad y/o cantidad de biomasa producida por la planta. Por "biomasa" se entiende cualquier producto vegetal medido. Un incremento en la producción de biomasa es cualquier mejora en el rendimiento del producto vegetal medido. El incremento del rendimiento de la planta tiene varias aplicaciones comerciales. Por ejemplo, el incremento de la biomasa foliar de la planta puede incrementar el rendimiento de las hortalizas de hoja para el consumo humano o animal. Adicionalmente, el incremento de la biomasa foliar se puede usar para incrementar la producción de productos industriales o farmacéuticos derivados de plantas. Un incremento en el rendimiento puede comprender cualquier incremento estadísticamente significativo comprendiendo, pero sin limitarse a, al menos un incremento de un 1 %, al menos un incremento de un 3 %, al menos un incremento de un 5 %, al menos un incremento de un 10 %, al menos un incremento de un 20 %, al menos un 30 %, al menos un 50 %, al menos un 70 %, al menos un 100 % o un incremento mayor en el rendimiento en comparación con una planta que no expresa la secuencia plaguicida. En procedimientos específicos, el rendimiento de la planta se incrementa como resultado de una mejor resistencia a plagas de una planta que expresa una proteína plaguicida divulgada en el presente documento. La expresión de la proteína plaguicida da como resultado una capacidad reducida de una plaga para infestar o alimentarse.

Las plantas también se pueden tratar con una o más composiciones químicas, comprendiendo uno o más

herbicidas, insecticidas o fungicidas. Las composiciones químicas ejemplares comprenden: Herbicidas de frutas/verduras: atracina, bromacilo, diurón, glifosato, linurón, metribuzina, simazina, trifluralina, fluazifop, glufosinato, halosulfurón Gowan, paraquat, propizamida, setoxidim, butafenacil, halosulfurón, indaziflam; Insecticidas de frutas/verduras: aldicarb, *Bacillus thuringiensis*, carbaril, carbofurano, clorpirifos, cipermetrina, deltametrina, abamectina, ciflutrina/beta-ciflutrina, esfenvalerato, lambda-cialotrina, acequinocilo, bifenazato, metoxifenocida, novalurón, cromafenocida, tiacloprid, dinotefurano, fluacripirim, espiroclifeno, gamma-cialotrina, espiromesifeno, espinosad, rinaxipir, ciazipir, triflumurón, espirotetramato, imidacloprid, flubendiamida, tiodicarb, metaflumizona, sulfoxaflor, ciflufetofeno, cianopirafeno, clotianidina, tiametoxam, espinotoram, tiodicarb, flonicamida, metiocarb, benzoato de emamectina, indoxacarb, fenamifos, piriproxifeno, óxido de fenbutaestán; Fungicidas de frutas/verduras: ametoctradina, azoxistrobina, bentiavalicarb, boscalid, captán, carbendazima, clorotalonil, cobre, ciazofamida, ciflufenamida, cimoxanilo, ciproconazol, ciprodinil, difenoconazol, dimetomorf, ditianona, fenamidona, fenhexamida, fluazinam, fludioxonil, fluopicolido, fluopiram, fluoxastrobina, fluxapiraxad, folpet, fosetil, iprodiona, iprovalicarb, isopirazam, cresoxim metilo, mancozeb, mandipropamida, metalaxil/mefenoxam, metiram, metrafenona, miclobutanilo, penconazol, pentiopirad, picoxistrobina, propamocarb, propiconazol, propineb, proquinazid, protioconazol, piraclostrobina, pirimetanil, quinoxifeno, espiroxamina, azufre, tebuconazol, metil-tiofanato, trifloxistrobina; Herbicidas de cereales: 2,4-D, amidosulfurón, bromoxinil, carfentrazona-E, clorotolurón, clorsulfurón, clodinafop-P, clopiralida, dicamba, diclofop-M, diflufenicán, fenoxaprop, florasulam, flucarbazona-NA, flufenacet, flupirosulfurón-M, fluroxipir, flurtamona, glifosato, yodosulfurón, ioxinil, isoproturón, MCPA, mesosulfurón, metsulfurón, pendimetalina, pinoxadén, propoxicarbazona, prosulfocarb, piroxulam, sulfosulfurón, tifensulfurón, tralcoxidim, triasulfurón, tribenurón, trifluralina, tritosulfurón; Fungicidas de cereales: azoxistrobina, bixafeno, boscalid, carbendazima, clorotalonil, ciflufenamida, ciproconazol, ciprodinil, dimoxistrobina, epoxiconazol, fenpropidina, fenpropimorf, fluopiram, fluoxastrobina, flunquinazol, fluxapiraxad, isopirazam, cresoxim metilo, metconazol, metrafenona, pentiopirad, picoxistrobina, procloraz, propiconazol, proquinazid, protioconazol, piraclostrobina, quinoxifeno, espiroxamina, tebuconazol, metil-tiofanato, trifloxistrobina; Insecticidas de cereales: dimetoato, lambda-cihalotrina, deltametrina, alfa-cipermetrina, beta-ciflutrina, bifentrina, imidacloprid, clotianidina, tiametoxam, tiacloprid, acetamiprid, dinotefurano, clorpirifos, pirimicarb, metiocarb, sulfoxaflor; Herbicidas de maíz: atracina, alacloro, bromoxinil, acetocloro, dicamba, clopiralida, (S-)dimetenamida, glufosinato, glifosato, isoxaflutol, (S-)metolacoloro, mesotriona, nicosulfurón, primisulfurón, rimsulfurón, sulcotriona, foramsulfurón, topramezona, tembotriona, saflufenacil, tiencarbazona, flufenacet, piroxasulfona; Insecticidas de maíz: carbofurano, clorpirifos, bifentrina, fipronil, imidacloprid, lambda-cialotrina, teflutrina, terbufos, tiametoxam, clotianidina, espiromesifeno, flubendiamida, triflumurón, rinaxipir, deltametrina, tiodicarb, beta-ciflutrina, cipermetrina, bifentrina, lufenurón, tebupirimfos, etiprol, ciazipir, tiacloprid, acetamiprid, dinotefurano, avermectina; Fungicidas de maíz: azoxistrobina, bixafeno, boscalid, ciproconazol, dimoxistrobina, epoxiconazol, fenitropán, fluopiram, fluoxastrobina, fluxapiraxad, isopirazam, metconazol, pentiopirad, picoxistrobina, propiconazol, protioconazol, piraclostrobina, tebuconazol, trifloxistrobina; Herbicidas de arroz: butaclor, propanil, azimsulfurón, bensulfurón, cihalofop, daimurón, fentrazamida, imazosulfurón, mafenacet, oxaziclomefona, pirazosulfurón, piributicarb, quincloraco, tienencarb, indanofano, flufenacet, fentrazamida, halosulfurón, oxaziclomefona, benzobiciclón, pirifalid, penoxsulam, bispiribaco, oxadiargilo, etoxisulfurón, pretilacloro, mesotriona, tefuriltriona, oxadiazona, fenoxaprop, pirimisulfano; Insecticidas de arroz: diazinón, fenobucarb, benfuracarb, buprofenzina, dinotefurano, fipronil, imidacloprid, isoprocab, tiacloprid, cromafenocida, clotianidina, etiprol, flubendiamida, rinaxipir, deltametrina, acetamiprid, tiametoxam, ciazipir, espinosad, espinotoram, benzoato de emamectina, cipermetrina, clorpirifos, etofenprox, carbofurano, benfuracarb, sulfoxaflor; Fungicidas de arroz: azoxistrobina, carbendazima, carpropamida, diclocimel, difenoconazol, edifenfos, ferimzona, gentamicina, hexaconazol, himexazol, iprobenfos (IBP), isoprotiolano, isotianil, kasugamicina, mancozeb, metominostrobina, orisastrobina, pencicloron, probenazol, propiconazol, propineb, piroquilón, tebuconazol, metil-tiofanato, tiadinil, triciclazol, trifloxistrobina, validamicina; Herbicidas de algodón: diurón, fluometurón, MSMA, oxifluorfen, prometrina, trifluralina, carfentrazona, cletodim, fluazifop-butilo, glifosato, norflurazón, pendimetalina, piritiobac-sodio, trifloxisulfurón, tepraloxidim, glufosinato, flumioxazina, tidiazurón; Insecticidas de algodón: acefato, aldicarb, clorpirifos, cipermetrina, deltametrina, abamectina, acetamiprid, benzoato de emamectina, imidacloprid, indoxacarb, lambda-cialotrina, espinosad, tiodicarb, gamma-cialotrina, espiromesifeno, piridalil, flonicamida, flubendiamida, triflumurón, rinaxipir, beta-ciflutrina, espirotetramato, clotianidina, tiametoxam, tiacloprid, dinotefurano, flubendiamida, ciazipir, espinosad, espinotoram, gamma cialotrina, 4-[[[6-clorpiridin-3-il]metil]-(2,2-difluoretil)amino]furan-2(5H)-ona, tiodicarb, avermectina, flonicamida, piridalil, espiromesifeno, sulfoxaflor; Fungicidas de algodón: azoxistrobina, bixafeno, boscalid, carbendazima, clorotalonil, cobre, ciproconazol, difenoconazol, dimoxistrobina, epoxiconazol, fenamidona, fluazinam, fluopiram, fluoxastrobina, fluxapiraxad, iprodiona, isopirazam, isotianil, mancozeb, maneb, metominostrobina, pentiopirad, picoxistrobina, propineb, protioconazol, piraclostrobina, quintoceno, tebuconazol, tetraconazol, metil-tiofanato, trifloxistrobina; Herbicidas de soja: alacloro, bentazona, trifluralina, clorimurón-etilo, cloransulam-metilo, fenoxaprop, fomesafen, fluazifop, glifosato, imazamox, imazaquin, imazetapir, (S-)metolacoloro, metribuzina, pendimetalina, tepraloxidim, glufosinato; Insecticidas de soja: lambda-cialotrina, metomilo, imidacloprid, clotianidina, tiametoxam, tiacloprid, acetamiprid, dinotefurano, flubendiamida, rinaxipir, ciazipir, espinosad, espinotoram, benzoato de emamectina, fipronil, etiprol, deltametrina, beta-ciflutrina, gamma y lambda cialotrina, 4-[[[6-clorpiridin-3-il]metil]-(2,2-difluoretil)amino]furan-2(5H)-ona, espirotetramato, espiroclifeno, triflumurón, flonicamida, tiodicarb, beta-ciflutrina; Fungicidas de soja: azoxistrobina, bixafeno, boscalid, carbendazima, clorotalonil, cobre, ciproconazol, difenoconazol, dimoxistrobina, epoxiconazol, fluazinam, fluopiram, fluoxastrobina, lutriafol, fluxapiraxad, isopirazam, iprodiona, isotianil, mancozeb, metconazol, metominostrobina, miclobutanilo, pentiopirad, picoxistrobina, propiconazol, propineb, protioconazol, piraclostrobina, tebuconazol, tetraconazol, metil-tiofanato, trifloxistrobina; Herbicidas de remolacha azucarera: cloridazón,

