

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 647 596**

51 Int. Cl.:

A01N 37/46	(2006.01)
A01N 63/02	(2006.01)
A01N 65/00	(2009.01)
C07K 16/12	(2006.01)
C07K 14/22	(2006.01)
C07K 14/325	(2006.01)
C12N 15/82	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.07.2012 PCT/US2012/048496**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **31.01.2013 WO13016617**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.07.2012 E 12748303 (0)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.08.2017 EP 2737069**

54 Título: **Variantes de proteínas AXMI205 y métodos para su uso**

30 Prioridad:

28.07.2011 US 201161512539 P

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

22.12.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**HIENRICHS, VOLKER y
WILLIAMS, JAYME**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 647 596 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

Variantes de proteínas AXMI205 y métodos para su uso

5 **REFERENCIA AL LISTADO DE SECUENCIAS ENVIADO ELECTRÓNICAMENTE**

La copia oficial del listado de secuencias se envía electrónicamente por EFS-Web como un listado de secuencias con formato ASCII con un archivo denominado «APA116029SEQLIST.TXT», creado el 19 de julio de 2012, y que tiene un tamaño de 45,8 kilobytes y se presenta simultáneamente con la memoria descriptiva. El listado de secuencias contenido en el presente documento con formato ASCII es parte de la memoria descriptiva y se incorpora aquí como referencia en su totalidad.

Campo de la invención

15 La presente invención se refiere al campo de la biología molecular. Se proporcionan variantes de proteínas plaguicidas que tienen actividad contra plagas de gusanos de la raíz. Estas proteínas y las secuencias de ácidos nucleicos que las codifican son útiles en la preparación de formulaciones plaguicidas y en la producción de plantas transgénicas resistentes a los gusanos de la raíz.

20 **Antecedentes de la invención**

La introducción del DDT (dicloro-difenil-tricloroetano) y el siguiente movimiento hacia el uso indiscriminado de insecticidas químicos sintéticos condujeron a la contaminación del agua y las fuentes de alimentos, el envenenamiento de insectos beneficiosos no objetivo y el desarrollo de plagas de insectos resistentes a los insecticidas químicos. La creciente preocupación pública sobre los efectos ambientales adversos del uso indiscriminado de insecticidas químicos impulsó la búsqueda de métodos alternativos para el control de plagas de insectos.

30 Una de las alternativas prometedoras ha sido el uso de agentes de control biológico. Existe una historia bien documentada de la aplicación segura de Bt (*B. Thuringiensis*, una bacteria del suelo grampositiva) como bioplaguicidas efectivos y se dispone de un número de informes de la expresión del gen o genes de delta-endotoxina en plantas de cultivo. Solo se requieren unos pocos aerosoles insecticidas en los cultivos transgénicos Bt, que no solo ahorran costos y tiempo, sino que también reducen los riesgos para la salud. En algunos casos, los insectos pueden desarrollar resistencia a diferentes compuestos insecticidas, lo que plantea la necesidad de identificar agentes de control biológico alternativos para el control de plagas.

Sumario de la invención

40 Se proporcionan composiciones y métodos para conferir actividad plaguicida a bacterias, plantas, células de plantas, tejidos y semillas. Las composiciones incluyen moléculas de ácido nucleico que codifican secuencias para polipéptidos plaguicidas e insecticidas, vectores que comprenden esas moléculas de ácido nucleico y células huésped que comprenden los vectores. Las composiciones también incluyen las secuencias de los polipéptidos plaguicidas y los anticuerpos de esos polipéptidos. Las secuencias de nucleótidos se pueden usar en construcciones de ADN o casetes de expresión para la transformación y expresión en organismos, que incluyen microorganismos y plantas. Las secuencias de nucleótidos o aminoácidos pueden ser secuencias sintéticas que se han diseñado para la expresión en un organismo que incluye, pero sin limitación, un microorganismo o una planta. Las composiciones también comprenden bacterias transformadas, plantas, células de plantas, tejidos y semillas.

50 En particular, se proporcionan moléculas de ácido nucleico aisladas o recombinantes que codifican una proteína plaguicida. Además, se abarcan las secuencias de aminoácidos correspondientes a la proteína plaguicida. Por lo tanto, la presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico recombinante que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que es una variante de SEQ ID NO:2, donde dicho polipéptido tiene actividad plaguicida mejorada relativa a la SEQ ID NO:2 y donde dicha secuencia de nucleótidos se selecciona de entre SEQ ID NO:4, 5 o 6, o una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEQ ID NO:7, 8, 9, 10, 11 o 12. La invención también proporciona un polipéptido recombinante que es una variante de SEQ ID NO:2, donde dicho polipéptido tiene actividad plaguicida mejorada relativa a la SEQ ID NO:2 y comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEQ ID NO: 7, 8, 9, 10, 11 o 12, preferentemente que comprende adicionalmente secuencias de aminoácidos heterólogos.

60 La presente invención proporciona además una célula huésped que contiene la molécula de ácido nucleico recombinante de la invención, preferentemente que es una célula huésped bacteriana o una célula de planta. La invención también proporciona una planta transgénica que comprende la célula huésped de la planta de la invención, preferentemente donde dicha planta se selecciona de entre el grupo que consiste en maíz, sorgo, trigo, col, girasol, tomate, crucíferas, pimientos, patata, algodón, arroz, soja, remolacha azucarera, caña de azúcar, tabaco, cebada y colza.

La invención proporciona además un anticuerpo que se une selectivamente al polipéptido de la invención.

La invención también proporciona una composición que comprende el polipéptido de la invención, preferentemente donde dicha composición:

- 5
- (a) se selecciona de entre el grupo que consiste en un polvo, un polvo fino, un microgránulo, un gránulo, una pulverización, una emulsión, un coloide y una solución;
 - (b) se prepara por desecación, liofilización, homogeneización, extracción, filtración, centrifugación, sedimentación o concentración de un cultivo de células de *Bacillus thuringiensis*;
 - 10 (c) comprende de aproximadamente 1 % a aproximadamente 99 % en peso de dicho polipéptido.

La invención proporciona además una planta que tiene incorporada de forma estable en su genoma una construcción de ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que es una variante de SEQ ID NO:2, donde dicho polipéptido tiene actividad plaguicida mejorada relativa a la SEQ ID NO: 2, Donde
15 dicha secuencia de nucleótidos se selecciona de entre SEQ ID NO: 4, 5 o 6, o una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEQ ID NO:7, 8, 9, 10, 11 o 12, donde dicha secuencia de nucleótidos está operativamente unida a un promotor que dirige la expresión de una secuencia de codificación en una célula de planta, preferentemente donde dicha planta es una célula de planta.

20 También se proporciona una semilla transgénica de la planta de la invención, donde dicha semilla comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada de entre SEQ ID NO:4, 5 o 6, o una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEQ ID NO:7, 8, 9, 10, 11 o 12.

25 Se proporcionan métodos de producción de los polipéptidos de la invención, y para el uso de esos polipéptidos para controlar o matar una plaga de lepidópteros, coleópteros, nematodos o dípteros. También se hace referencia a los métodos y kits de detección de los ácidos nucleicos y los polipéptidos de la invención en una muestra.

La presente invención proporciona además:

- 30
- un método de producción de un polipéptido con actividad plaguicida, que comprende cultivar la célula huésped de la invención en condiciones en las que se expresa la molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido; y
 - un método de producción de un polipéptido con actividad plaguicida, que comprende cultivar la célula huésped de la invención en condiciones en las que se expresa la molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido.
 - 35 • un método de protección de una planta de una plaga de insectos, que comprende expresar en una planta o célula de la misma una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que es una variante de SEQ ID NO:2, donde dicho polipéptido tiene actividad plaguicida mejorada relativa a la SEQ ID NO: 2, donde dicha secuencia de nucleótidos se selecciona de entre SEQ ID NO:4, 5 o 6, o una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEQ ID NO:7, 8, 9, 10, 11 o 12; y
 - 40 • un método de aumento del rendimiento en una planta que comprende cultivar en un campo una planta o una semilla de la misma que tiene incorporado de manera estable en su genoma una construcción de ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína que tiene actividad plaguicida, donde dicha secuencia de nucleótidos codifica un polipéptido que es una variante de SEQ ID NO:2, donde dicho polipéptido tiene actividad plaguicida mejorada relativa a la SEQ ID NO: 2, donde dicha secuencia de nucleótidos se selecciona de entre SEQ ID NO:4, 5 o 6, o una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEQ ID NO:7, 8, 9, 10, 11 o 12, donde dicho campo está infestado con una
45 plaga contra la cual dicho polipéptido tiene actividad plaguicida.

Las composiciones y los métodos de la invención son útiles para la producción de organismos con una resistencia o tolerancia potenciada a las plagas. Estos organismos y composiciones que comprenden los organismos son deseables para fines agrícolas.

Descripción detallada

55 La presente invención se refiere a composiciones y métodos de regulación de la resistencia o tolerancia a plagas en organismos, particularmente plantas o células de plantas. Por «resistencia» se entiende que la plaga (p. ej., un insecto) se elimina tras la ingestión u otro contacto con los polipéptidos de la invención. Por «tolerancia» se entiende un deterioro o una reducción en el movimiento, la alimentación, la reproducción u otras funciones de la plaga. Los métodos implican transformar organismos con una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína plaguicida de la invención. En particular, las secuencias de nucleótidos de la invención son útiles para la preparación de plantas y microorganismos que poseen actividad plaguicida. Por tanto, se proporcionan bacterias transformadas, plantas, células de plantas, tejidos de plantas y semillas. Las composiciones son ácidos nucleicos y proteínas plaguicidas de especies bacterianas. Las secuencias se usan en la construcción de vectores de expresión para la 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 por métodos conocidos en la técnica, tales como intercambio de dominios o transposición de ADN. Las proteínas se usan para controlar o matar poblaciones de plagas de lepidópteros, coleópteros, dípteros y nematodos y para producir composiciones con
65

actividad plaguicida.

Por «toxina plaguicida» o «proteína plaguicida» se entiende una toxina que tiene actividad tóxica contra una o más plagas, incluyendo, pero sin limitación, los 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 de organismos que incluyen, por ejemplo, *Bacillus sp.*, *Clostridium bifermentans* y *Paenibacillus popilliae*. Las proteínas plaguicidas incluyen secuencias de aminoácidos deducidas a partir de las secuencias de nucleótidos de longitud completa divulgadas en el presente documento, y secuencias de aminoácidos que son más cortas que las secuencias de longitud completa, debido al uso de un sitio alternativo de inicio aguas abajo o debido al procesamiento que produce un proteína más corta que tiene actividad plaguicida. El procesamiento se puede producir en el organismo en el que se expresa la proteína, o en la plaga después de la ingestión de la proteína.

Por tanto, en el presente documento se proporcionan novedosas secuencias de nucleótidos aisladas o recombinantes que confieren actividad plaguicida. Por lo tanto, la presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico recombinante que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que es una variante de SEQ ID NO:2, donde dicho polipéptido tiene actividad plaguicida mejorada relativa a la SEQ ID NO:2 y donde dicha secuencia de nucleótidos se selecciona de entre SEQ ID NO:4, 5 o 6, o una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEQ ID NO:7, 8, 9, 10, 11 o 12. También se proporcionan las secuencias de aminoácidos de las proteínas plaguicidas. Por lo tanto, la presente invención proporciona además un polipéptido recombinante con actividad plaguicida, donde dicho polipéptido es una variante de SEQ ID NO:2, donde dicho polipéptido tiene actividad plaguicida mejorada relativa a la SEQ ID NO:2 y comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEQ ID NO: 7, 8, 9, 10, 11 o 12, preferentemente que comprende adicionalmente secuencias de aminoácidos heterólogos. La proteína resultante de la traducción de este gen permite que las células controlen o eliminen las plagas que lo ingieren.

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

Un aspecto de la invención se refiere a una molécula de ácido nucleico recombinante que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que es una variante de SEQ ID NO:2, donde dicho polipéptido tiene actividad plaguicida mejorada relativa a la SEQ ID NO:2 y donde dicha secuencia de nucleótidos se selecciona de entre SEQ ID NO:4, 5 o 6, o una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEQ ID NO:7, 8, 9, 10, 11 o 12. Tal como se usa en el presente documento, el término «molécula de ácido nucleico» pretende incluir moléculas de ADN (p. ej., ADN recombinante, ADNc o ADN genómico) y moléculas de ARN (p. ej., ARNm) y análogos del ADN o ARN generado usando análogos de nucleótidos. La molécula de ácido nucleico puede ser monocatenaria o bicatenaria, pero preferentemente es ADN bicatenario.

Una secuencia de ácido nucleico «aislada» (o ADN) se usa en el presente documento para referirse a una secuencia de ácido nucleico (o ADN) que ya no está en su entorno natural, por ejemplo en una célula huésped de planta, o bacteriana recombinante, o *in vitro*. En algunas realizaciones, un ácido nucleico «aislado» está libre de secuencias (preferentemente secuencias que codifican proteínas) que flanquean naturalmente el ácido nucleico (es decir, secuencias localizadas en los extremos 5' y 3' del ácido nucleico) en el ADN genómico del organismo del cual procede el ácido nucleico. Para los fines de la invención, «aislado» cuando se usa para referirse a moléculas de ácido nucleico excluye cromosomas aislados. Por ejemplo, en diversas realizaciones, la molécula de ácido nucleico aislada que codifica una proteína plaguicida puede contener menos de aproximadamente 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2 kb, 1 kb, 0,5 kb, o 0,1 kb de secuencias de nucleótidos que flanquean naturalmente la molécula de ácido nucleico en el ADN genómico de la célula de la cual procede el ácido nucleico. Una proteína plaguicida que está sustancialmente libre de material celular incluye preparaciones de proteína que tienen menos de aproximadamente 30 %, 20 %, 10 % o 5 % (en peso seco) de proteína no plaguicida (también denominada en el presente documento «proteína contaminante»).

Las secuencias de nucleótidos que codifican las proteínas de la presente invención incluyen la secuencia expuesta en SEQ ID NO:4, 5 o 6. La secuencia de aminoácidos correspondiente para la proteína plaguicida codificada por esta secuencia de nucleótidos se expone en SEQ ID NO:7, 8,9, 10, 11 o 12.

Por «actividad mejorada» se entiende un aumento de al menos aproximadamente el 10 %, al menos aproximadamente el 15 %, al menos aproximadamente el 20%, al menos aproximadamente el 25%, al menos aproximadamente el 30%, al menos aproximadamente el 35%, al menos aproximadamente el 40%, al menos aproximadamente el 50%, el 60 %, el 70 %, el 80%, el 90 % o mayor, o al menos aproximadamente 1,5 veces, al menos aproximadamente 2 veces, al menos aproximadamente 2,5 veces, al menos aproximadamente 3 veces o un aumento mayor en la actividad plaguicida de la variante de proteína relativa a la actividad plaguicida de Axmi205. En algunas realizaciones, la mejora consiste en una disminución en la LC50 relativa a la CL50 de Axmi205, p. ej., una disminución de al menos aproximadamente el 10 %, al menos aproximadamente el 20%, al menos aproximadamente el 30%, al menos aproximadamente el 40%, al menos aproximadamente el 50%, al menos aproximadamente el 55%, al menos aproximadamente el 60 %, o una reducción mayor en la LC50.

En diversas realizaciones, la actividad es actividad de lepidópteros. En algunas realizaciones, la actividad es

actividad de gusanos de la raíz, por ejemplo, el gusano de la raíz del maíz occidental. Los métodos de medición de la actividad plaguicida son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Czapla y Lang (1990) *J. Econ. Entomol.* 83:2480-2485; Andrews y col., (1988) *Biochem. J.* 252:199-206; Marrone y col., (1985) *J. of Economic Entomology* 78:290-293; y la patente de EE.UU. n.º 5.743.477.

- 5
- Para determinar el porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos o de dos ácidos nucleicos, las secuencias se alinean para fines de comparación óptima. El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, identidad porcentual = número de posiciones idénticas/número total de posiciones (p. ej., posiciones solapadas) x 100). En un caso, las dos
- 10 secuencias son de la misma longitud. En otro caso, la comparación es a través de la totalidad de la secuencia de referencia. El porcentaje de identidad entre dos secuencias puede determinarse usando técnicas similares a las descritas a continuación, con o sin permitir huecos. Al calcular el porcentaje de identidad, típicamente se cuentan las coincidencias exactas.
- 15 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. EE.UU.* 87: 2264, modificado como en Karlin y Altschul (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 90:5873-5877. Dicho algoritmo se incorpora en los programas BLASTN y BLASTX de Altschul y col., (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403. Las búsquedas de nucleótidos BLAST se pueden realizar con el
- 20 programa BLASTN, puntuación = 100, longitud de palabra = 12, para obtener secuencias de nucleótidos homólogas a las moléculas de ácido nucleico tipo plaguicida de la invención. Las búsquedas de proteína BLAST se pueden realizar con el programa BLASTX, puntuación = 50, longitud de palabra = 3, para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a las moléculas de proteína plaguicida de la invención. Para obtener alineaciones vacías para fines de comparación, se puede utilizar Gapped BLAST (en BLAST 2.0) como se describe en Altschul y col.,
- 25 (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389. Como alternativa, se puede usar PSI-Blast para realizar una búsqueda iterada que detecta relaciones distantes entre moléculas. Véase Altschul y col., (1997) *supra*. Cuando se utilizan los programas BLAST, Gapped BLAST y PSI-Blast, se pueden usar los parámetros predeterminados de los programas respectivos (p. ej., BLASTX y BLASTN). La alineación también se puede realizar manualmente por inspección.
- 30 Otro ejemplo no limitante de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de secuencias es el algoritmo ClustalW (Higgins y col., (1994) *Nucleic Acids Res.* 22:4673-4680). ClustalW compara secuencias y alinea la totalidad de la secuencia de aminoácidos o ADN, y así puede proporcionar datos sobre la conservación de la secuencia de aminoácidos completa. El algoritmo ClustalW se usa en varios paquetes de software de análisis de
- 35 ADN/aminoácidos disponibles en el mercado, tales como el módulo ALIGNX del Vector NTI Program Suite (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA). Después del alineamiento de las secuencias de aminoácidos con ClustalW, se puede evaluar el porcentaje de identidad de aminoácidos. Un ejemplo no limitante de un programa de software útil para el análisis de alineaciones de ClustalW es GENEDOC™. GENEDOC™ (Karl Nicholas) permite la evaluación de la similitud y la identidad de aminoácidos (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*
- 40 4:11-17. Dicho algoritmo está incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0), que es parte del paquete de software GCG Wisconsin Genetics, versión 10 (disponible en Accelrys, Inc., 9685 Scranton Rd., San Diego, CA, EE. UU.). Cuando se utiliza el programa ALIGN para comparar secuencias de aminoácidos, se puede usar una tabla de residuos de peso PAM120, una penalización de longitud de hueco de 12 y una penalización de hueco de 4.
- 45 A menos que se indique otra cosa, GAP Versión 10, que usa el algoritmo de Needleman y Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48(3):443-453, se usará para determinar la identidad de secuencia o similitud usando los siguientes parámetros: % de identidad y % de similitud para una secuencia de nucleótidos usando un peso GAP de 50 y longitud de onda de 3, y la matriz de puntuación nwsgapdna.cmp; % de identidad y % de similitud para una
- 50 secuencia de nucleótidos usando un peso GAP de 8 y longitud de onda 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 cualesquiera en cuestión, genera una alineación que tenga coincidencias de residuos de nucleótidos idénticas y una identidad de secuencia porcentual idéntica cuando se compare con la alineación correspondiente generada por la Versión 10 de GAP.
- 55 La invención también abarca variantes de moléculas de ácido nucleico. Las «variantes» de las secuencias de nucleótidos que codifican la proteína plaguicida incluyen aquellas secuencias que codifican las proteínas plaguicidas divulgadas en el presente documento pero que difieren conservativamente debido a la degeneración del código genético así como a las que son suficientemente idénticas como se trató anteriormente. Las variantes alélicas que se producen naturalmente se pueden identificar con el uso de técnicas de biología molecular bien conocidas, tales
- 60 como la reacción en cadena de la polimerasa (RCP) y las técnicas de hibridación como se describe a continuación. Las variantes de secuencias de nucleótidos también incluyen secuencias de nucleótidos obtenidas sintéticamente que se han generado, por ejemplo, usando mutagénesis dirigida al sitio pero que aún codifican las proteínas plaguicidas divulgadas en la presente invención como se trata a continuación. Las variantes de proteínas abarcadas por la presente invención son biológicamente activas, es decir, continúan teniendo la actividad biológica deseada de
- 65 la proteína nativa, es decir, conservan la actividad plaguicida. En diversas realizaciones, la actividad mejora relativa a Axmi205. Por «conserva la actividad» se entiende que la variante tendrá al menos aproximadamente el 30 %, al

menos aproximadamente el 50 %, al menos aproximadamente el 70 %, o al menos aproximadamente el 80 % de la actividad plaguicida de la proteína nativa. Los métodos de medición de la actividad plaguicida son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Czaplá y Lang (1990) J. Econ. Entomol. 83: 2480-2485; Andrews y col., (1988) Biochem. J. 252:199-206; Marrone y col., (1985) J. of Economic Entomology 78:290-293; y la patente de EE.UU. n.º 5.743.477.

Usando métodos tales como RCP, hibridación, y similares, se pueden identificar secuencias plaguicidas correspondientes, teniendo dichas secuencias una identidad sustancial con las secuencias de la invención. Véase, por ejemplo, Sambrook y Russell (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY) e Innis, y col., (1990) PCR Protocols: Una guía de métodos y aplicaciones (Academic Press, NY).

En un método de hibridación, se puede usar la totalidad o parte de la secuencia de nucleótidos plaguicida para seleccionar bibliotecas de ADNc o genómicas. Los métodos de construcción de dichas bibliotecas de ADNc y genómicas son generalmente conocidos 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 ADNc, fragmentos de ARN u otros oligonucleótidos, y pueden marcarse con un grupo detectable tal como ³²P, o cualquier otro marcador detectable, tal como otros radioisótopos, un compuesto fluorescente, una enzima, o un cofactor enzimático. Las sondas de hibridación pueden prepararse marcando oligonucleótidos sintéticos basándose en la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína plaguicida conocida divulgada en el presente documento. Los cebadores degenerados diseñados sobre la base de nucleótidos o restos de aminoácidos conservados en la secuencia de nucleótidos o la secuencia de aminoácidos codificada pueden usarse adicionalmente. Típicamente, la sonda comprende una región de la secuencia de nucleótidos que se hibrida en condiciones rigurosas a al menos aproximadamente 12, al menos aproximadamente 25, al menos aproximadamente 50, 75, 100, 125, 150, 175 o 200 nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos que codifica una proteína plaguicida de la invención o a un fragmento o variante de la misma. Los métodos de preparación de sondas para hibridación son generalmente conocidos en la técnica y se divulgan en Sambrook y Russell, 2001, *supra*.

Por ejemplo, una secuencia de proteína plaguicida completa divulgada en el presente documento, o una o más porciones de la misma, se puede usar como una sonda que puede hibridarse específicamente con secuencias similares a proteínas plaguicidas correspondientes y ARN mensajeros. Para conseguir la hibridación específica en una diversidad de condiciones, dichas sondas incluyen secuencias que son únicas y tienen preferentemente al menos aproximadamente 10 nucleótidos de longitud, o al menos aproximadamente 20 nucleótidos de longitud. Dichas sondas se pueden usar para amplificar las secuencias plaguicidas correspondientes de un organismo elegido por RCP. Esta técnica puede usarse para aislar secuencias de codificación adicionales de un organismo deseado o como un ensayo de diagnóstico para determinar la presencia de secuencias de codificación en un organismo. Las técnicas de hibridación incluyen selección de hibridación de bibliotecas de ADN en placas (placas o colonias; véase, por ejemplo, Sambrook y col., (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York).

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 bajo las cuales una sonda se hibridará con su secuencia objetivo en un grado detectablemente mayor que con otras secuencias (p. ej., al menos 2 veces sobre el antecedente). Las condiciones rigurosas dependen de la secuencia y serán diferentes en diferentes circunstancias. Controlando la rigurosidad de la hibridación y/o las condiciones de lavado, se pueden identificar secuencias objetivo que son 100% complementarias a la sonda (sondeo homólogo). Como alternativa, las condiciones de rigurosidad se pueden ajustar para permitir algún desapareamiento en las secuencias de manera que se detecten grados más bajos de similitud (sondeo heterólogo). En general, una sonda tiene menos de aproximadamente 1000 nucleótidos de longitud, preferentemente menos de 500 nucleótidos de longitud.

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

Típicamente, la especificidad es función de los lavados posteriores a la hibridación, siendo los factores críticos la fuerza iónica y la temperatura de la solución de lavado final. Para los híbridos ADN-ADN, la T_m puede aproximarse a

partir de la ecuación de Meinkoth y Wahl (1984) Anal. Biochem. 138:267-284: $T_m = 81,5 \text{ }^\circ\text{C} + 16,6 (\log M) + 0,41 (\% \text{ GC}) - 0,61 (\% \text{ de formamida}) - 500/l$; donde M es la molaridad de los cationes monovalentes, % de GC es el porcentaje de los nucleótidos guanosina y citosina en el ADN, % form es el porcentaje de formamida en la solución de hibridación, y L es la longitud del híbrido en pares de bases. La T_m es la temperatura (bajo una fuerza iónica y un pH definidos) a la que el 50% de una secuencia objetivo complementaria se hibrida con una sonda perfectamente equiparada. T_m se reduce en aproximadamente 1 °C por cada 1% de desapareamiento; por tanto, las condiciones de T_m , hibridación y/o lavado pueden ajustarse para hibridar con secuencias de la identidad deseada. Por ejemplo, si se buscan secuencias con una identidad $\geq 90 \%$, la T_m puede reducirse 10 °C. Generalmente, las condiciones rigurosas se seleccionan para que sean aproximadamente 5 °C más bajas que el punto de fusión térmico (T_m) para la secuencia específica y su complemento a una fuerza iónica y pH definidos. Sin embargo, las condiciones muy rigurosas pueden utilizar una hibridación y/o lavado a 1, 2, 3 o 4 °C por debajo del punto de fusión térmico (T_m); Las condiciones moderadamente rigurosas pueden utilizar una hibridación y/o lavado a 6, 7, 8, 9 o 10 °C por debajo del punto de fusión térmico (T_m); las condiciones de baja rigurosidad pueden utilizar una hibridación y/o lavado a 11, 12, 13, 14, 15 o 20 °C por debajo del punto de fusión térmico (T_m). Usando la ecuación, las composiciones de hibridación y lavado, y la T_m deseada, los expertos habituales entenderán que las variaciones en la rigurosidad de las soluciones de hibridación y/o lavado están inherentemente descritas. Si el grado de desapareamiento deseado da como resultado una T_m de menos de 45 °C (solución acuosa) o 32 °C (solución de formamida), se prefiere aumentar la concentración de SSC de modo que se pueda usar una temperatura más alta. Una exhaustiva guía para la hibridación de ácidos nucleicos se encuentra en Tijssen (1993) Técnicas de laboratorio en bioquímica y biología-hibridación molecular con sondas de ácido nucleico, parte I, capítulo 2 (Elsevier, Nueva York); y Ausubel y col., eds., (1995) Current Protocols in Molecular Biology, capítulo 2 (Greene Publishing y Wiley-Interscience, Nueva York). Véase Sambrook y col., (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York).

25 Proteínas aisladas y variantes y fragmentos de las mismas

Las proteínas plaguicidas también están abarcadas dentro de la presente invención. Por «proteína plaguicida» se entiende una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:7, 8, 9, 10, 11 o 12. Una «proteína aislada» se usa para referirse a una proteína que ya no está en su entorno natural, por ejemplo en una célula huésped de planta, o bacteriana recombinante, o in vitro.

Por «actividad mejorada» se entiende un aumento de al menos aproximadamente el 10 %, al menos aproximadamente el 15 %, al menos aproximadamente el 20 %, al menos aproximadamente el 25 %, al menos aproximadamente el 30 %, al menos aproximadamente el 35 %, al menos aproximadamente el 40 %, al menos aproximadamente el 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o mayor, o al menos aproximadamente 1,5 veces, al menos aproximadamente 2 veces, al menos aproximadamente 2,5 veces, al menos aproximadamente 3 veces o un aumento mayor en la actividad plaguicida de la variante de proteína relativa a la actividad plaguicida de Axmi205. En algunas realizaciones, la mejora consiste en una disminución en la LC50 relativa a la CL50 de Axmi205, p. ej., una disminución de al menos aproximadamente el 10 %, al menos aproximadamente el 20 %, al menos aproximadamente el 30 %, al menos aproximadamente el 40 %, al menos aproximadamente el 50 %, al menos aproximadamente el 55 %, al menos aproximadamente el 60 %, o una reducción mayor en la LC50. Los métodos de medición de la actividad plaguicida son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Czaplá y Lang (1990) J. Econ. Entomol. 83:2480-2485; Andrews y col., (1988) Biochem. J. 252:199-206; Marrone y col., (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 iniciación de metionina en las proximidades del inicio del marco de lectura abierto. A menudo, el inicio de la traducción en uno o más de estos codones de inicio conducirá a la generación de una proteína funcional. Estos codones de inicio pueden incluir codones ATG. Sin embargo, bacterias tales como *Bacillus sp.* también reconoce el codón GTG como un codón de inicio, 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 puede iniciarse en un codón TTG, aunque en este caso el TTG codifica una metionina. Además, a menudo no se determina *a priori* cuál de estos codones se usa naturalmente en la bacteria. Por tanto, se entiende que el uso de uno de los codones de metionina alternativos también puede conducir a la generación de proteínas plaguicidas. Estas proteínas plaguicidas están abarcadas en la presente invención y se pueden usar en los métodos de la presente invención. Se entenderá que, cuando se exprese en plantas, será necesario alterar el codón de inicio alternativo a ATG para una traducción adecuada.