desmedifam, etofumesato, fenmedifam, trialato, clopiralida, fluazifop, lenacil, metamitrón, quinmeraco, cicloxidim, triflusalurón, tepraloxidim, quizalofop; Insecticidas de remolacha azucarera: imidacloprid, clotianidina, tiametoxam, tiacloprid, acetamiprid, dinetofurano, deltametrina,  $\beta$ -ciflutrina, gamma/lambda-cialotrina, 4-[[[(6-clorpiridin-3-il)metil](2,2-difluoretil)amino]furan-2(5H)-ona, teflutrina, rinaxipir, ciazipir, fipronil, carbofurano; Herbicidas de colza: clopiralida, diclofop, fluazifop, glufosinato, glifosato, metazaclor, trifluralina, etametsulfurón, quinmeraco, quizalofop, cletodim, tepraloxidim; Fungicidas de colza: azoxistrobina, bixafeno, boscalid, carbendazima, ciproconazol, difenoconazol, dimoxistrobina, epoxiconazol, fluazinam, fluopiram, fluoxastrobina, flusilazol, fluxapiraxad, iprodiona, isopirazam, cloruro de mepicuat, metconazol, metomimostrobina, paclobutrazol, pentiopirad, picoxistrobina, procloraz, protioconazol, piraclostrobina, tebuconazol, metil-tiofanato, trifloxistrobina, vinclozolina; Insecticidas de colza: carbofurano, tiacloprid, deltametrina, imidacloprid, clotianidina, tiametoxam, acetamiprid, dinetofurano,  $\beta$ -ciflutrina, gamma y lambda cialotrina, tau-fluvalinato, etiprol, espinosad, espinotoram, flubendiamida, rinaxipir, ciazipir, 4-[[[(6-clorpiridin-3-il)metil](2,2-difluoretil)amino]furan-2(5H)-ona.