Los anticuerpos para los polipéptidos de la presente invención también están abarcados. Los métodos de producción de anticuerpos son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Harlow y Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY; patente de EE.UU. n.º 4.196.265).

Por tanto, un aspecto de la invención se refiere a anticuerpos, que se unen específicamente a una o más de las moléculas de proteína de la invención. En una realización particularmente preferente, el anticuerpo se une específicamente a una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:7, 8, 9, 10, 11 o 12. En otra realización, el anticuerpo se une específicamente a una proteína de fusión que comprende una secuencia de

aminoácidos seleccionada de entre la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:7, 8, 9, 10, 11 o 12.

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

Vectores

Se puede proporcionar una secuencia plaguicida de la invención en un casete de expresión para la expresión en una planta de interés. Por «casete de expresión de plantas» se entiende una construcción de ADN que puede dar como resultado la expresión de una proteína a partir de un marco de lectura abierto en una célula de planta. Típicamente, estos contienen un promotor y una secuencia de codificación. A menudo, dichas construcciones también contendrán una región 3' no traducida. Dichas construcciones pueden contener una «secuencia señal» o «secuencia líder» para facilitar el transporte cotraduccional o postraduccionales del péptido a determinadas estructuras intracelulares tales como el cloroplasto (u otro plasto), el retículo endoplásmico o el aparato de Golgi.

Por «secuencia señal» se entiende una secuencia que se sabe o se sospecha que da como resultado un transporte de péptidos cotraduccional o postraduccionales a través de la membrana de la célula. En eucariotas, esto típicamente implica la secreción en el aparato de Golgi, con alguna glicosilación resultante. Las toxinas insecticidas de bacterias a menudo se sintetizan como protoxinas, que se activan protolíticamente en el intestino de la plaga objetivo (Chang (1987) *Methods Enzymol.*, 153:507-516). En algunas realizaciones de la presente invención, la secuencia señal se localiza en la secuencia nativa, o se puede obtener de una secuencia de la invención. Por «secuencia líder» se entiende cualquier secuencia que, cuando se traduce, da como resultado una secuencia de aminoácidos suficiente para desencadenar el transporte cotraduccional de la cadena peptídica a un orgánulo subcelular. Por tanto, esto incluye secuencias líder que se dirigen al transporte y/o glicosilación mediante el paso al retículo endoplasmático, el paso a las vacuolas, plastos que incluyen cloroplastos, mitocondrias y similares.

Por «vector de transformación de plantas» se entiende una molécula de ADN que es necesaria para la transformación eficiente de una célula de planta. Dicha molécula puede consistir en uno o más casetes de expresión de plantas, y puede organizarse en más de una molécula de ADN «vector». Por ejemplo, los vectores binarios son vectores de transformación de plantas que utilizan dos vectores de ADN no contiguos para codificar todas las funciones necesarias de acción cis y trans para la transformación de células de plantas (Hellens y Mullineaux (2000) *Trends in Plant Science* 5:446-451). «Vector» se refiere a una construcción de ácido nucleico diseñada para la transferencia entre diferentes células huésped. «Vector de expresión» se refiere a un vector que tiene la capacidad de incorporar, integrar y expresar secuencias de ADN heterólogas o fragmentos en una célula extraña. El casete incluirá secuencias reguladoras 5' y 3' operativamente unidas a una secuencia de la invención. Por «operativamente unido» se entiende un enlace funcional entre un promotor y una segunda secuencia, donde la secuencia promotora inicia y actúa como mediador de la transcripción de la secuencia de ADN correspondiente a la segunda secuencia. Generalmente, operativamente unido significa que las secuencias de ácido nucleico que se unen son contiguas y, cuando sea necesario unir dos regiones codificantes de proteínas, contiguas y en el mismo marco de lectura. El casete puede contener adicionalmente al menos un gen adicional a cotransformar en el organismo. Como alternativa, el gen o genes adicionales pueden proporcionarse en múltiples casetes de expresión.

«Promotor» se refiere a una secuencia de ácido nucleico que funciona para dirigir la transcripción de una secuencia de codificación aguas abajo. El promotor junto con otras secuencias de ácido nucleico reguladoras transcripcionales y traduccionales (también denominadas «secuencias de control») son necesarias para la expresión de una secuencia de ADN de interés.

Dicho casete de expresión se proporciona con una pluralidad de sitios de restricción para la inserción de la secuencia plaguicida bajo la regulación transcripcional de las regiones reguladoras.

El casete de expresión incluirá 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 transcripcional y transcripcional (es decir, una región de terminación) funcional en las plantas. El promotor puede ser nativo o análogo, o extraño o heterólogo, a la planta huésped y/o a la secuencia de ADN de la invención. Además, el promotor puede ser la secuencia natural o, como alternativa una secuencia sintética. Cuando el promotor es «nativo» u «homólogo» a la planta huésped, se entiende que el promotor se encuentra en la planta nativa en la que se introduce el promotor. Cuando el promotor es «extraño» o «heterólogo» a la secuencia de ADN de la invención, se entiende que el promotor no es el promotor nativo o de origen natural para la secuencia de ADN operativamente unida de la invención.

La región de terminación puede ser nativa con la región de iniciación de la transcripción, puede ser nativa con la secuencia de ADN operativamente unida de interés, puede ser nativa con la planta huésped, o se puede obtener de otra fuente (es decir, extraña o heteróloga al promotor, a la secuencia de ADN de interés, a la planta huésped, o a

cualquier combinación de los mismos). Las regiones de terminación convenientes están disponibles del plásmido Ti de *A. tumefaciens*, tales como la sintasa de octopina y regiones de terminación de la nopalina sintasa. Véase también Guerineau y col., (1991) Mol. Gen. Genet. 262:141-144; Proudfoot (1991) Cell 64:671-674; Sanfacon y col., (1991) Genes Dev. 5:141-149; Mogen y col., (1990) Plant Cell 2:1261-1272; Munroe y col., (1990), Gene 91:151-158; 5 Ballas y col., (1989) Nucleic Acids Res. 17:7891-7903; y Joshi y col., (1987) Nucleic Acid Res. 15:9627-9639.

Cuando sea apropiado, el gen o genes pueden ser optimizado para una mayor expresión en la célula huésped transformada. Es decir, los genes pueden sintetizarse usando codones preferentes de células huésped para mejorar la expresión, o se pueden sintetizar usando codones con una frecuencia de uso de codones preferentes de huésped. 10 Generalmente, se aumentará el contenido de GC del gen. Véase, por ejemplo, Campbell y Gowri (1990) Plant Physiol. 92:1-11 para un análisis del uso de codones preferentes de huésped. Se dispone de métodos en la técnica para la síntesis de genes preferentes de plantas. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n.º 5.380.831, y 5.436.391, y Murray y col., (1989) Nucleic Acids Res. 17:477-498.

En una realización, la proteína plaguicida se dirige al cloroplasto para la expresión. De esta manera, cuando 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 son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Von Heijne y col., (1991) Plant Mol. Biol. Rep. 9:104-126; Clark y col., (1989) J. Biol. Chem. 264:17544-17550; Della-Cioppa y col., (1987) Plant Physiol. 84:965-968; Romer y col., (1993) Biochem. Biophys. Res. Commun. 196:1414-1421; y Shah y col., (1986) Science 233: 478-481. 20

El gen plaguicida a dirigir al cloroplasto puede ser optimizado para la expresión en el cloroplasto para justificar las diferencias en el uso del codón entre el núcleo de la planta y este orgánulo. De esta manera, los ácidos nucleicos de interés se pueden sintetizar usando codones preferentes de cloroplastos. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n.º 5.380.831. 25

Transformación de plantas

Los métodos de la invención implican la introducción de una construcción de nucleótidos en una planta. Por «introducción» se entiende presentar a la planta la construcción de nucleótidos de tal manera que pueda acceder al interior de una célula de la planta. Los métodos de la invención no requieren que se use un método particular para la introducción de una construcción de nucleótidos en una planta, únicamente que la construcción de nucleótidos pueda acceder al interior de al menos una célula de la planta. Los métodos de introducción de construcciones de nucleótidos en plantas son conocidos en la técnica, incluyendo, pero sin limitación, métodos de transformación estable, métodos de transformación transitoria, y métodos mediados por virus. 30 35

Por «planta» se entiende plantas completas, órganos de plantas (p. ej., hojas, tallos, raíces, etc.), semillas, células de plantas, propágulos, embriones y progenie de la misma. Las células de plantas pueden ser diferenciadas o no diferenciadas (p.ej., un callo, células de cultivo en suspensión, protoplastos, células de las hojas, células de la raíz, células del floema, polen). 40

Las «plantas transgénicas» o «plantas transformadas» o «plantas transformadas de forma estable» o células o tejidos se refiere a plantas que han incorporado o integrados secuencias de ácido nucleico exógeno o fragmentos de ADN en la célula de la planta. Estas secuencias de ácidos nucleicos incluyen aquellas que son exógenas, o no están presentes en la célula de la planta sin transformar, así como aquellas que pueden ser endógenas o están presente en la célula de planta no transformada. «Heterólogo» generalmente se refiere a las secuencias de ácido nucleico que no son endógenas a la célula o a la parte del genoma nativo en el que están presentes, y se han añadido a la célula por infección, transfección, microinyección, electroporación, eicroproyección, o similares. 45 50

Las plantas transgénicas de la invención expresan una o más de las secuencias de plaguicidas divulgadas en el presente documento. En diversas realizaciones, la planta transgénica comprende además uno o más genes adicionales para la resistencia a los insectos, por ejemplo, uno o más genes adicionales para el control de plagas de coleópteros, lepidópteros, heterópteros, o nematodos. Se entenderá por un experto en la técnica que la planta transgénica puede comprender cualquier gen que transmite un rasgo agronómico de interés. 55

La transformación de células de plantas se puede lograr por una de las técnicas varias conocidas en la técnica. El gen plaguicida de la invención puede ser modificado para obtener o potenciar la expresión en células de plantas. Típicamente, una construcción que expresa dicha proteína contendría un promotor para dirigir la transcripción del gen, así como una región no traducida 3' para permitir la terminación de la transcripción y de la poliadenilación. La organización de dichas construcciones es bien conocida en la técnica. En algunos casos, puede ser útil modificar por ingeniería el gen, de modo que el péptido resultante se secreta, o se dirige de otro modo dentro de la célula de la planta. Por ejemplo, el gen puede modificarse por ingeniería para contener un péptido señal para facilitar la transferencia del péptido al retículo endoplasmático. También puede ser preferente modificar por ingeniería el casete de expresión de la planta para contener un intrón, tal que se requiere el procesamiento del ARNm del intrón para la expresión. 60 65

- Típicamente este «casete de expresión de la planta» se insertará en un «vector de transformación de la planta». Este vector de transformación de la planta puede estar compuesto por uno o más vectores de ADN necesarios para conseguir la transformación de la planta. Por ejemplo, es una práctica común en la técnica utilizar vectores de transformación de plantas que están compuestos por más de un segmento de ADN contiguo. Estos vectores se denominan a menudo en la técnica «vectores binarios». Los vectores binarios así como los vectores con plásmidos auxiliares se usan con mayor frecuencia para la transformación mediada por *Agrobacterium*, donde el tamaño y la complejidad de los segmentos de ADN necesarios para conseguir la transformación eficiente es bastante grande, y es ventajoso para separar las funciones en moléculas de ADN separadas. Los vectores binarios típicamente contienen un vector de plásmido que contiene las secuencias que actúan en cis requeridas para la transferencia de T-ADN (tal como borde izquierdo y borde derecho), un marcador seleccionable que está modificado por ingeniería que puede expresarse en una célula de planta, y un «gen de Interés» (un gen modificado por ingeniería que puede expresarse en una célula de planta para la cual se desea la generación de plantas transgénicas). También están presentes en este vector de plásmido secuencias requeridas para la replicación bacteriana. Las secuencias que actúan en cis están dispuestas de una forma que permitan la transferencia eficiente en las células de las plantas y la expresión en la misma. Por ejemplo, el gen marcador seleccionable y el gen plaguicida se localizan entre los bordes izquierdo y derecho. A menudo, un segundo vector de plásmido contiene los factores que actúan en trans que actúan como mediadores de la transferencia de ADN-T de *Agrobacterium* a las células de plantas. A menudo, este plásmido contiene las funciones de virulencia (genes Vir) que permiten la infección de las células de plantas por *Agrobacterium*, y la transferencia de ADN por escisión en secuencias de borde y la transferencia de ADN mediada por vir, como se entiende en la técnica (Hellens y Mullineaux (2000) Trends in Plant Science 5:446-451). Se pueden usar varios tipos de cepas de *Agrobacterium* (p. ej., LBA4404, GV3101, EHA101, EHA105, etc.) para la transformación de plantas. El segundo vector de plásmido no es necesario para la transformación de las plantas por otros métodos tales como microproyección, microinyección, electroporación, polietilenglicol, etc.
- En general, los métodos de transformación de plantas implican la transferencia de ADN heterólogo en las células de la planta objetivo (p. ej., embriones inmaduros o maduros, cultivos en suspensión, callo no diferenciado, protoplastos, etc.), seguido de la aplicación de un nivel umbral máximo de selección adecuada (dependiendo del gen marcador seleccionable) para recuperar las células de las plantas transformadas del grupo de una masa de células sin transformar. Típicamente, los explantes se transfieren a un suministro fresco del mismo medio y se cultivan de forma habitual. Posteriormente, las células transformadas se diferencian en brotes después de colocar en un medio de regeneración suplementado con un nivel umbral máximo de un agente de selección. Los brotes se transfieren a continuación a un medio de enraizamiento selectivo para la recuperación de brotes o plántula enraizados. La plántula transgénica se cultiva entonces en una planta madura y produce semillas fértiles (p. ej., Hiei y col., (1994) The Plant Journal 6:271-282; Ishida y col., (1996) Nature Biotechnology 14:745-750). Típicamente, los explantes se transfieren a un suministro fresco del mismo medio y se cultivan de forma habitual. Una descripción general de las técnicas y métodos de generación de plantas transgénicas se encuentra en Ayres y Park (1994) Critical Reviews in Plant Science 13:219-239 y Bommineni y Jauhar (1997) Maydica 42:107-120. Dado que el material transformado contiene muchas células; tanto las células transformadas como no transformadas están presentes en cualquier parte del callo objetivo sometido o tejido o grupo de células. La capacidad para eliminar células no transformadas y permitir que las células transformadas proliferen, da como resultado cultivos de plantas transformadas. A menudo, la capacidad de eliminar células no transformadas es una limitación a la rápida recuperación de las células de plantas transformadas y la generación exitosa de plantas transgénicas.
- Los protocolos de transformación así como los protocolos para la introducción de secuencias de nucleótidos en las plantas pueden variar dependiendo del tipo de planta o célula de planta, es decir, monocotiledónea o dicotiledónea, dirigida para la transformación. La generación de plantas transgénicas se puede realizar mediante uno de los métodos varios, incluyendo, pero sin limitación, microinyección, electroporación, transferencia directa de genes, introducción de ADN heterólogo por *Agrobacterium* en células de plantas (transformación mediada por *Agrobacterium*), bombardeo de células de plantas con ADN heterólogo extraño adherido a partículas, aceleración de partículas balística, transformación del haz de aerosol (Solicitud publicada de EE.UU. n.º 20010026941; patente de EE.UU. n.º 4.945.050; publicación internacional del documento WO n.º 91/00915; solicitud publicada de EE.UU. n.º 2002015066), La transformación Lec1, y otros métodos diversos no mediados directamente por partículas para la transferencia de ADN.
- Los métodos de transformación de cloroplastos son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Svab y col., (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 87:8526-8530; Svab y Maliga (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 90:913-917; Svab y Maliga (1993) EMBO J. 12:601-606. El método se basa en la entrega de la pistola de partículas de ADN que contiene un marcador seleccionable y la dirección del ADN al genoma del plasto a través de recombinación homóloga. Además, la transformación de plastos se puede lograr por transactivación de un transgén silencioso transmitido por plastos por la expresión preferente de tejido de un ARN polimerasa codificado en el núcleo y dirigido al plasto. Dicho sistema ha sido presentado en McBride y col., (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 91:7301-7305.
- Después de la integración del ADN extraño heterólogo en células de plantas, se aplica a continuación un nivel umbral máximo de selección adecuada en el medio para matar las células no transformadas y separar y proliferar las células putativamente transformadas que sobreviven de este tratamiento de selección mediante la transferencia con regularidad a un medio natural. Por paso continuo y el problema con la selección adecuada, se identifica y se

prolifera las células que son transformadas con el vector del plásmido. Los métodos moleculares y bioquímicos se pueden usar a continuación para confirmar la presencia del gen heterólogo integrado de interés en el genoma de la planta transgénica.

5 Las células que han sido transformadas pueden ser cultivadas en plantas de acuerdo con las formas convencionales. Véase, por ejemplo, McCormick y col., (1986) Plant Cell Reports 5:81-84. Estas plantas pueden entonces ser cultivadas, y, polinizadas con la misma cepa transformada o con cepas diferentes, y el híbrido resultante que tiene la expresión constitutiva de la característica fenotípica deseada identificada. Se pueden cultivar
10 dos o más generaciones para asegurar que la expresión de la característica fenotípica deseada se mantiene de forma estable y se hereda, y se consigue entonces la cosecha de semillas para asegurar 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 de nucleótidos de la invención, por ejemplo, un casete de expresión de la invención, incorporado de manera estable en su genoma.

15 Evaluación de la transformación de plantas

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

20 El análisis RCP es un método rápido para detectar células transformadas, tejido o brotes para la presencia del gen incorporado en la etapa anterior antes del trasplante en el suelo (Sambrook y Russell (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY). RCP se lleva a cabo usando cebadores de oligonucleótidos específicos para el gen de interés o antecedentes del vector de *Agrobacterium*, etc.

25 La transformación de plantas puede confirmarse mediante el análisis de transferencia Southern de ADN genómico (Sambrook y Russell, 2001, *supra*). En general, el ADN total se extrae a partir del transformante, se digiere con enzimas de restricción adecuadas, se fracciona en un gel de agarosa y se transfiere a una membrana de nitrocelulosa o nylon. La membrana o «mancha» se prueba entonces con, por ejemplo, un fragmento de ADN diana radiomarcado con ³²P para confirmar la integración del gen introducido en el genoma de la planta de acuerdo con las técnicas convencionales (Sambrook y Russell, 2001, *supra*).

30 En el análisis de transferencia Northern, el ARN se aísla de los tejidos específicos del transformante, se fracciona en un gel de agarosa formaldehído y se transfiere sobre un filtro de nylon de acuerdo con procedimientos convencionales que se usan de forma habitual en la técnica (Sambrook y Russell, 2001, *supra*). La expresión de ARN codificada por el gen plaguicida se analiza a continuación, mediante la hibridación del filtro con una sonda radioactiva obtenida de un gen plaguicida, por métodos conocidos en la técnica (Sambrook y Russell, 2001, *supra*).

40 Los ensayos bioquímicos de transferencia Western, y similares pueden llevarse a cabo en plantas transgénicas que confirman la presencia de la proteína codificada por el gen plaguicida por procedimientos convencionales (Sambrook y Russell, 2001, *supra*) usando anticuerpos que se unen a uno o más epítomos presentes en la proteína plaguicida.

Actividad plaguicida en plantas

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

55 Se ha desarrollado un número de marcadores para su uso con células de plantas, tales como resistencia a cloranfenicol, el aminoglicósido G418, higromicina, o similares. Otros genes que codifican un producto implicado en el metabolismo del cloroplasto también se pueden usar como marcadores seleccionables. Por ejemplo, los genes que proporcionan resistencia a los herbicidas de las plantas, tales como glifosato, bromoxinil o imidazolinona pueden encontrar un uso particular. Dichos genes han sido presentados (Stalker y col.,(1985) J. Biol. Chem. 263:6310-6314 (resistencia del gen de la nitrilasa a bromoxinil); y Sathasivan y col.,(1990) Nucl. Acids Res. 18:2188 (resistencia del gen de AHAS a la imidazolinona). Además, los genes divulgados en el presente documento son útiles como marcadores para evaluar la transformación de células bacterianas o de plantas. Los métodos de detección de la presencia de un transgén en una planta, un órgano de plantas (p. ej., hojas, tallos, raíces, etc.), semillas, una célula
60 de planta, propágulos, embriones o progenie de la misma son bien conocidos en la técnica. En una realización, la presencia del transgén se detecta mediante el análisis para la detección de actividad plaguicida.

Las plantas fértiles que expresan una proteína plaguicida se pueden analizar para la detección de actividad plaguicida, y las plantas que muestran actividad óptima se seleccionan para su posterior reproducción. Se dispone de métodos en la técnica para ensayar la detección de actividad de plagas. Generalmente, la proteína se mezcla y se usa en ensayos de alimentación. Véase, por ejemplo, Marrone y col., (1985) J. of Economic Entomology 78:290-293.

La presente invención puede usarse para la transformación de cualquier especie de planta, incluyendo, pero sin limitación, monocotiledóneas o dicotiledóneas. Ejemplos de plantas de interés incluyen, pero sin limitación, callo (maíz), sorgo, trigo, girasol, tomate, crucíferas, pimientos, patata, algodón, arroz, soja, remolacha azucarera, caña de azúcar, tabaco, cebada y colza, *Brassica* sp., alfalfa, centeno, mijo, cártamo, cacahuets, batata, yuca, café, coco, piña, cítricos, cacao, té, plátano, aguacate, higo, guayaba, mango, aceituna, papaya, anacardos, nuez de macadamia, almendra, avena, verduras, plantas ornamentales y coníferas.

Las verduras incluyen, pero sin limitación, tomates, lechuga, judías verdes, judías de lima, guisantes, y los miembros del género *Curcumis* tales como pepino, melón y el melón almizcleño. Las plantas ornamentales incluyen, pero sin limitación, azalea, hortensia, hibisco, rosas, tulipanes, narcisos, petunias, claveles, flor de pascua, y el 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, colza., etc.).

Uso en el control de plaguicidas

Los métodos generales de empleo de cepas que comprenden una secuencia de nucleótidos de la presente invención, o una variante de la misma, en el control de plaguicidas o en la obtención por ingeniería de otros organismos como agentes plaguicidas son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n.º 5.039.523 y EP 0480762A2.

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

Como alternativa, el plaguicida se produce introduciendo un gen plaguicida en un huésped de la célula. La expresión del gen plaguicida resulta, directa o indirectamente, en la producción y el mantenimiento intracelular del plaguicida. En un aspecto de la presente invención, estas células se tratan a continuación en condiciones que prolongan la actividad de la toxina producida en la célula cuando la célula se aplica al entorno de la plaga o plagas objetivo. El producto resultante conserva la toxicidad de la toxina. Estos plaguicidas naturalmente encapsulados, pueden entonces ser formulados de acuerdo con técnicas convencionales para la aplicación en el entorno de alojamiento de una plaga objetivo, p. ej., suelo, agua, y follaje de las plantas. Véase, por ejemplo, el documento EPA 0192319, y las referencias citadas en el mismo. Como alternativa, se pueden formular las células que expresan un gen de la presente invención de tal manera que permita la aplicación del material resultante como un plaguicida.

Composiciones plaguicidas

Los principios activos de la presente invención se aplican normalmente en forma de composiciones y pueden aplicarse al área de cultivo o a la planta a tratar, simultáneamente o en sucesión, con otros compuestos. Estos compuestos pueden ser fertilizantes, herbicidas, crioprotectores, tensioactivos, detergentes, jabones plaguicidas, aceites inactivos, polímeros, y/o formulaciones de liberación prolongada o de portadores biodegradables que permiten la dosificación a largo plazo de un área objetivo después de una sola aplicación de la formulación. También pueden ser herbicidas selectivos, insecticidas químicos, virucidas, microbicidas, amebicidas, pesticidas, fungicidas, bactericidas, nematocidas, molusquicidas o mezclas de varias de estas preparaciones, si se desea, junto con otros portadores, tensioactivos o adyuvantes promotores de la aplicación adecuados agrícolamente aceptables, habitualmente empleados en la técnica de la formulación. Los portadores y adyuvantes adecuados pueden ser sólidos o líquidos y corresponden a las sustancias empleadas habitualmente en la tecnología de la formulación, p. ej., sustancias minerales naturales o regeneradas, disolventes, dispersantes, agentes humectantes, agentes de pegajosidad, aglutinantes o fertilizantes. Análogamente, las formulaciones se pueden preparar en «cebos» comestibles o moldearse en «trampas» de plagas para permitir la alimentación o la ingestión por una plaga objetivo de la formulación.

Los métodos de aplicación de un principio 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 incluyen la aplicación en la hoja, recubrimiento de semillas y aplicación en el suelo. El número de aplicaciones y la velocidad de aplicación dependen de la intensidad de infestación por la plaga correspondiente.

La composición puede formularse en forma de un polvo, un polvo fino, un microgránulo, un gránulo, una pulverización, una emulsión, un coloide, una solución o similares, y pueden prepararse por medios convencionales tales como desecación, liofilización, homogeneización, extracción, filtración, centrifugación, sedimentación, o concentración de un cultivo de células que comprende el polipéptido. En todas las composiciones de este tipo que

5 contienen al menos uno de dichos polipéptidos plaguicidas, el polipéptido puede estar presente en una concentración de aproximadamente 1 % a aproximadamente 99 % en peso.

Las plagas de lepidópteros, dípteros, heterópteros, nematodos o coleópteros pueden eliminarse o reducirse en números en un área determinada mediante los métodos de la invención, o pueden aplicarse profilácticamente a un

10 área ambiental para evitar la infestación por una plaga susceptible. Preferentemente, la plaga ingiere, o se pone en contacto con, una cantidad eficaz como plaguicida del polipéptido. Por «cantidad eficaz como plaguicida» se entiende una cantidad del plaguicida que puede provocar la muerte de al menos una plaga, o de reducir notablemente el crecimiento de plagas, la alimentación o el desarrollo fisiológico normal. Esta cantidad variará dependiendo de factores tales como, por ejemplo, las plagas objetivo específicas a controlar, el entorno específico,

15 el emplazamiento, la planta, el cultivo o el sitio agrícola a tratar, las condiciones ambientales, y el método, la velocidad, la concentración, la estabilidad y la cantidad de aplicación de la composición polipeptídica eficaz como plaguicida. Las formulaciones también pueden variar con respecto a las condiciones climáticas, las consideraciones medioambientales y/o la frecuencia de aplicación y/o la gravedad de la infestación de plagas.

Las composiciones de plaguicida descritas se pueden preparar formulando la suspensión de células bacterianas, cristal y/o espora, o el componente de proteína aislado con el portador agrícola aceptable deseado. Las composiciones se pueden formular antes de la administración en un medio apropiado tal como liofilizado, deshidratado por congelación, desecado, o en un portador acuoso, medio o diluyente adecuado, tal como solución salina u otro tampón. Las composiciones formuladas pueden estar en forma de un polvo o material granular, o una

20 suspensión en aceite (vegetal o mineral), o emulsiones de agua o aceite/agua, o como un polvo humectable, o en combinación con cualquier otro material portador adecuado para la aplicación agrícola. Los portadores agrícolas adecuados pueden ser sólidos o líquidos y son bien conocidos en la técnica. El término «vehículo agrícola aceptable» incluye todos los adyuvantes, componentes inertes, dispersantes, tensioactivos, agentes de pegajosidad, aglutinantes, etc., que se usan habitualmente en la tecnología de formulación de plaguicidas; estos son bien

30 conocidos por los expertos en la formulación de plaguicidas. Las formulaciones pueden mezclarse con uno o más adyuvantes sólidos o líquidos y prepararse por diversos medios, por ejemplo, mezclando, combinando y/o triturando homogéneamente la composición plaguicida con adyuvantes adecuados usando técnicas de formulación convencionales. Las formulaciones y los métodos de aplicación adecuados se describen en la patente de EE.UU. n.º 6.468.523.