### Ejemplos experimentales

#### Ejemplo 1. Descubrimiento de genes plaguicidas novedosos de *Bacillus thuringiensis*

Se identificó un gen plaguicida novedoso de la cepa bacteriana ATX65158 usando las siguientes etapas:

- Preparación del ADN total de la cepa. El ADN total contiene ADN genómico y ADN extracromosómico. El ADN extracromosómico contiene una mezcla de algunos o todos de los siguientes: plásmidos de diversos tamaños; cromosomas de fago; otras moléculas extracromosómicas no caracterizadas.
- Secuenciación del ADN. El ADN total se secuenciará por medio de los procedimientos de secuenciación de nueva generación.
- Identificación de los supuestos genes de la toxina por medio de homología y/u otros análisis computacionales.
- Si se requiere, finalizar la secuencia del gen de interés mediante una de varias estrategias de PCR o clonación (por ejemplo, TAIL-PCR).

La cepa ATX65158 se obtuvo a partir de una muestra de polvo de granos de Haikou, en la provincia de Hainan (China).

Tabla 1. Gen novedoso identificado de la cepa ATX65158

Nombre del gen	Peso molecular (kD)	Homólogo más cercano	SEQ ID NO de nucleótido	SEQ ID NO de aminoácido
Axmi335	90,6	73 % Vip3Ba1	1	2

Axmi335 se amplificó por PCR a partir de pAX980, y el producto de PCR se clonó en el vector de expresión de *Bacillus* pAX916 mediante procedimientos bien conocidos en la técnica. La cepa de *Bacillus* resultante, que contenía el vector con Axmi335, se cultivó en un medio de cultivo convencional, tal como medio CYS (10 g/l de bacto-casitona, 3 g/l de extracto de levadura, 6 g/l de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 14 g/l de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ;  $\text{MgSO}_4$  0,5 mM,  $\text{MnCl}_2$  0,05 mM;  $\text{FeSO}_4$  0,05 mM) hasta que la esporulación fue evidente mediante examen microscópico. Se prepararon muestras y se sometieron a prueba frente a su actividad en bioensayos.

#### Ejemplo 2. Ensayos frente a la actividad plaguicida

Las secuencias nucleotídicas de la invención se pueden someter a prueba frente a su capacidad para producir proteínas plaguicidas. La capacidad de una proteína plaguicida para actuar como plaguicida sobre una plaga se evalúa con frecuencia de una serie de maneras. Una manera bien conocida en la técnica es realizar un ensayo de alimentación. En dicho ensayo de alimentación, se expone la plaga a una muestra que contiene compuestos que se van a someter a prueba o bien muestras de control. Con frecuencia esto se realiza disponiendo el material que se va a someter a prueba, o una dilución adecuada de dicho material, sobre un material que la plaga va a ingerir, tal como una alimentación artificial. El material que se va a someter a prueba puede estar compuesto de un líquido, sólido o suspensión. El material que se va a someter a prueba se puede disponer en la superficie y, a continuación, permitir que se seque. De manera alternativa, el material que se va a someter a prueba se puede mezclar con una alimentación artificial fundida, y, a continuación, distribuirse en la cámara de ensayo. La cámara de ensayo puede ser, por ejemplo, una taza, un plato o un pocillo de una placa de microvaloración.

Los ensayos para plagas chupadoras (por ejemplo, pulgones) pueden implicar separar el material de prueba del insecto por un tabique, idealmente una porción que se pueda perforar por las partes chupadoras de la boca del insecto chupador, para permitir la ingestión del material de prueba. Con frecuencia, el material de prueba se mezcla con un estimulante de alimentación, tal como sacarosa, para promover la ingestión del compuesto de prueba.

Otros tipos de ensayos pueden incluir la microinyección del material de prueba en la boca, o intestino de la plaga,

así como el desarrollo de plantas transgénicas, seguido de la prueba de la capacidad de la plaga para alimentarse de la planta transgénica. Las pruebas sobre plantas pueden implicar el aislamiento de las partes de plantas normalmente consumidas, por ejemplo, pequeñas jaulas acopladas a una hoja, o el aislamiento de plantas enteras en jaulas que contengan insectos.

En la técnica se conocen otros procedimientos y enfoques para someter a ensayo plagas y se pueden encontrar, por ejemplo, en Robertson and Preisler, eds. (1992) *Pesticide bioassays with arthropods*, CRC, Boca Raton, FL. De manera alternativa, se describen comúnmente ensayos en las revistas científicas *Arthropod Management Tests and Journal of Economic Entomology* o mediante análisis con miembros de la Entomological Society of America (ESA).

**Ejemplo 3. Expresión y purificación**

Se clonó Axmi335 (SEQ ID NO:1 o 3) en el vector de expresión de *E. coli* pMAL-C4x detrás del gen *malE* que codifica la proteína de unión a maltosa (MBP). Estas fusiones en marco dieron como resultado la expresión de la proteína de fusión MBP-Axmi335 en *E. coli*.

Para la expresión en *E. coli*, se transformaron BL21 \*DE3 con plásmidos individuales. Se inocularon colonias únicas en LB complementado con carbenicilina y glucosa, y se cultivaron durante la noche a 37 °C. Al día siguiente, el medio recién preparado se inoculó con un 1 % de cultivo de durante la noche y se cultivó a 37 °C hasta la fase logarítmica. Posteriormente, los cultivos se indujeron con IPTG 0,3 mM durante la noche a 20 °C. Cada sedimento celular se suspendió en tampón Tris-Cl 20 mM, pH 7,4 + NaCl 200 mM + DTT 1 mM + inhibidores de proteasa y se sonicó. Se puede usar el análisis mediante SDS-PAGE para confirmar la expresión de las proteínas de fusión.

A continuación, los extractos libres de células totales se sometieron a una columna de amilosa acoplada a cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC) para la purificación por afinidad de proteínas de fusión MBP-axmi. La proteína de fusión unida se eluyó de la resina con solución de maltosa 10 mM. A continuación, la proteína de fusión purificada se escindió con Factor Xa o bien tripsina para eliminar la marca MBP de extremo amínico de la proteína Axmi. La escisión y solubilidad de las proteínas se pueden determinar mediante SDS-PAGE.