Las plantas también se pueden tratar con una o más composiciones químicas, que incluyen uno o más herbicidas, insecticidas o fungicidas. Las composiciones químicas ejemplares incluyen: herbicidas de frutas/verduras: atrazina, bromacil, diuron, glifosato, linuron, metribuzin, simazine, trifluralin, fluazifop, glufosinate, halosulfuron Gowan, paraquat, propyzamid, setoxidim, butafenacil, halosulfurón, indaziflam; insecticidas de frutas/verduras: aldicarb, bacillus thuriengiensis, carbaril, carbofurano, clorpirifos, cipermetrina, deltametrina, diazinón, malatión, abamectina, ciflutrín/beta-ciflutrina, esfenvalerato, lambda-cihalotrina, acequinocilo, bifenazato, metoxifenocida, novalurón, cromfenozida, tiacloprid, dinotefuran, fluacripirim, tolfenpyrad, clotianidina, spiroticlofen, gamma-cihalotrina, spiromesifen, spinosad, rynaxypyr, cyazypyr, spinoteram, triflumuron, spirotetramat, imidacloprid, flubendiamida, thiodicarb, metaflumizona, sulfoxaflor, ciflometofeno, cyanopyrafen, imidacloprid, clotianidina, tiametoxam, spinotoram, thiodicarb, flonicamid, metiocarb, emamectin-benzoato, indoxacarb, fostiazato, fenamifos, cadusafos, piriproxifen, óxido de fenbutatin, hextiazo, metomilo, 4-[[[(6-clorpiridin-3-il) metil]](2,2-difluoretil)amino]furan-2(5H)-ona; fungicidas de frutas/verduras: carbendazima, clorotalonil, EBDC, azufre, metil-tiofanato, azoxistrobina, cymoxanil, fluazinam, fosetilo, iprodiona, kresoxim-metilo, metalaxil/mefenoxam, trifloxistrobina, ethaboxam, iprovalicarb, trifloxistrobina, fenhexamida, oxpoconazol fumarato, ciazofamida, fenamidona, zoxamida, picoxystrobin, pyraclostrobin, cyflufenamid, boscalid; herbicidas de cereales: isoproturon, bromoxinil, ioxinil, fenoxis, clorsulfuron, clodinafop, diclofop, diflufenican, fenoxaprop, florasulam, fluroxypyr, metsulfuron, triasulfuron, flucarbazone, iodosulfuron, propoxycarbazone, picolinafen, mesosulfuron, beflubutamid, pinoxaden, amidosulfuron, thifensulfuron, tribenuron, flupyrsulfuron, sulfosulfuron, pyrasulfotole, pyroxsulam, flufenacet, tralkoxydim, pyroxasulfon; fungicidas de cereales: carbendazima, clorotalonil, azoxistrobina, cyproconazole, cyprodinil, fenpropimorph, epoxiconazole, kresoxim-metilo, kresoxim-methyl, tebuconazol, trifloxistrobina, simeconazole, picoxystrobin, pyraclostrobin, dimoxystrobin, prothioconazol, fluoxastrobin; insecticidas de cereales: dimetoato, lambda-cihalotrina, deltametrina, alfa-cipermetrina, beta-ciflutrina, bifentrina, imidacloprid, clotianidina, tiametoxam, tiacloprid, acetamiprid, dinotefuran, clorpirifos, metamidofos, óxidemeton-metil, pirimicarb, methiocarb; herbicidas de maíz: atrazina, alachlor, bromoxinil, acetochlor, dicamba, clopyralid, (S-)dimethenamid, glufosinate, glifosato, isoxaflutole, (S-) metolachlor, mesotrione, nicosulfuron, primisulfuron, rimsulfuron, sulcotrione, foramsulfuron, topramezone, tembotrione, saflufenacil, thiencazone, flufenacet, pyroxasulfon; insecticidas de maíz: carbofurano, clorpirifos, bifentrina, fipronil, imidacloprid, lambda-cihalotrina, tefluthrin, terbufos, tiametoxam, clotianidina, spiromesifen, flubendiamida, triflumuron, rynaxypyr, deltametrina, thiodicarb, beta-ciflutrina, cipermetrina, bifentrina, lufenuron, triflumuron, tefluthrin, ethiprole, cyazypyr, tiacloprid, acetamiprid, dinotefuran, avermectin, metiocarb, spiroticlofen, spirotetramat;

65 fungicidas de maíz: fenitropan, tiram, prothioconazol, tebuconazol, trifloxistrobina; herbicidas de arroz: butachlor, propanil, azimsulfuron, bensulfuron, cyhalofop, daimuron, fentrazamide, imazosulfuron, mefenacet, oxaziclomefone,

pyrazosulfuron, pyributicarb, quinclorac, thiobencarb, indanofan, flufenacet, fentrazamide, halosulfurón, oxaziclomefone, benzobicyclon, piriftalid, penoxsulam, bispyribac, oxadiargyl, etoxisulfuron, pretilachlor, mesotrione, tefuryltrione, oxadiazone, fenoxaprop, pyrimisulfan; insecticidas de arroz: diazinón, fenitrotión, fenobucarb, monocrotofós, benfuracarb, buprofezin, dinotefuran, fipronil, imidacloprid, isoprocarb, tiacloprid, cromfenozida, tiacloprid, dinotefuran, clotianidina, ethiprole, flubendiamida, rynaxypyr, deltametrina, acetamiprid, tiametoxam, cyazypyr, spinosad, spinotoram, emamectin-benzoato, cipermetrina, clorpirifós, cartap, metamidofos, etofenprox, triazofos, 4-[[[(6-clorpiridin-3-il)metil](2,2-difluoretil)amino]furan-2(5H)-ona, carbofurano, benfuracarb; fungicidas de arroz: metil-tiofanato, azoxistrobina, carpropamida, edifenfos, ferimona, iprobenfos, isoprotiolano, pencycuron, probenazol, pyroquilon, triciclazol, trifloxistrobina, diclocymet, fenoxanil, simeconazole, tiadinilo; herbicidas de algodón: diuron, fluometuron, MSMA, oxifluorfen, prometryn, trifluralin, carfentrazone, cletodim, fluazifop-butil, glifosato, norflurazon, pendimetalin, pyriothiac-sodio, trifloxysulfuron, tepraloxymid, glufosinate, flumioxazin, thidiazurón; insecticidas de algodón: acefato, aldicarb, clorpirifos, cipermetrina, deltametrina, malatión, monocrotofós, abamectina, acetamiprid, benzoato de emamectina, imidacloprid, indoxacarb, lambda-cihalotrina, spinosad, thiodicarb, gamma-cihalotrina, spiromesifen, piridalilo, flonicamid, flubendiamida, triflumuron, rynaxypyr, beta ciflutrina, spirotetramat, clotianidina, tiametoxam, tiacloprid, dinotefurano, flubendiamida, cyazypyr, spinosad, spinotoram, gamma cihalotrina, 4-[[[(6-clorpiridin-3-il)metil](2,2-difluoretil)amino]furan-2(5H)-ona, thiodicarb, avermectin, flonicamid, piridalilo, spiromesifen, sulfoxaflor, profenofos, tiriazofos, endosulfan; fungicidas de algodón: etridiazol, metalaxil, quintoceno; herbicidas de soja:alachlor, bentazone, trifluralin, chlorimuron-etil, cloransulam-metil, fenoxaprop, fomesafen, fluazifop, glifosato, imazamox, imazaquin, imazetapir, (S-) metolachlor, metribuzin, pendimetalin, tepraloxymid, glufosinate; insecticidas de soja: lambda-cihalotrina, metomilo, parathion, thiocarb, imidacloprid, clotianidina, tiametoxam, tiacloprid, acetamiprid, dinotefurano, flubendiamida, rynaxypyr, cyazypyr, spinosad, spinotoram, emamectin-benzoato, fipronil, ethiprole, deltametrina, beta-ciflutrina, gamma y lambda cihalotrina, 4-[[[(6-clorpiridin-3-il)metil](2,2-difluoretil)amino]furan-2(5H)-ona, spirotetramat, spinodiclofen, triflumuron, flonicamid, thiodicarb, beta-cyfluthrin; fungicidas de soja: azoxistrobina, cyproconazole, epoxiconazole, flutriafol, pyraclostrobin, tebuconazol, trifloxistrobina, prothioconazol, tetraconazole; herbicidas de remolacha: chloridazon, desmedipham, ethofumesate, phenmedipham, triallate, clopyralid, fluazifop, lenacil, metamitron, quinmerac, cycloxydim, triflusulfuron, tepraloxymid, quizalofop; insecticidas de remolacha azucarera: imidacloprid, clotianidina, tiametoxam, tiacloprid, acetamiprid, dinotefurano, deltametrina, beta-ciflutrina, gamma/lambda cihalotrina, 4-[[[(6-clorpiridin-3-il)metil](2,2-difluoretil)amino]furan-2(5H)-ona, tefluthrin, rynaxypyr, cyaxypyr, fipronil, carbofuran; herbicidas de la canola: clopyralid, diclofop, fluazifop, glufosinate, glifosato, metazachlor, trifluralin, ethametsulfuron, quinmerac, quizalofop, cletodim, tepraloxymid; fungicidas de la canola: azoxistrobina, carbendazima, fludioxonil, iprodiona, prochloraz, vinclozolin; insecticidas de la canola: carbofurano, organofosfatos, piretroides, tiacloprid, deltametrina, imidacloprid, clotianidina, tiametoxam, acetamiprid, dinotefurano, beta-ciflutrina, gamma y lambda cihalotrina, tau-fluvaleriate, ethiprole, spinosad, spinotoram, flubendiamida, rynaxypyr, cyazypyr, 4-[[[(6-clorpiridin-3-il)metil](2,2-difluoretil)amino]furan-2(5H)-ona.

«Plaga» incluye, pero sin limitación, insectos, hongos, bacterias, nematodos, ácaros, garrapatas y similares. Las plagas de insectos incluyen insectos seleccionados de entre 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* incluye los subórdenes *Adephaga* y *Polyphaga*. El suborden *Adephaga* incluye las superfamilias *Caraboidea* y *Gyrinoidea*, mientras que el suborden *Polyphaga* incluye las superfamilias *Hydrophiloidea*, *Staphylinoidea*, *Cantharoidea*, *Cleroidea*, *Elateroidea*, *Dascilloidea*, *Dryopoidea*, *Byrrhoidea*, *Cucujoidea*, *Meloidea*, *Mordelloidea*, *Tenebrionoidea*, *Bostrichoidea*, *Scarabaeoidea*, *Cerambycoidea*, *Chrysomeloidea*, y *Curculionoidea*. La superfamilia *Caraboidea* incluye las familias *Cicindelidae*, *Carabidae*, y *Dytiscidae*. La superfamilia *Gyrinoidea* incluye la familia *Gyrinidae*. La superfamilia *Hydrophiloidea* incluye la familia *Hydrophilidae*. La superfamilia *Staphylinoidea* incluye las familias *Silphidae* y *Staphylinidae*. La superfamilia *Cantharoidea* incluye a las familias *Cantharidae* y *Lampyridae*. La superfamilia *Cleroidea* incluye a las familias *Cleridae* y *Dermestidae*. La superfamilia *Elateroidea* incluye las familias *Elateridae* y *Buprestidae*. La superfamilia *Cucujoidea* incluye la familia *Coccinellidae*. La superfamilia *Meloidea* incluye la familia *Meloidae*. La superfamilia *Tenebrionoidea* incluye la familia *Tenebrionidae*. La superfamilia *Scarabaeoidea* incluye las familias *Passalidae* y *Scarabaeidae*. La superfamilia *Cerambycoidea* incluye la familia *Cerambycidae*. La superfamilia *Chrysomeloidea* incluye la familia *Chrysomelidae*. La superfamilia *Curculionoidea* incluye las familias *Curculionidae* y *Scolytidae*.