**Ejemplo 4. Actividad de proteínas expresadas a partir de genes axmi en bioensayos**

El bioensayo de los genes Axmi expresados dio como resultado la observación de las siguientes actividades en plagas de insectos:

Tabla 2. Actividad de proteínas expresadas en bioensayo

Plásmido	Gen	DBM	Hv	Hz	SWCB	SBL	SCB
pAX85 13	Axmi335	retraso del crecimiento moderado, mortalidad de un 25 %	retraso del crecimiento	retraso del crecimiento	retraso del crecimiento	retraso del crecimiento fuerte, mortalidad de un 100 %	retraso del crecimiento fuerte, mortalidad de un 100 %

- DBM: *Palomilla de dorso diamante*
- Hv: *Heliothis virescens*
- Hz: *Helicoverpa zea*
- SWCB: *Taladro del maíz del sudoeste*
- SBL: *Gusano medidor de la soja*
- SCB: *Taladrador de la caña de azúcar*

**Ejemplo 5. Vectorización de genes para la expresión vegetal**

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

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

En otro aspecto de la invención, las versiones modificadas de los genes sintéticos están diseñadas de tal manera que el péptido resultante seleccione como diana un orgánulo vegetal, tal como el retículo endoplásmico o el apoplasto. En la técnica se conocen secuencias peptídicas que se sabe que dan como resultado la selección como

diana de proteínas de fusión de orgánulos vegetales. Por ejemplo, en la técnica se conoce que la región de extremo N del gen de la fosfatasa ácida del altramuz blanco *Lupinus albus* (ID de GENBANK® GI:14276838, Miller *et al.* (2001) Plant Physiology 127: 594-606) da como resultado la selección como diana del retículo endoplásmico de proteínas heterógenas. Si la proteína de fusión resultante también contiene una secuencia de retención del retículo endoplásmico que comprenda el péptido extremo N-lisina-ácido aspártico-ácido glutámico-leucina (es decir, el motivo "KDEL", SEQ ID NO:5) en el extremo C, la proteína de fusión selecciona como diana el retículo endoplásmico. Si la proteína de fusión carece de una secuencia que selecciona como diana el retículo endoplásmico en el extremo C, la proteína selecciona como diana el retículo endoplasmático, pero finalmente se secuestra en el apoplasto.

De esta manera, este gen codifica una proteína de fusión que contenga los treinta y un aminoácidos de extremo N del gen de la fosfatasa ácida del altramuz blanco *Lupinus albus* (ID de GENBANK® GI: 14276838, Miller *et al.*, 2001, *supra*) en fusión con el extremo N de la secuencia aminoacídica de la invención, así como la secuencia KDEL (SEQ ID NO: 5) en el extremo C. De esta manera, se predice que la proteína resultante selecciona como diana el retículo endoplásmico de la planta después de su expresión en una célula vegetal.

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

**Ejemplo 6. Transformación de células de maíz con los genes de proteína plaguicida descritos en el presente documento**

Las mazorcas se recolectan en el mejor momento 8-12 días después de la polinización. Los embriones se aíslan de las mazorcas, y son preferentes los embriones de 0,8-1,5 mm de tamaño para su uso en la transformación. Los embriones se siembran con el escutelo hacia arriba en un medio de incubación adecuado, tal como medio DN62A5S (3,98 g/l de sales N6, 1 ml/l (de 1000x de reserva) de vitaminas N6; 800 mg/l de L-asparagina, 100 mg/l de myo-inositol; 1,4 g/l de L-prolina; 100 mg/l de ácidos casamino; 50 g/l de sacarosa, 1 ml/l (de 1 mg/ml de reserva) de 2,4-D). Sin embargo, los medios y las sales distintos de DN62A5S son adecuados y se conocen en la técnica. Los embriones se incuban durante la noche a 25 °C en la oscuridad. Sin embargo, no es necesario incubar *per se* los embriones durante la noche.

Los explantes resultantes se transfieren a cuadrados de malla (30-40 por placa), se transfieren a medios osmóticos durante aproximadamente 30-45 minutos, a continuación, se transfieren a una placa de haces (véase, por ejemplo, la publicación PCT n.º WO/0138514 y la patente de EE. UU. 5.240.842).

Las construcciones de ADN diseñadas para los genes de la invención en células vegetales se aceleran hacia el tejido vegetal usando un acelerador por haz de aerosol, usando condiciones esencialmente como se describe en la publicación PCT n.º WO/0138514. Después de la radiación, los embriones se incuban durante aproximadamente 30 minutos en medios osmóticos, y se disponen en el medio de incubación durante la noche a 25 °C en la oscuridad. Para evitar dañar indebidamente los explantes radiados, se incuban durante al menos 24 horas antes de la transferencia a los medios de recuperación. A continuación, los embriones se diseminan sobre medios del periodo de recuperación, durante aproximadamente 5 días, 25 °C en la oscuridad, y, a continuación, se transfieren a un medio de selección. Los explantes se incuban en medios de selección durante hasta ocho semanas, dependiendo de la naturaleza y características de la selección particular utilizada. Después del periodo de selección, el callo resultante se transfiere a los medios de maduración de embriones, hasta que se observa la formación de embriones somáticos maduros. A continuación, los embriones somáticos maduros resultantes se disponen bajo poca luz, y se inicia el procedimiento de regeneración mediante procedimientos conocidos en la técnica. Los brotes resultantes se dejan enraizar en medios de enraizamiento y las plantas resultantes se transfieren a macetas de semillero y se propagan como plantas transgénicas.

**Materiales**

**Medio DN62A5S**

Componentes	Por litro	Fuente
Mezcla de sales basales N6 de Chu (n.º de prod. C 416)	3,98 g/l	Phytotechnology Labs
Solución de vitaminas N6 de Chu (n.º de prod. C 149)	1 ml/l (de 1000x de reserva)	Phytotechnology Labs
L-asparagina	800 mg/l	Phytotechnology Labs
Myo-inositol	100 mg/l	Sigma
L-prolina	1,4 g/l	Phytotechnology Labs
Ácidos casamino	100 mg/l	Fisher Scientific

Sacarosa	50 g/l	Phytotechnology Labs
2,4-D (n.º de prod. D-7299)	1 ml/l (de 1 mg/ml de reserva)	Sigma

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

5 **Ejemplo 7. Transformación de genes de la invención en células vegetales mediante transformación mediada por *Agrobacterium***

10 Las mazorcas se recolectan en el mejor momento 8-12 días después de la polinización. Los embriones se aíslan de las mazorcas, y son preferentes los embriones de 0,8-1,5 mm de tamaño para su uso en la transformación. Los embriones se siembran con el escutelo hacia arriba en un medio de incubación adecuado y se incuban durante la noche a 25 °C en la oscuridad. Sin embargo, no es necesario incubar *per se* los embriones durante la noche. Los embriones se ponen en contacto con una cepa de *Agrobacterium* que contiene los vectores apropiados para la transferencia mediada por el plásmido Ti durante aproximadamente 5-10 minutos, y, a continuación, se siembran en un medio de cocultivo durante aproximadamente 3 días (25 °C en la oscuridad). Después del cocultivo, los explantes se transfieren a los medios del periodo de recuperación durante aproximadamente cinco días (a 25 °C en la oscuridad). Los explantes se incuban en medios de selección durante hasta ocho semanas, dependiendo de la naturaleza y características de la selección particular utilizada. Después del periodo de selección, el callo resultante se transfiere a los medios de maduración de embriones, hasta que se observa la formación de embriones somáticos maduros. A continuación, los embriones somáticos maduros resultantes se disponen bajo poca luz, y se inicia el procedimiento de regeneración como se conoce en la técnica.

20 **Ejemplo 8. Expresión y actividad de Axmi335 en *Z. mays***

25 Se transformó en maíz una construcción que comprendía un ácido nucleico optimizado que codificaba un sitio de inicio en dirección 3' de Axmi335 bajo el control del promotor PScubi4-N1, así como un gen de tolerancia a herbicida bajo el control del promotor PScubi4-N1, usando el protocolo de transformación mediada por *Agrobacterium* descrito en el presente documento. La secuencia nucleotídica optimizada se expone en la SEQ ID NO: 3 y la proteína codificada se expone en la SEQ ID NO: 4.

30 Se tomaron muestras de discos foliares a partir de plantas maduras que eran positivas para la expresión de Axmi335 como se midió mediante análisis de bandas Western y RT-PCR. Se permitió que las plagas diana se alimentaran en los discos foliares durante 2 días. A continuación, los discos foliares se puntuaron según la cantidad de daño al disco después del periodo de alimentación. Los controles (tejido foliar de Hill no transgénico) mostraron un daño importante por todos los insectos en el panel, sin mortalidad. Los resultados se muestran en la tabla 3.

Tabla 3

	<u>n</u>	<u>Hz</u>	<u>ECB</u>	<u>FAW</u>	<u>BCW</u>	<u>HV</u>
Porcentaje de acontecimientos sin daño	41	24 %	24 %	7 %	0 %	46 %
Porcentaje de acontecimientos con daño leve	41	27 %	10 %	18 %	0 %	30 %

40 Hz: *Helicoverpa zea*  
 ECB: *Taladro del maíz europeo*  
 Hv: *Heliothis virescens*  
 FAW: *Gusano trozador*  
 BCW: *Cucumilla negra*

45

**Listado de secuencias**

<110> Athenix Corp. Sampson, Kimberly Thayer, Rebecca Lehtinen, Duane

5 <120> GEN DE LA TOXINA AXMI335 Y PROCEDIMIENTOS PARA SU USO

<130> 2916693-098977

<150> 61/608.303

10 <151> 08-03-2012

<160> 5

<170> PatentIn version 3.5

15

<210> 1

<211> 2400

<212> ADN

<213> Bacillus thuringiensis

20

<400> 1

```

atgatgattg tggataataa taaattaaat gtaagagctt taccaagctt tattgattat      60
tttaacggta tttatggatt tgccactggt atcaaagata ttatgggaat gatttttaaa      120
acagatacag gtggtagtaa tttaacatta gatgagattt taaagaatca aaatttacta      180
aatgatatct cgggtaagct cgatggtatt aatggagggt taggtgatct tattgcacaa      240
gggaacttaa attcagaatt agctaaggaa ttgctaaaaa tttctaatga gcagaatcag      300
atgttaaadc atgttaatgc tcaacttaat gcaatcaatt caaacttaa tgtatatctt      360
cccaaaatta catctatggt aatgaggtg atgatgcaaa accatgtttt aagtctacaa      420
atagaatttc taagtaaaca attgcaagaa atttcagata aacttgatat tatcaactta      480
aacgtactga ttaactctac attgacagag attactcctg cttatcaacg tattaatat      540
gttaacgaaa aatttgatga attgacttct actgtagaga aaaattcaaa agcatatcaa      600
gataacgtta ctaaagaagt tattgaaaat ttaactgatc taactgaatt ggccaaaagt      660
gttacaaaaa atgatatgga tagttttgaa ttttatcttc aaactttcca tgatgtaatg      720
actggaaata atttatgttg tcgctcagca ttaaaaactg ctgcagaatt aatcacaaaa      780
gaaaatgtca cgacaagagg aagtgagata ggaaaagttt ataatttctt gattgtttta      840
acttctttac aagcaaaagc ttttctcact ttaactgcat gtcgaaagtt attgggttta      900
acagatattg attatactaa aactatgaat cagcatttag atggacaaaa aagagaattt      960
cgtattaata ttcttccaac actttctaata agtttttcta atcctagtta ttcaaagaat     1020
agaggaagtg atatcgatga tccaattggt gtgtagaag cagcacctgg atatgcctta     1080
ataggatttc aaattctaaa cgatccactt cagattttaa aaggatatca ggctaggtta     1140
aaaccaaatt atcaagttga cagagagtcg atgtcagaaa caatttatgg ggatattcat     1200

```

ES 2 630 059 T3

aaattatfff gtccaaaaca gctggagcaa aaatattata ttaaagatat tgaatttcct 1260  
 gaaggctatg taatcactaa aatcgtgttt gaaaaaaggc taaatcaatt gggttatgag 1320  
 gtaacggcaa atffffatga cccctctaca ggaacatcg atttaaaca ggttaaagta 1380  
 gaatcttga aggaaaagtc ttgcgaggag gaatcctgcg aagatgagtt ctgcgaacat 1440  
 gagtatagcc ttataaaggc tgaaacggat ggtatttata tgccattagg tgtagtaagt 1500  
 gagacffff taacccaat ttatggffff ggattaacag ttgacgaaaa aaatcaaaaa 1560  
 ataactffaa caggtaaadc ctatffacgt gaatccttac tagaaacaga tffagffaac 1620  
 aatgaaacat atffaatgfc ttcaccagac ggtatffffa gtagtattgt agaaaattgg 1680  
 aatataacat cagataatff tggatcftgg agagcaaaata ataataatgc atffgtcgat 1740  
 aaggaagata ctgtaaaagg atcaagffct ctgtatactc ataaagatgg ggaattctcg 1800  
 caatffatff gaaataagct aaaacftaaa actaattatg tffatcaata tgctataaaa 1860  
 ggaagaccgg ctatffatff aaaaaataat aaggatacct tgtffgagga taccaataac 1920  
 aactffagcg atfffcagac tgtaacaaaa aatffcaatt caggagcaaa fcctfcggaa 1980  
 atffatffgc tffftaaaaa tcaaggtgaa tacgaggctt gggggaataa cffatatt 2040  
 ttagaaatta aatcgcttga attatfgccg caaatgttga aacctgagga tfggatacca 2100  
 tcaggaaatg tgcaaatgaa agacgaagga cgcctagaga tfftaggaga tggctatff 2160  
 aaacaattca ttaaattgca aatgattca acctatcatc taagattatc agttaaggga 2220  
 accgtaggg tatcaataat tgatgaatct aactatffat tffftgtaa tattaaggat 2280  
 gaagatffta ctagcgttat taaaaatagg tcttcagaag gtgattgff ttagctct 2340  
 gaggttctt atgtagaaaa ttctagtacc atfffttcta gtgtatctat cgftaaagaa 2400