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

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

Las plagas de insectos de la invención para los principales cultivos incluyen: Maíz: *Ostrinia nubilalis*, barrenador europeo del maíz; *Agrotis ipsilon*, oruga cortadora negra; *Helicoverpa zea*, gusano del elote del maíz; *Spodoptera frugiperda*, cogollero del maíz; *Diatraea grandiosella*, barrenador del maíz del sudoeste; *Elasmopalpus lignosellus*, barrenador del tallo menor; *Diatraea saccharalis*, barrenador de la caña de azúcar; *Diabrotica virgifera*, gusano de la raíz del maíz occidental; *Diabrotica longicornis barberi*, gusano de la raíz del maíz del norte; *Diabrotica undecimpunctata howardi*, gusano de la raíz del maíz del sur; *Melanotus* spp., gusanos de alambre; *Cyclocephala borealis*, escarabajo enmascarado del norte (candelilla blanca); *Cyclocephala immaculata*, escarabajo enmascarado del sur (candelilla blanca); *Popillia japonica*, escarabajo japonés; *Chaetocnema pulicaria*, escarabajo de la pulga del maíz; *Sphenophorus maidis*, gorgojo del maíz; *Rhopalosiphum maidis*, pulgón de la hoja del maíz; *Anuraphis maidiradicis*, pulgón de la raíz del maíz; *Blissus leucopterus leucopterus*, chinche; *Melanoplus femurrubrum*, saltamontes de patas rojas; *Melanoplus sanguinipes*, saltamontes migratorio; *Hylemya platura*, gusano de semilla de maíz; *Agromyza parvicornis*, minador de la mancha de maíz; *Anaphothrips obscurus*, trips de la hierba; *Solenopsis milesta*, hormiga ladrona; *Tetranychus urticae*, ácaro araña de dos manchas; sorgo: *Chilo partellus*, barrenador del sorgo; *Spodoptera frugiperda*, cogollero del maíz; *Helicoverpa zea*, gusano del elote del maíz; *Elasmopalpus lignosellus*, barrenador del tallo menor; *Feltia subterranea*, gusano cortador granulado; *Phyllophaga crinita*, candelilla blanca; *Eleodes*, *Conoderus*, and *Aeolus* spp., gusanos de alambre; *Oulema melanopus*, escarabajo de la hoja de los cereales; *Chaetocnema pulicaria*, escarabajo de la pulga del maíz; *Sphenophorus maidis*, gorgojo del maíz; *Rhopalosiphum maidis*, pulgón de la hoja del maíz; *Sipha flava*, pulgón amarillo de la caña de azúcar; *Blissus leucopterus leucopterus*, chinche; *Contarinia sorghicola*, mosquito de sorgo; *Tetranychus cinnabarinus*, ácaro araña roja del carmín; *Tetranychus urticae*, ácaro araña de dos manchas; trigo: *Pseudaletia unipunctata*, gusano cogollero; *Spodoptera frugiperda*, cogollero del maíz; *Elasmopalpus lignosellus*, barrenador del tallo menor; *Agrotis ortogonia*, gusano cortador occidental; *Elasmopalpus lignosellus*, barrenador del tallo menor; *Oulema melanopus*, escarabajo de la hoja de los cereales; *Hyperapunctata*, gorgojo de la hoja del trébol; *Diabrotica undecimpunctata howardi*, gusano de la raíz del maíz del sur; pulgón ruso del trigo; *Schizaphis graminum*, chinche verde; *Macrosiphum avenae*, pulgón del grano inglés; *Melanoplus femurrubrum*, saltamontes de patas rojas; *Melanoplus differentialis*, saltamontes diferencial; *Melanoplus sanguinipes*, saltamontes migratorio; *Mayetiola destructor*, mosca de Hessian; *Sitodiplosis mosellana*, mosquito del trigo; *Meromyza americana*, gusano del tallo del trigo; *Hylemya coarctata*, mosca del bulbo del trigo; *Frankliniella fusca*, trips del tabaco; *Cephus cinctus*, mosca de sierra del tallo del trigo; *Aceria tulipae*, ácaro del enrollamiento del trigo; girasol: *Suleima helianthana*, polilla del brote del girasol; *Homoeosoma electellum*, polilla de girasol; *zygogramma exclamationis*, escarabajo del girasol; *Bothyrus gibbosus*, escarabajo de la zanahoria; *Neolasioptera murtfeldtiana*, mosquito de la semilla de girasol; algodón: *Heliothis virescens*, gusano del brote del algodón; *Helicoverpa zea*, oruga del algodón; *Spodoptera exigua*, gusano cogollero de la remolacha; *Pectinophora gossypiella*, oruga rosada; *Anthonomus grandis*, gorgojo de algodón; *Aphis gossypii*, pulgón del algodón; *Pseudatomoscelis seriatus*, pulga saltona del algodón; *Trialeurodes abutilonea*, mosca blanca de alas bandeadas; *Lygus lineolaris*, chinche de la planta manchada; *Melanoplus femurrubrum*, saltamontes de patas rojas; *Melanoplus differentialis*, saltamontes diferencial; *Thrips tabaci*, trips de la cebolla; *Frankliniella fusca*, trips del tabaco; *Tetranychus cinnabarinus*, ácaro araña roja del carmín; *Tetranychus urticae*, ácaro araña de dos manchas; arroz: *Diatraea saccharalis*, barrenador de la caña de azúcar; *Spodoptera frugiperda*, cogollero del maíz; *Helicoverpa zea*, gusano del elote del maíz; *Colaspis brunnea*, colaspis de la uva; *Lissorhoptrus oryzophilus*, gorgojo del agua de arroz; *Sitophilus oryzae*, gorgojo del arroz; *Nephotettix nigropictus*, chicharrita del arroz; *Blissus leucopterus leucopterus*, chinche; *Acrosternum hilare*, chinche hedionda verde; soja: *Pseudoplusia includens*, gusano medidor de la soja; *Anticarsia gemmatalis*, oruga de la judía aterciopelada; *Plathypena scabra*, gusano verde del trébol; *Ostrinia nubilalis*, barrenador europeo del maíz; *Agrotis ipsilon*, oruga cortadora negra; *Spodoptera exigua*, gusano cogollero de la remolacha; *Heliothis virescens*, gusano del brote del algodón; *Helicoverpa zea*, oruga del algodón; *Epilachna varivestis*, escarabajo de la judía mexicana; *Myzus persicae*, pulgón verde del melocotonero; *Empoasca fabae*, chicharrita de la patata; *Acrosternum hilare*, chinche hedionda verde; *Melanoplus femurrubrum*, saltamontes de patas rojas; *Melanoplus differentialis*, saltamontes diferencial; *Hylemya platura*, gusano de semilla de maíz; *Sericothrips variabilis*, trips de la soja; *Thrips tabaci*, trips de la cebolla; *Tetranychus turkestanii*, ácaro araña de la fresa; *Tetranychus urticae*, ácaro araña de dos manchas; cebada: *Ostrinia nubilalis*, barrenador europeo del maíz; *Agrotis ipsilon*, oruga cortadora negra; *Schizaphis graminum*, chinche verde; *Blissus leucopterus leucopterus*, chinche; *Acrosternum hilare*, chinche hedionda verde; *Euschistus servus*, chinche hedionda marrón; *Delia platura*, gusano de semilla de maíz; *Mayetiola destructor*, mosca de Hessian; *Petrobia latens*, ácaro marrón del trigo; colza: *Brevicoryne brassicae*, pulgón de la col; *Phyllotreta cruciferae*, escarabajo pulga; *Mamestra configurata*, gusano cogollero de Bertha; *Plutella xylostella*, polilla dorso de diamante; *Delia* spp., gusanos de la raíz.

Los nematodos incluyen nematodos parásitos tales como nematodos de nudos de raíz, de quiste y de lesión, que incluyen *Heterodera* spp., *Meloidogyne* spp., y *Globodera* spp.; particularmente miembros de los nematodos de quiste, incluyendo, pero sin limitación, *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 de lesión incluyen *Pratylenchus* spp.

Métodos de aumento del rendimiento de la planta

Se proporcionan métodos de aumento del rendimiento de la planta. Los métodos comprenden proporcionar una planta o una célula de planta que exprese 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 una plaga contra la que dicho polipéptido tiene actividad plaguicida. Por lo tanto, la presente invención proporciona un método de aumento del rendimiento en una planta que comprende cultivar en un campo una planta o una semilla de la misma que tiene incorporado de manera estable en su genoma una construcción de ADN que comprende una

5 secuencia de nucleótidos que codifica una proteína que tiene actividad plaguicida, donde dicha secuencia de nucleótidos codifica un polipéptido que es una variante de SEQ ID NO:2, donde dicho polipéptido tiene actividad plaguicida mejorada relativa a la SEQ ID NO:2, donde dicha secuencia de nucleótidos se selecciona de entre la SEQ ID NO:4, 5 o 6, o una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre

10 SEQ ID NO:7, 8, 9, 10, 11 o 12, donde dicho campo está infestado con una plaga contra la cual dicho polipéptido tiene actividad plaguicida. En algunas realizaciones, el polipéptido tiene actividad plaguicida contra una plaga de lepidópteros, coleópteros, dípteros, hemípteros o nematodos, y dicho campo está infestado con una plaga de lepidópteros, hemípteros, coleópteros, dípteros o nematodos.

Tal como se define en el presente documento, el «rendimiento» de la planta se refiere a la calidad y/o cantidad de biomasa producida por la planta. Por «biomasa» se entiende cualquier producto medido de la planta. Un aumento de la producción de biomasa es cualquier mejora en el rendimiento del producto medido de la planta. El aumento del rendimiento de la planta tiene varias aplicaciones comerciales. Por ejemplo, aumentar la biomasa de hojas de la planta puede aumentar el rendimiento de vegetales de hoja para el consumo humano o animal. Además, el aumento de biomasa de hojas se puede usar para aumentar la producción de productos farmacéuticos o industriales

15 derivados de plantas. Un aumento del rendimiento puede comprender cualquier aumento estadísticamente significativo que incluye, pero sin limitación, al menos un aumento del 1 %, al menos un aumento del 3 %, al menos un aumento del 5 %, al menos un aumento del 10 %, al menos un aumento del 20 %, al menos un 30 %, al menos un 50 %, al menos un 70 %, al menos un 100% o un aumento mayor del rendimiento en comparación con una planta que no expresa la secuencia plaguicida.

20

En métodos específicos, el rendimiento de la planta aumenta como resultado de la resistencia a las plagas mejorada 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 de la planta, mejorando así el rendimiento de la planta.

25

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

30

Parte experimental

35 **Ejemplo 1.** Mutagénesis de la parte N-terminal de Axmi205

Axmi205 es una toxina activa en larvas de gusano de la raíz del maíz del oeste (WCRW) (véase la publicación de patente de EE.UU. n.º 20110023184, que se incorpora en el presente documento como referencia en su totalidad). La secuencia de nucleótidos para Axmi205 se expone en la SEQ ID NO:1. La secuencia de aminoácidos para

40 Axmi205 se expone en la SEQ ID NO:2.

El modelado tridimensional y las alineaciones de secuencia indican que la mitad N-terminal de Axmi205 es homóloga a los dominios formadores de poros de las perforinas. La mitad C-terminal de Axmi205 no muestra homologías, y su función es desconocida. Otras endotoxinas de proteína que son activas en insectos contienen un dominio formador de poros y un dominio de unión a receptores. Es concebible que la mitad C-terminal de Axmi205 esté implicada en

45 dirigir Axmi205 a emplazamientos en WCRW donde se produce la formación de poros. Se generó una biblioteca de mutantes puntuales que se dirige a 30 posiciones en la porción C-terminal de Axmi205 usando el kit de mutagénesis de aclaramiento QUIKCHANGE® (Stratagene). El plásmido pAX7011 que codifica Axmi205 nativa en pRSF1b fue mutagenizado. La biblioteca tenía una complejidad total de 506.

50

Los mutantes combinados, así como par7011, se transformaron en células BL21*DE3 y se sembraron en placas LB + Kanamicina (100 µg/ml). Se recogieron colonias frescas en 8 ml de medio líquido LB + kanamicina (100 µg/ml) y se cultivaron en 24 bloques de pocillos profundos a 37 grados C y 300 rpm hasta que se alcanzó una DO600 nm de 0,3. Se añadió IPTG a una concentración final de 0,5 mM y los cultivos se incubaron durante 18 horas adicionales a

55 20 grados C. Se determinó la DO600 nm y las células se recogieron por centrifugación (10 minutos a 4000 rpm, 4 grados C). Los sedimentos celulares se resuspendieron en Tris/HCl 20 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, DTT 1 mM a una densidad de DO600/ml de 20. Las células fueron alteradas mediante el batido de perlas y se obtuvieron extractos solubles después de la centrifugar a 4500 rpm durante 15 minutos a 4 grados C.

Los extractos se determinaron para determinar la actividad contra WCRW en cuatro réplicas por variante. Después de 5 y 6 días, las puntuaciones de toxicidad del gusano de la raíz se determinaron promediando las puntuaciones de cuatro réplicas. Se identificaron mil ciento treinta y nueve variantes en esta pantalla principal, proporcionando una cobertura de 2,2x de la biblioteca. Se secuenciaron y se volvieron a determinar las variantes con una puntuación mayor que la del tipo silvestre Axmi205. Luego se realizaron ensayos de escala para clasificar los mutantes relativos al tipo salvaje Axmi205 y Axmi205 (evo25) (publicación de la patente de EE.UU. n.º 20110023184 y expuestos en el presente documento como SEQ ID NO:3). Los datos del ensayo de escala se muestran en las Tablas 1 y 2 para las

60

65

principales variantes que puntuaron por encima de Axmi205 de tipo salvaje en el ensayo primario, la re-evaluación y ambas ampliaciones.

Tabla 1.

	Promedio de mortalidad en % de WCRW	Desviación típica
Axmi205	16,35	12,60
Axmi205(evo25)	20,20	12,17
Axmi205(evo30)	23,05	4,61
Axmi205 PMLib1 con 1G2_p2a11	19,56	9,47
Axmi205 PMLib1 con 1G2_p1c1	18,36	7,09
Axmi205 PMLib1 con 1G2_p1a4	17,97	11,42

5 La variante Axmi205 (evo30) mostró una actividad mejorada en comparación con Axmi205 (evo25). Porta la mutación V467L. La secuencia de nucleótidos que codifica Axmi205 (evo30) se expone en SEQ ID NO:4. La secuencia de aminoácidos se expone en SEQ ID NO:7. Las siguientes variantes más activas son Axmi205 PMLib1 con1G2_p2a11 (mutación S468L; SEQ ID NO:10), Axmi205 PMLib1 con1G2_p1c1 (mutación V467T; SEQ ID NO: 11) y Axmi205 PMLib1 con1 G2_p1a4 (mutación R464N; SEQ ID NO:12). De las 30 posiciones mutagenizadas, las variantes mejoradas portan mutaciones que se agrupan con Axmi205 (evo25) (mutación V467A). Estos resultados sugieren que las posiciones 467 y 468 están relacionadas con una actividad mejorada en Axmi205.

15 **Ejemplo 2.** Mutagénesis aleatoria de Axmi205

Gen completo:

Se llevó a cabo la mutagénesis por RCP aleatoria de toda la proteína Axmi205. Se determinaron mil ciento sesenta y seis variantes en el nivel de cuatro réplicas, se volvieron a determinar y se ampliaron para identificar la variante Axmi205 (evo35) que tenía propiedades mejoradas (Tabla 2). La secuencia de nucleótidos que codifica Axmi205 (evo35) se expone en SEQ ID NO:6. La secuencia de aminoácidos se expone en SEQ ID NO:9.

25 **Ejemplo 3.** Mutagéneses de la parte C-terminal de Axmi205

En el dominio formador de poros N-terminal de las toxinas de tipo perforina, se sabe que varias hélices alfa interactúan con la membrana de los organismos objetivo. Estas hélices se reorganizan para formar el canal transmembrana de toxinas de tipo perforina. Estas hélices fueron objetivo de mutagénesis. Se mutagenizaron treinta y nueve posiciones para una diversidad total de 648. Se identificaron mil cincuenta y cinco variantes, se determinaron nuevamente 116 coincidencias y se ampliaron 34 coincidencias. De estas variantes, Axmi205 (evo34) fue la variante más activa (Tabla 2) y mostró una expresión mejorada relativa a la expresión de Axmi205wt. La secuencia de nucleótidos que codifica Axmi205 (evo34) se expone en SEQ ID NO:5. La secuencia de aminoácidos se expone en SEQ ID NO:8.

Tabla 2.

	Nucleótidos de SEQ ID NO:	Amino ácidos de SEQ ID NO:	Promedio de puntuación del crecimiento reducido de WCRW	Promedio de mortalidad media de WCRW (%)
Axmi205wt	1	2	0,33	11,28
Axmi205(evo30)	4	7	0,56	18,17
Axmi205(evo34)	5	8	0,94	19,46
Axmi205(evo35)	6	9	0,75	20,19
pRSF1b (control negativo)	--	--	0,13	0,00

35 **Ejemplo 4.** Ensayos adicionales de determinación de la actividad plaguicida

Las secuencias de nucleótidos de la invención se pueden analizar para determinar su capacidad para producir proteínas plaguicidas. La capacidad de una proteína plaguicida para actuar como un plaguicida sobre una plaga a menudo se evalúa de varias maneras. Una forma 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 a analizar o muestras de control. A menudo, esto se realiza colocando el material a analizar, o una dilución adecuada de dicho material, en un material que la plaga va a ingerir, tal como una dieta artificial. El material a analizar puede estar compuesto por un líquido, sólido o suspensión. El material a analizar puede colocarse sobre la superficie y luego dejarse secar. Como alternativa, el material a analizar se puede mezclar con una dieta artificial fundida y luego dispensarse en la cámara de ensayo. La cámara de ensayo puede ser, por ejemplo, una taza, un plato o un pocillo de una placa de microtitulación.

Los ensayos para las plagas chupadoras (por ejemplo, pulgones) pueden implicar la separación del material de análisis del insecto por una partición, idealmente una porción que puede ser perforada por las partes de la boca de succión del insecto chupador, para permitir la ingestión del material de análisis. Con frecuencia, el material de análisis se mezcla con un estimulante de alimentación, tal como sacarosa, para promover la ingestión del compuesto de análisis.

Otros tipos de ensayos pueden incluir la microinyección del material de análisis en la boca o el intestino de la plaga, así como el desarrollo de plantas transgénicas, seguido del análisis de la capacidad de la plaga para alimentarse de la planta transgénica. Los análisis en plantas pueden incluir el aislamiento de las partes de la planta normalmente consumidas, por ejemplo, pequeñas jaulas adheridas a una hoja, o el aislamiento de plantas enteras en jaulas que contienen insectos.

Otros métodos y enfoques de determinación de plagas son conocidos en la técnica, y se pueden encontrar, por ejemplo, en Robertson y Preisler, eds. (1992) *Bioensayos de plaguicidas con artrópodos*, CRC, Boca Raton, FL. Como alternativa, los ensayos se describen comúnmente en las revistas *Arthropod Management Tests* and *Journal of Economic Entomology* o por análisis con miembros de la Entomological Society of America (ESA).

Ejemplo 5. Vectorización de genes para la expresión de plantas

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

En un aspecto de la invención, se diseñan y generan secuencias de ADN sintéticas. Estas secuencias sintéticas tienen una secuencia de nucleótidos alterada relativa a la secuencia parental, pero codifican proteínas que son esencialmente idénticas a la proteína parental (p. ej., SEQ ID NO:7-12).

En otro aspecto de la invención, las versiones modificadas de los genes sintéticos se diseñan de modo que el péptido resultante se dirija a un orgánulo de la planta, tal como el retículo endoplásmico o el apoplasto. En la técnica se conocen secuencias peptídicas que se sabe que dan como resultado el direccionamiento de proteínas de fusión a orgánulos de plantas. Por ejemplo, la región N-terminal del gen de la fosfatasa ácida del *Lupinus albus* de *Lupinus blanco* (GENBANK® ID GI:14276838, Miller y col., (2001) *Plant Physiology* 127: 594-606) es conocida en la técnica por dar como resultado el direccionamiento de proteínas heterólogas. Si la proteína de fusión resultante también contiene una secuencia de retención del retículo endoplásmico que comprende el péptido N-terminal-lisina-ácido aspártico-ácido glutámico-leucina (es decir, el motivo «KDEL», SEQ ID NO:13) en el extremo C, la proteína de fusión se dirigirá al retículo endoplásmico. Si la proteína de fusión carece de una secuencia de dirección al retículo endoplasmático en el extremo C, la proteína se dirigirá al retículo endoplásmico, pero en última instancia se secuestrará en el apoplasto.

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

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

Ejemplo 6. Vectorización de genes para la expresión de plantas

La codificación de ADN de la región de los genes de la invención están operativamente conectados con secuencias promotoras y terminadoras adecuadas para la expresión en plantas. Dichas secuencias son bien conocidas en la técnica y pueden incluir el promotor de actina del arroz o el promotor de ubiquitina del maíz para la expresión en monocotiledóneas, el promotor UBQ3 de *Arabidopsis* o el promotor CaMV 35S para la expresión en dicotiledóneas, y los terminadores nos o PinII. Las técnicas de producción y confirmación de constructores promotor-gen-terminador también son bien conocidas en la técnica.

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

Ejemplo 7. Transformación de células de maíz con los genes de proteínas plaguicidas descritos en el presente documento

5 Las mazorcas de maíz se recogen mejor 8-12 días después de la polinización. Los embriones se aíslan de las mazorcas, y se prefieren los embriones de 0,8-1,5 mm de tamaño para su uso en la transformación. Los embriones se siembran en placas escutelo hacia arriba en un medio de incubación adecuado, tal como los medios DN62ASS (3,98 g/l de sales de N6; 1 ml/l (de 1000x reserva) de vitaminas de N6; 800 mg/l de L-asparagina; 100 mg/l de mio-
10 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 sales distintos de DN62A5S son adecuados y son conocidos en la técnica. Los embriones se incubaron durante una noche a 25 °C en la oscuridad. Sin embargo, no es necesario en sí incubar los embriones durante una noche.

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

20 Las construcciones de ADN diseñadas para los genes de la invención en células de plantas son aceleradas en el tejido de la planta usando un acelerador de haz de aerosol, usando condiciones esencialmente como se describe en la publicación PCT n.º WO/0138514. Después de la irradiación, los embriones se incuban durante aproximadamente 30 minutos en medios osmóticos, y se colocan sobre medios de incubación durante una noche a 25 °C en la oscuridad. Para evitar explantes irradiados indebidamente perjudiciales, se incuban durante al menos 24 horas antes de su transferencia a medios de recuperación. Los embriones se extienden entonces sobre medios de período de recuperación, durante aproximadamente 5 días, 25 °C en la oscuridad, después se transfirieren a un medio de selección. Los explantes se incuban en medios de selección hasta por ocho semanas, dependiendo de la naturaleza y las características de la selección particular utilizada. Después del periodo de selección, el callo resultante se transfiere a medios de maduración del embrión, hasta que se observa la formación de embriones somáticos maduros. Los embriones somáticos maduros resultantes se colocan a continuación en condiciones de baja luz, y el proceso de regeneración se inicia por métodos conocidos en la técnica. Los brotes resultantes se dejan arraigar en medios de enraizamiento, y las plantas resultantes se transfieren a macetas vivero y se propagan como plantas transgénicas.

Materiales

Medios DN62A5S

Componentes	Por litro	Fuente
Mezcla de sales basales de N6 de Chu (prod. n.º C 416)	3,98 g/l	Laboratorios fitotecnológicos
Solución de vitaminas de N6 de Chu (prod. n.º C 149)	1 ml/l (de 1000x reserva)	Laboratorios fitotecnológicos
L-asparagina	800 mg/l	Laboratorios fitotecnológicos
Mio-inositol	100 mg/l	Sigma
L-prolina	1,4 g/l	Laboratorios fitotecnológicos
Ácidos casamino	100 mg/l	Fisher Scientific
Sacarosa	50 g/l	Laboratorios fitotecnológicos
2,4-D (prod. n.º D-7299)	1 ml/l (de 1 mg/ml de reserva)	Sigma

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

40 **Ejemplo 8.** Transformación de los genes de la invención en células de plantas mediante la transformación mediada por *Agrobacterium*

45 Las mazorcas se recogen mejor 8-12 días después de la polinización. Los embriones se aíslan de las mazorcas, y se prefieren los embriones de 0,8-1,5 mm de tamaño para su uso en la transformación. Los embriones se siembran en placas escutelo hacia arriba en un medio de incubación adecuado, y se incuban durante una noche a 25 °C en la oscuridad. Sin embargo, no es necesario en sí incubar los embriones durante una noche. Los embriones se ponen en contacto con una cepa de *Agrobacterium* que contiene los vectores adecuados para la transferencia mediada por el plásmido Ti durante aproximadamente 5-10 minutos, y luego se siembran en placas sobre medios de co-cultivo durante aproximadamente 3 días (25 °C en la oscuridad). Después del co-cultivo, los explantes se transfieren a medios de período de recuperación durante aproximadamente cinco días (a 25 °C en la oscuridad). Los explantes se incuban en medios de selección hasta por ocho semanas, dependiendo de la naturaleza y las características de la selección particular utilizada. Después del periodo de selección, el callo resultante se transfiere a medios de maduración del embrión, hasta que se observa la formación de embriones somáticos maduros. Los embriones somáticos maduros resultantes se colocan a continuación en condiciones de baja luz, y el proceso de regeneración

se inicia como se conoce en la técnica.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 5 <110> Heinrichs, Volker
Williams, Jayme
<120> VARIANTES DE PROTEÍNAS AXMI205 Y MÉTODOS DE SU USO
- 10 <130> APA116029
<150> 61/512.539
<151> 28/07/2011
- 15 <160> 13
<170> PatentIn versión 3.5
- 20 <210> 1
<211> 1608
<212> ADN
<213> Chromobacterium sp.
- 25 <400> 1

ES 2 647 596 T3

atggcatccg cagcaaatgc aggtcagctt ggcaacctcc ccggcggttac ttccatgggc 60
 atgggctatg acgtgaatgg tttgtacgcc agccccgaaa gcctgcttgg ccaacccttg 120
 ttcgatttcg gcggcgagct ggacagcatc gaaatcgagg gccgcagcta cacctttccc 180
 cgcagcatgc atgtacacac ctatttccat tccgacttca aacaggatgt cagcaaggaa 240
 atcgaagagt atcgggagaa aatgagccag cacgtgggcg tgtccggccg ctacaagttg 300
 ttcagcgctt cgctgagcgt ggatttcacc accacggacc agcaactgac cgagattacc 360
 tacagctcca cccgcgaagc ccatgtgctg tggtagatca gcctgcctgg cgcggccacg 420
 ctgcttccga tgctgcgccg cgatttccgc gacgacctga acaaccccaa tatgcccggc 480
 atggagctgt tcaagcgcta tggtcacctac tacatatcgg aagcggcggg gggcggccgg 540
 ctggactaca gcgcggccag caagacctg aagatggaca gcagccagtc gctgtccacc 600
 accgccgaaa tgtcctacaa ggcgctggtg ggcgagatca agatcgagca tggctcggag 660
 atggaaaagc aggtcaacag ctccgcagc aactccacca tccgtctcac cgcaccggc 720
 ggcaagccgg gcatgaccga tcgcatactg cacggtcggg attcgcagca ggcgttctcg 780
 caatgggagg aatcgctgct cgactatgag acgctgatgg acttttccac cgaaagcctg 840
 caaccgatct gggcgctggc cgacaagccc gagcgccggc tcgagcttga ggacgccttc 900
 cccgaattca tgaagcagtc gcagcagtc atccccagg tggacaaggt gctgctgatg 960
 gacgcgcggc cgcctatggt gaaggctggg gaggatagcg gctccggcgc gtcggaggat 1020
 ctggctgtgt tcaatcccag cacctccaat ggctacaaga tggttggcca gttcggtcag 1080
 cgcaaccatg ccagcgtggc ggatggccat gcgccgattt tcaaggatct gttcगतctg 1140
 ggcgtgctga aggcgcgggt gggttggcag cgggtgtggg acgacgccgg ctccggcaag 1200
 tccaaggact acgctgctg gcgcgcgatt ccgccgcagg gctaccgcgc gctgggcat 1260

 gtgatgatgc tggccaccag cggctataac ccgccgaatc tgccggacta tgtttgcgtg 1320
 catcaaagcc tgtgcgggga tgtgcagacg ctgcaaaacc ggggtgtggtg ggacaagggc 1380
 accggcgcgc gcaaggatgt cagcctgtgg caaccggggc cggccggcgc ggtggcgtcc 1440
 tcttgcttgc ccggcgtgcc taattacaac aaccgcgcca attccggcga catcgagcgc 1500
 ttgcgcggca gcatcgcatg cgtgaagacc agcgcgatcg cgtccatgca ggaaatgaag 1560
 tccatgctca gccagcacca aggcattgaa gcgatgatgt ccaagctg 1608

5 <210> 2
 <211> 536
 <212> PRT
 <213> Chromobacterium sp.

10 <400> 2

ES 2 647 596 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 647 596 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ala Leu Gly Asp Val Met Met Leu Ala Thr Ser Gly Tyr Asn Pro Pro

ES 2 647 596 T3

			420					425				430			
Asn	Leu	Pro	Asp	Tyr	Val	Cys	Val	His	Gln	Ser	Leu	Cys	Ala	Asp	Val
		435					440					445			
Gln	Thr	Leu	Gln	Asn	Arg	Val	Trp	Trp	Asp	Lys	Gly	Thr	Gly	Ala	Arg
	450					455					460				
Lys	Asp	Val	Ser	Leu	Trp	Gln	Pro	Gly	Ala	Ala	Gly	Ala	Val	Ala	Ser
465					470					475					480
Ser	Cys	Phe	Ala	Gly	Val	Pro	Asn	Tyr	Asn	Asn	Pro	Pro	Asn	Ser	Gly
				485					490					495	
Asp	Ile	Glu	Arg	Leu	Arg	Gly	Ser	Ile	Ala	Cys	Val	Lys	Thr	Ser	Ala
			500					505					510		
Ile	Ala	Ser	Met	Gln	Glu	Met	Lys	Ser	Met	Leu	Ser	Gln	His	Gln	Gly
		515					520					525			
Met	Glu	Ala	Met	Met	Ser	Lys	Leu								
	530					535									

<210> 3
 <211> 536
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Axmi205(evo25) mutante