<210> 2

<211> 800

5 <212> PRT

<213> *Bacillus thuringiensis*

<400> 2

Met Met Ile Val Asp Asn Asn Lys Leu Asn Val Arg Ala Leu Pro Ser  
 1 5 10 15

Phe Ile Asp Tyr Phe Asn Gly Ile Tyr Gly Phe Ala Thr Gly Ile Lys  
 20 25 30

Asp Ile Met Gly Met Ile Phe Lys Thr Asp Thr Gly Gly Ser Asn Leu  
 35 40 45

Thr Leu Asp Glu Ile Leu Lys Asn Gln Asn Leu Leu Asn Asp Ile Ser  
 50 55 60

ES 2 630 059 T3

Gly Lys Leu Asp Gly Ile Asn Gly Gly Leu Gly Asp Leu Ile Ala Gln  
65 70 75 80

Gly Asn Leu Asn Ser Glu Leu Ala Lys Glu Leu Leu Lys Ile Ser Asn  
85 90 95

Glu Gln Asn Gln Met Leu Asn His Val Asn Ala Gln Leu Asn Ala Ile  
100 105 110

Asn Ser Thr Leu Asn Val Tyr Leu Pro Lys Ile Thr Ser Met Leu Asn  
115 120 125

Glu Val Met Met Gln Asn His Val Leu Ser Leu Gln Ile Glu Phe Leu  
130 135 140

Ser Lys Gln Leu Gln Glu Ile Ser Asp Lys Leu Asp Ile Ile Asn Leu  
145 150 155 160

Asn Val Leu Ile Asn Ser Thr Leu Thr Glu Ile Thr Pro Ala Tyr Gln  
165 170 175

Arg Ile Lys Tyr Val Asn Glu Lys Phe Asp Glu Leu Thr Ser Thr Val  
180 185 190

Glu Lys Asn Ser Lys Ala Tyr Gln Asp Asn Val Thr Lys Glu Val Ile  
195 200 205

Glu Asn Leu Thr Asp Leu Thr Glu Leu Ala Lys Ser Val Thr Lys Asn  
210 215 220

Asp Met Asp Ser Phe Glu Phe Tyr Leu Gln Thr Phe His Asp Val Met  
225 230 235 240

Thr Gly Asn Asn Leu Phe Gly Arg Ser Ala Leu Lys Thr Ala Ala Glu  
245 250 255

Leu Ile Thr Lys Glu Asn Val Thr Thr Arg Gly Ser Glu Ile Gly Lys  
260 265 270

Val Tyr Asn Phe Leu Ile Val Leu Thr Ser Leu Gln Ala Lys Ala Phe  
275 280 285

Leu Thr Leu Thr Ala Cys Arg Lys Leu Leu Gly Leu Thr Asp Ile Asp  
290 295 300

Tyr Thr Lys Thr Met Asn Gln His Leu Asp Gly Gln Lys Arg Glu Phe



ES 2 630 059 T3

Asn Ile Thr Ser Asp Asn Phe Gly Ser Trp Arg Ala Asn Asn Asn Asn  
565 570 575

Ala Phe Val Asp Lys Glu Asp Thr Val Lys Gly Ser Ser Ser Leu Tyr  
580 585 590

Thr His Lys Asp Gly Glu Phe Ser Gln Phe Ile Gly Asn Lys Leu Lys  
595 600 605

Pro Lys Thr Asn Tyr Val Ile Gln Tyr Ala Ile Lys Gly Arg Pro Ala  
610 615 620

Ile Tyr Leu Lys Asn Asn Lys Asp Thr Leu Phe Glu Asp Thr Asn Asn  
625 630 635 640

Asn Phe Ser Asp Phe Gln Thr Val Thr Lys Lys Phe Asn Ser Gly Ala  
645 650 655

Asn Pro Ser Glu Ile Tyr Leu Leu Phe Lys Asn Gln Gly Glu Tyr Glu  
660 665 670

Ala Trp Gly Asn Asn Phe Ile Ile Leu Glu Ile Lys Ser Leu Glu Leu  
675 680 685

Leu Pro Gln Met Leu Lys Pro Glu Asp Trp Ile Pro Ser Gly Asn Val  
690 695 700

Gln Met Lys Asp Glu Gly Arg Leu Glu Ile Leu Gly Asp Gly Tyr Phe  
705 710 715 720

Lys Gln Phe Ile Lys Leu Gln Asn Asp Ser Thr Tyr His Leu Arg Leu  
725 730 735

Ser Val Lys Gly Thr Gly Arg Val Ser Ile Ile Asp Glu Ser Asn Tyr  
740 745 750

Leu Phe Phe Val Asn Ile Lys Asp Glu Asp Phe Thr Ser Val Ile Lys  
755 760 765

Asn Arg Ser Ser Glu Gly Asp Cys Phe Ile Ala Leu Glu Gly Ser Tyr  
770 775 780

Val Glu Asn Ser Ser Thr Ile Phe Ser Ser Val Ser Ile Val Lys Glu  
785 790 795 800

<210> 3  
<211> 2397

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> secuencia nucleotídica sintética que codifica Axmi335

<400> 3

ES 2 630 059 T3

atgattgtgg acaacaacaa gctcaatgtc cgcgcgctgc catccttcat cgactacttc	60
aatggcatct atggcttcgc caccggcatc aaggacatca tggggatgat cttcaagaca	120
gacactggag gatcaaacct caccttggat gagatcctca agaaccagaa cctgctgaat	180
gacatcagcg gcaagctgga tggcatcaat ggaggccttg gagatctgat tgctcaagga	240
aacctcaact cagagctggc caaggagctg ctgaagatca gcaatgagca gaaccagatg	300
ctgaaccatg tcaatgctca gctcaatgcc atcaacagca ccctcaatgt ttatcttcca	360
aagatcacct caatgctgaa tgaggatgat atgcaaaatc atgtgctgag cctccagatc	420
gagttcctct ccaagcagct gcaagagatc tccgacaagc tggacatcat caacctcaat	480
gtgctgatca actcaacatt gacagagatc acgccggcct accagaggat caaatatgtc	540
aatgagaagt ttgatgagct gacaagcacc gtggagaaga acagcaaggc ctaccaggac	600
aatgtcacca aggagtgat tgagaacctg acagatctga cagagctggc aaaatcagtc	660
accaagaatg acatggacag cttcgagttc tacctccaga ccttccatga tgtgatgaca	720
ggcaacaacc tctttggaag aagcgcgctg aagacagcag cagagctgat caccaaggag	780
aatgtgacaa caagaggatc agagattggc aaggtgtaca acttcctcat cgtgctgaca	840
agcctccagg ccaaggcctt cctcaccctc accgcctgcc gaaagctgct gggcctcact	900
gacatcgact acaccaagac catgaaccag catctggatg gccagaagag ggagttcaga	960
atcaacatcc tgccaacatt gagcaacagc ttcagcaacc caagctacag caagaacaga	1020
ggatcagaca ttgatgatcc aattgtggtg ctggaagctg ctcctggata tgctctcatc	1080
ggcttccaga tcctcaatga tcctcttccc atcctcaaag gatatcaagc aaggctgaag	1140
ccaaactacc aggtggacag agaaagcatg tcagaaacca tctatggaga catccacaag	1200
ctcttctgcc ccaagcagct ggagcagaag tactacatca aggacatcga gttcccagaa	1260
ggatatgtca tcaccaagat cgtcttcgag aagaggctga accagctggg atatgaggtc	1320
accgccaact tctatgatcc atcaactggc aacatcgacc tcaacaaggc gaaggtggag	1380
agctggaagg agaagagctg cgaggaggag agctgtgaag atgagttctg cgagcatgag	1440
tacagcttga tcaaggcaga aacagatggc atctacatgc cgctcggcgt ggtttcagaa	1500
accttcttga cgcccatcta tggcttcggc ctcaccgtgg atgagaagaa ccagaagatc	1560
accttgacag ggaagagcta cctgaggggag agcttgctgg agacagatct ggtgaacaat	1620
gaaacatatt tgattgcttc tccagatggc tacttcagca gcatcgtgga gaactggaac	1680
atcacctcag acaactttgg aagctggagg gccacaacaa acaatgcttt tgtggacaag	1740

ES 2 630 059 T3

gaggacaccg tcaaaggaag cagcagcctc tacaccaca aggatggaga gttctcacag 1800  
 ttcattggaa ataagctgaa gccaaagacc aactatgtca tccaatatgc catcaaagga 1860  
 aggccggcca tctacctgaa gaacaacaag gacaccctct tcgaggacac caacaacaac 1920  
 ttctccgact tccaaactgt caccaagaag ttcaacagcg gcgccaaccc ttcagagatc 1980  
 tacctgctct tcaagaatca aggagaatat gaagcatggg gcaacaactt catcatcctg 2040  
 gagatcaaga gcttggagct gctgccgag atgctgaagc cagaagattg gattccatca 2100  
 ggaaatgttc agatgaagga tgaaggaagg ctggagatcc ttggagatgg ctacttcaag 2160  
 cagttcatca agctgcaaaa tgacagcacc taccacctcc gcctctccgt caaaggaact 2220  
 ggccgctct ccatcattga tgaaagcaac tacctcttct tcgtgaacat caaggatgaa 2280  
 gatttcacct ccgtcatcaa gaacagaagc tcagaaggag attgcttcat cgcgctggaa 2340  
 ggaagctatg tggagaacag cagcaccatc ttctoctccg tctccatcgt caaggaa 2397

<210> 4

<211> 799

5 <212> PRT

<213> Bacillus thuringiensis

<400> 4

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

ES 2 630 059 T3

Val Met Met Gln Asn His Val Leu Ser Leu Gln Ile Glu Phe Leu Ser  
130 135 140

Lys Gln Leu Gln Glu Ile Ser Asp Lys Leu Asp Ile Ile Asn Leu Asn  
145 150 155 160

Val Leu Ile Asn Ser Thr Leu Thr Glu Ile Thr Pro Ala Tyr Gln Arg  
165 170 175

Ile Lys Tyr Val Asn Glu Lys Phe Asp Glu Leu Thr Ser Thr Val Glu  
180 185 190

Lys Asn Ser Lys Ala Tyr Gln Asp Asn Val Thr Lys Glu Val Ile Glu  
195 200 205

Asn Leu Thr Asp Leu Thr Glu Leu Ala Lys Ser Val Thr Lys Asn Asp  
210 215 220

Met Asp Ser Phe Glu Phe Tyr Leu Gln Thr Phe His Asp Val Met Thr  
225 230 235 240

Gly Asn Asn Leu Phe Gly Arg Ser Ala Leu Lys Thr Ala Ala Glu Leu  
245 250 255

Ile Thr Lys Glu Asn Val Thr Thr Arg Gly Ser Glu Ile Gly Lys Val  
260 265 270

Tyr Asn Phe Leu Ile Val Leu Thr Ser Leu Gln Ala Lys Ala Phe Leu  
275 280 285

Thr Leu Thr Ala Cys Arg Lys Leu Leu Gly Leu Thr Asp Ile Asp Tyr  
290 295 300

Thr Lys Thr Met Asn Gln His Leu Asp Gly Gln Lys Arg Glu Phe Arg  
305 310 315 320

Ile Asn Ile Leu Pro Thr Leu Ser Asn Ser Phe Ser Asn Pro Ser Tyr  
325 330 335

Ser Lys Asn Arg Gly Ser Asp Ile Asp Asp Pro Ile Val Val Leu Glu  
340 345 350

Ala Ala Pro Gly Tyr Ala Leu Ile Gly Phe Gln Ile Leu Asn Asp Pro  
355 360 365

Leu Pro Ile Leu Lys Gly Tyr Gln Ala Arg Leu Lys Pro Asn Tyr Gln  
370 375 380

ES 2 630 059 T3

Val Asp Arg Glu Ser Met Ser Glu Thr Ile Tyr Gly Asp Ile His Lys  
 385 390 395 400

Leu Phe Cys Pro Lys Gln Leu Glu Gln Lys Tyr Tyr Ile Lys Asp Ile  
 405 410 415

Glu Phe Pro Glu Gly Tyr Val Ile Thr Lys Ile Val Phe Glu Lys Arg  
 420 425 430

Leu Asn Gln Leu Gly Tyr Glu Val Thr Ala Asn Phe Tyr Asp Pro Ser  
 435 440 445

Thr Gly Asn Ile Asp Leu Asn Lys Val Lys Val Glu Ser Trp Lys Glu  
 450 455 460

Lys Ser Cys Glu Glu Glu Ser Cys Glu Asp Glu Phe Cys Glu His Glu  
 465 470 475 480

Tyr Ser Leu Ile Lys Ala Glu Thr Asp Gly Ile Tyr Met Pro Leu Gly  
 485 490 495

Val Val Ser Glu Thr Phe Leu Thr Pro Ile Tyr Gly Phe Gly Leu Thr  
 500 505 510

Val Asp Glu Lys Asn Gln Lys Ile Thr Leu Thr Gly Lys Ser Tyr Leu  
 515 520 525

Arg Glu Ser Leu Leu Glu Thr Asp Leu Val Asn Asn Glu Thr Tyr Leu  
 530 535 540

Ile Ala Ser Pro Asp Gly Tyr Phe Ser Ser Ile Val Glu Asn Trp Asn  
 545 550 555 560

Ile Thr Ser Asp Asn Phe Gly Ser Trp Arg Ala Asn Asn Asn Asn Ala  
 565 570 575

Phe Val Asp Lys Glu Asp Thr Val Lys Gly Ser Ser Ser Leu Tyr Thr  
 580 585 590

His Lys Asp Gly Glu Phe Ser Gln Phe Ile Gly Asn Lys Leu Lys Pro  
 595 600 605

Lys Thr Asn Tyr Val Ile Gln Tyr Ala Ile Lys Gly Arg Pro Ala Ile  
 610 615 620

Tyr Leu Lys Asn Asn Lys Asp Thr Leu Phe Glu Asp Thr Asn Asn Asn  
 625 630 635 640

ES 2 630 059 T3

Phe Ser Asp Phe Gln Thr Val Thr Lys Lys Phe Asn Ser Gly Ala Asn  
 645 650 655

Pro Ser Glu Ile Tyr Leu Leu Phe Lys Asn Gln Gly Glu Tyr Glu Ala  
 660 665 670

Trp Gly Asn Asn Phe Ile Ile Leu Glu Ile Lys Ser Leu Glu Leu Leu  
 675 680 685

Pro Gln Met Leu Lys Pro Glu Asp Trp Ile Pro Ser Gly Asn Val Gln  
 690 695 700

Met Lys Asp Glu Gly Arg Leu Glu Ile Leu Gly Asp Gly Tyr Phe Lys  
 705 710 715 720

Gln Phe Ile Lys Leu Gln Asn Asp Ser Thr Tyr His Leu Arg Leu Ser  
 725 730 735

Val Lys Gly Thr Gly Arg Val Ser Ile Ile Asp Glu Ser Asn Tyr Leu  
 740 745 750

Phe Phe Val Asn Ile Lys Asp Glu Asp Phe Thr Ser Val Ile Lys Asn  
 755 760 765

Arg Ser Ser Glu Gly Asp Cys Phe Ile Ala Leu Glu Gly Ser Tyr Val  
 770 775 780

Glu Asn Ser Ser Thr Ile Phe Ser Ser Val Ser Ile Val Lys Glu  
 785 790 795

<210> 5

<211> 4

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido que selecciona como diana el retículo endoplásmico

10

<400> 5

Lys Asp Glu Leu  
 1

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una molécula de ácido nucleico recombinante que comprende una secuencia nucleotídica que codifica una secuencia aminoacídica que tiene actividad plaguicida, donde dicha secuencia nucleotídica se selecciona del grupo que consiste en:
  - a) la secuencia nucleotídica expuesta en la SEQ ID NO: 1 o 3;
  - b) una secuencia nucleotídica que codifica un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 2 o 4;
  - 10 c) una secuencia nucleotídica que codifica un polipéptido que comprende una secuencia aminoacídica que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 2 o 4.
- 15 2. La molécula de ácido nucleico recombinante según la reivindicación 1, donde dicha secuencia nucleotídica es una secuencia sintética que se ha diseñado para su expresión en una planta.
3. La molécula de ácido nucleico recombinante según la reivindicación 1, donde dicha secuencia nucleotídica está enlazada funcionalmente a un promotor que puede dirigir la expresión de dicha secuencia nucleotídica en una célula vegetal.
- 20 4. Un vector que comprende la molécula de ácido nucleico recombinante según la reivindicación 1.
5. El vector según la reivindicación 4, que comprende adicionalmente una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido heterógeno.
- 25 6. Una célula huésped aislada que contiene el ácido nucleico recombinante según la reivindicación 1.
7. La célula huésped según la reivindicación 6, que es una célula huésped bacteriana o una célula vegetal.
- 30 8. Una planta transgénica que comprende la célula huésped vegetal según la reivindicación 7.
9. La planta transgénica según la reivindicación 8, donde 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 planta de colza.
- 35 10. Una semilla transgénica que comprende la molécula de ácido nucleico según la reivindicación 1.
11. Un polipéptido recombinante con actividad plaguicida, seleccionado del grupo que consiste en:
  - a) un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 2 o 4; y
  - b) un polipéptido que comprende una secuencia aminoacídica que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 2 o 4.
- 40 12. El polipéptido recombinante según la reivindicación 11, que comprende adicionalmente secuencias aminoacídicas heterógenas.
- 45 13. Una composición que comprende el polipéptido según la reivindicación 11 o 12.
14. La composición según la reivindicación 13, donde dicha composición:
  - (a) se selecciona del grupo que consiste en un polvo, microsfera, gránulo, pulverización, emulsión, coloide y solución;
  - (b) se prepara mediante desecación, liofilización, homogeneización, extracción, filtración, centrifugación, sedimentación o concentración de un cultivo de células bacterianas; o
  - 55 (c) comprende desde aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 99 % en peso de dicho polipéptido.
15. Un procedimiento no médico para destruir una plaga de lepidópteros, hemípteros, coleópteros, nematodos o dípteros, o para controlar una población de plaga de lepidópteros, hemípteros, coleópteros, nematodos o dípteros, que comprende poner en contacto dicha plaga o población con, o alimentar a dicha plaga o población con, una cantidad plaguicidamente eficaz del polipéptido según la reivindicación 11.
- 60 16. Un procedimiento para producir un polipéptido con actividad plaguicida, que comprende cultivar la célula huésped según la reivindicación 6 en condiciones en las que se expresa la molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido.
- 65 17. Una planta o célula vegetal que tiene incorporada de manera de estable en su genoma una construcción de

ADN que comprende una molécula de ácido nucleico recombinante según la reivindicación 1.

- 5
18. Un procedimiento para proteger una planta de una plaga, que comprende expresar en una planta o célula de la misma una molécula de ácido nucleico recombinante según la reivindicación 1.
19. El procedimiento según la reivindicación 18, donde dicha planta produce un polipéptido plaguicida que tiene actividad plaguicida frente a una plaga de lepidópteros, hemípteros, coleópteros, nematodos o dípteros.
- 10
20. Un procedimiento para incrementar el rendimiento en una planta que comprende cultivar en un campo una planta o una semilla de la misma que tiene incorporada de manera estable en su genoma una construcción de ADN que comprende una molécula de ácido nucleico recombinante según la reivindicación 1; donde dicho campo está infestado con una plaga frente a la que dicho polipéptido tiene actividad plaguicida.