10

<400> 3

ES 2 647 596 T3

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

ES 2 647 596 T3

atggcatccg cagcaaatgc aggtcagctt ggcaacctcc cggcggttac ttccatgggc 60
atgggctatg acgtgaatgg tttgtacgcc agccccgaaa gcctgcttgg ccaacccttg 120
ttcgatttcg gggcgagct ggacagcatc gaaatcgagg gccgcagcta cacctttccc 180
cgcagcatgc atgtacacac ctatttccat tccgacttca aacaggatgt cagcaaggaa 240
atcgaagagt atcgggagaa aatgagccag cacgtgggcg tgtccggccg ctacaagttg 300
ttcagcgctt cgctgagcgt ggatttcacc accacggacc agcaactgac cgagattacc 360
tacagctcca cccgcgaagc ccatgtgctg tggtagatca gcctgcctgg cgcggccacg 420
ctgcgttcga tgctgcgccg cgatttccgc gacgacctga acaaccccaa tatgccggcc 480
atggagctgt tcaagcgcta tggccctac tacatatcgg aagcggcggt gggcggccgg 540
ctggactaca gcgcggccag caagacctg aagatggaca gcagccagtc gctgtccacc 600
accgccgaaa tgtcctacaa ggcgctggtg ggcgagatca agatcgagca tggctcggag 660
atggaaaagc aggtcaacag cttccgcagc aactccacca tccgtctcac cgcaccggc 720
ggcaagccgg gcatgaccga tcgcatactg cacggtccgg attcgcagca ggcgttctcg 780
caatgggagg aatcgctgct cgactatgcg acgctgatgg acttttccac cgaaagcctg 840
caaccgatct gggcgctggc cgacaagccc gagcgcgccg togagcttga ggacgccttc 900
cccgaattca tgaagcagtc gcagcagtc atccccaaagg tggacaaggt gctgctgatg 960
gacgcgcggc cgcctatggt gaaggctggg gaggatagcg gctccggcgc gtcggaggat 1020
ctggctgtgt tcaatcccag cacctccaat ggctacaaga tggttggcca gttcggctcag 1080
cgcaaccatg ccagcgtggc ggatggccat gcgccgattt tcaaggatct gttcgatctg 1140
ggcgtgctga aggcgcgggt gggttggcag cgggtgtggg acgacgccgg ctccggcaag 1200
tccaaggact acgcgtgctg gcgcgcgatt ccgccgcagg gctaccgcgc gctgggcgat 1260
gtgatgatgc tggccaccag cggctataac ccgccgaatc tgccggacta tgtttgctg 1320
catcaaagcc tgtgcgcgga tgtgcagacg ctgcaaaacc ggggtgtggtg ggacaagggc 1380
accggcgcgc gcaaggattt gagcctgtgg caaccgggcg cggccggcgc ggtggcgtcc 1440
tcttgcttcg cggcgctgcc taattacaac aaccgcccca attccggcga catcgagcgc 1500
ttgcgcggca gcatcgcagc cgtgaagacc agcgcgatcg cgtccatgca ggaaatgaag 1560
tccatgctca gccagcacca aggcattgaa gcgatgatgt ccaagctgtg a 1611

<210> 5
<211> 1755
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de nucleótidos que codifica Axmi205(evo34)

<400> 5

5

10

ES 2 647 596 T3

atggcatccg cagcaaatgc aggtcagctt ggcaacctcc ccggcgttac ttccatgggc 60

atgggctatg acgtgaatgg tttgtacgcc agcccggaaa gcctgcttgg ccaacccttg 120

ttcgatttgc gcggcgagct ggacagcatc gaaatcgagg gccgcagcta cacctttccc 180

cgcagcatgc atgtacacac ctatttccat tccgacttca aacaggatgt cagcaaggaa 240

atcgaagagt atcggaccaa aatgagccag cacgtggggc tgteccggccg ctacaagttg 300

ttcagcgctt cgctgagcgt ggatttcacc accacggacc agcaactgac cgagattacc 360

tacagctcca cccgcgaagc ccatgtgctg tggtagatca gcctgcctgg cgcggccaag 420

ctgcgttcga tgctgcgccg cgatttccgc gacgacctga acaaccccaa tatgccggcc 480

atggagctgt tcaagcgcta tggtcctac tacatatcgg aagcggcggg gggcggccgg 540

ctggactaca gcgcggccag caagaccttg aagatggaca gcagccagtc gctgtccacc 600

accgccgaaa tgtcctacaa ggcgctgggt ggcgagatca agatcgagca tggctcggag 660

atggaaaagc aggtcaacag cttccgcagc aactccacca tccgtctcac cgccaccggc 720

ggcaagccgg gcatgaccga tcgcatactg cacggctccg attcgcagca ggcgttctcg 780

caatgggcgg aatcgctgct cgactatgcg acgctgatgg acttttccac cgaaagcctg 840

caaccgatct gggcgctggc cgacaagccc gagcgcgcgg tcgagcttga ggacgccttc 900

cccgaattca tgaagcagtc gcagcagtc atcccccaagg tggacaaggt gctgctgatg 960

gacgcgcggc cgctatggt gaaggctggg gaggatagcg gctccggcgc gtcggaggat 1020

ctggctgtgt tcaatcccag cacctccaat ggctacaaga tggttggcca gttcggtcag 1080

cgcaaccatg ccagcgtggc ggatggccat gcgccgattt tcaaggatct gttcgatctg 1140

ggcgtgctga aggcgcgggt gggttggcag cgggtgtggg acgacgccgg ctccggcaag 1200

tccaaggact acgcgtgctg gcgcgcgatt ccgccgcagg gctaccgcgc gctgggcgat 1260

gtgatgatgc tggccaccag cggctataac ccgccgaatc tgccggacta tgtttgctg 1320

catcaaagcc tgtgcgcgga tgtgcagacg ctgcaaaacc ggggtgtggg ggacaagggc 1380

accggcgcgc gcaaggatgt cagcctgtgg caaccggggc cggccggcgc ggtggcgtcc 1440

tcttgcttcg ccggcgtgce taattacaac aaccgcacca attccggcga catcgagcgc 1500

ttgcgcggca gcatcgcatg cgtgaagacc agcgcgatcg cgtccatgca ggaaatgaag 1560

tccatgctca gccagcacca aggcattgaa gcgatgatgt ccaagctgtg atcggcgcgc 1620

cggtcgacaa gcttgccggc gcactcgagt ctggtaaaga aaccgctgct gcgaaatttg 1680

aacgccagca catggactcg totactagcg cagcttaatt aacctaggct gctgccaccg 1740

ctgagcaata actag 1755

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

5 <220>
<223> Secuencia de nucleótidos que codifica Axmi205(evo35)

<400> 6

ES 2 647 596 T3

atggcatccg cagcaaatgc aggtcagctt ggcaacctcc ccggcggttac ttccatgggc 60
atgggctatg acgtgaatgg tttgtacgcc agccccgaaa gcctgcttgg ccaacccttg 120
ttcgatttcg gcggcgagct ggacagcatc gaaatcgagg gccgcagcta cacctttccc 180
cgcagcatgc atgtacacac ctatttccat tccgaactca aacaggatgt cagcaaggaa 240
atcgaagagt atcgggagaa aatgagccag cacgtgggcg tgtccggccg ctacaagttg 300
ttcagcgctt cgctgagcgt ggatttcacc accacggacc agcaactgac cgagattacc 360
tacagctcca cccgcgaagc ccatgtgctg tggtagatca gcctgcctgg cgcggccaacg 420
ctgcgttcga tgctgcgccg cgatttccgc gacgacctga acaaccccaa tatgccggcc 480
atggagctgt tcaagcgcta tggtcacctac tacatatcgg aagcggcggt gggcggccgg 540
ctggactaca gcgcggccag caagaccttg aagatggaca gcagccagtc gctgtccacc 600
accgccgaaa tgtcctacaa ggcgctggtg ggcgagatca agatcgagca tggctcggag 660
atggaaaagc aggtcaacag cttccgcagc aactccacca tccgtctcac cgccaccggc 720
ggcaagccgg gcatgaccga tcgcatactg cacgggtccg attcgcagca ggcggtctcg 780
caatggggcg aatcgctgct cgactatgcg acgctgatgg acttttccac cgaaagcctg 840
caaccgatct gggcgctggc cgacaagccc gagcgcgcg tccgagcttga ggacgccttc 900
cccgaattca tgaagcagtc gcagcagtc atccccaaag tggacaaggt gctgctgatg 960
gacgcgcggc cgcctatggt gaaggctggg gaggatagcg gctccggcgc gtcggaggat 1020
ctggctgtgt tcaatcccag cacctccaat ggctacaaga tggttggcca gttcggtcag 1080
cgcaaccatg ccagcgtggc ggatggccat gcgccgattt tcaaggatct gttcgatctg 1140
ggcgtgctga aggcgcgggt gggttggcag cgggtgtggg acgacgccgg ctccggcaag 1200
tccaaggact acgcgtgctg gcgcgcgatt ccgccgcagg gctaccgcgc gctgggcgat 1260
gtgatgatgc tggccaccag cggctataac ccgccgaatc tgccggacta tgtttgcgtg 1320
catcaaagcc tgtgcgcgga tgtgcagacg ctgcaaaacc ggggtgtggtg ggacaagggc 1380
accggcgcgc gcaaggatgt cagcctgtgg caaccgggcg cggccggcgc ggtggcgtcc 1440
tcttgcttcg ccggcgtgcc taattacaac aaccggccca attccggcga catcgagcgc 1500
ttgcgcggca gcatcgcagc cgtgaagacc agcgcgatcg cgtccatgcg ggaaatgaag 1560
tccatgctca gccagcacca aggcattgaa gcgatgatgt ccaagctg 1608

<210> 7
<211> 536
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Axmi205(evo30) mutante

5

ES 2 647 596 T3

<400> 7

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 647 596 T3

Val Asn Ser Phe Arg Ser Asn Ser Thr Ile Arg Leu Thr Ala Thr Gly
 225 230 235 240
 Gly Lys Pro Gly Met Thr Asp Arg Ile Leu His Gly Pro Asp Ser Gln
 245 250 255
 Gln Ala Phe Ser Gln Trp Ala Glu Ser Leu Leu Asp Tyr Ala Thr Leu
 260 265 270
 Met Asp Phe Ser Thr Glu Ser Leu Gln Pro Ile Trp Ala Leu Ala Asp
 275 280 285
 Lys Pro Glu Arg Arg Val Glu Leu Glu Asp Ala Phe Pro Glu Phe Met
 290 295 300
 Lys Gln Ser Gln Gln Ser Ile Pro Lys Val Asp Lys Val Leu Leu Met
 305 310 315 320
 Asp Ala Arg Pro Pro Met Val Lys Ala Gly Glu Asp Ser Gly Ser Gly
 325 330 335
 Ala Ser Glu Asp Leu Ala Val Phe Asn Pro Ser Thr Ser Asn Gly Tyr
 340 345 350
 Lys Met Val Gly Gln Phe Gly Gln Arg Asn His Ala Ser Val Ala Asp
 355 360 365
 Gly His Ala Pro Ile Phe Lys Asp Leu Phe Asp Leu Gly Val Leu Lys
 370 375 380
 Ala Pro Val Gly Trp Gln Arg Val Trp Asp Asp Ala Gly Ser Gly Lys
 385 390 395 400
 Ser Lys Asp Tyr Ala Cys Trp Arg Ala Ile Pro Pro Gln Gly Tyr Arg
 405 410 415
 Ala Leu Gly Asp Val Met Met Leu Ala Thr Ser Gly Tyr Asn Pro Pro
 420 425 430
 Asn Leu Pro Asp Tyr Val Cys Val His Gln Ser Leu Cys Ala Asp Val
 435 440 445
 Gln Thr Leu Gln Asn Arg Val Trp Trp Asp Lys Gly Thr Gly Ala Arg
 450 455 460
 Lys Asp Leu Ser Leu Trp Gln Pro Gly Ala Ala Gly Ala Val Ala Ser
 465 470 475 480

ES 2 647 596 T3

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

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

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

Met Glu Ala Met Met Ser Lys Leu
 530 535

<210> 8
 <211> 536
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Axmi205(evo34) mutante

<400> 8

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

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

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

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

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

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

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

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

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

5

10

ES 2 647 596 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 647 596 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

Met Glu Ala Met Met Ser Lys Leu
 530 535

<210> 9
 <211> 536
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Axmi205(evo35) mutante

<400> 9

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

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

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

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

5

10

ES 2 647 596 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 647 596 T3

Asp Ala Arg Pro Pro Met Val Lys Ala Gly Glu Asp Ser Gly Ser Gly
 325 330 335
 Ala Ser Glu Asp Leu Ala Val Phe Asn Pro Ser Thr Ser Asn Gly Tyr
 340 345 350
 Lys Met Val Gly Gln Phe Gly Gln Arg Asn His Ala Ser Val Ala Asp
 355 360 365
 Gly His Ala Pro Ile Phe Lys Asp Leu Phe Asp Leu Gly Val Leu Lys
 370 375 380
 Ala Pro Val Gly Trp Gln Arg Val Trp Asp Asp Ala Gly Ser Gly Lys
 385 390 395 400
 Ser Lys Asp Tyr Ala Cys Trp Arg Ala Ile Pro Pro Gln Gly Tyr Arg
 405 410 415
 Ala Leu Gly Asp Val Met Met Leu Ala Thr Ser Gly Tyr Asn Pro Pro
 420 425 430
 Asn Leu Pro Asp Tyr Val Cys Val His Gln Ser Leu Cys Ala Asp Val
 435 440 445
 Gln Thr Leu Gln Asn Arg Val Trp Trp Asp Lys Gly Thr Gly Ala Arg
 450 455 460
 Lys Asp Val Ser Leu Trp Gln Pro Gly Ala Ala Gly Ala Val Ala Ser
 465 470 475 480
 Ser Cys Phe Ala Gly Val Pro Asn Tyr Asn Asn Pro Pro Asn Ser Gly
 485 490 495
 Asp Ile Glu Arg Leu Arg Gly Ser Ile Ala Cys Val Lys Thr Ser Ala
 500 505 510
 Ile Ala Ser Met Arg Glu Met Lys Ser Met Leu Ser Gln His Gln Gly
 515 520 525
 Met Glu Ala Met Met Ser Lys Leu
 530 535

<210> 10
 <211> 536
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Axmi205 (PMLib1 con 1G2_p2a11) mutante

<400> 10

5

ES 2 647 596 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 647 596 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 647 596 T3

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

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

Met Glu Ala Met Met Ser Lys Leu
530 535

<210> 11

<211> 536

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Axmi205 (PMlib1 con 1G2_p1c1) mutante

<400> 11

ES 2 647 596 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 647 596 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 647 596 T3

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

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

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

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

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

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

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

Met Glu Ala Met Met Ser Lys Leu
 530 535

<210> 12
 <211> 536
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Axmi205 (PMlib1 con 1G2_pla4) mutante

<400> 12

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

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

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

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

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

5

10

ES 2 647 596 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 647 596 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Met Glu Ala Met Met Ser Lys Leu
 530 535

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

<220>
 <223> Péptido con dirección al retículo endoplasmático

<400> 13

Lys Asp Glu Leu
 1

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ácido nucleico recombinante que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que es una variante de SEQ ID NO:2, donde dicho polipéptido tiene actividad plaguicida mejorada
5 relativa a la SEQ ID NO:2 y donde dicha secuencia de nucleótidos se selecciona de entre SEQ ID NO:4, 5 o 6, o una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEQ ID NO:7, 8, 9, 10, 11 o 12.
2. La molécula de ácido nucleico recombinante de la reivindicación 1, donde dicha secuencia de nucleótidos es una
10 secuencia sintética que se ha diseñado para la expresión en una planta.
3. La molécula de ácido nucleico recombinante de la reivindicación 1, donde dicha secuencia de nucleótidos está operativamente unida a un promotor que puede dirigir la expresión de dicha secuencia de nucleótidos en una célula de planta, comprendiendo además preferentemente una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido
15 heterólogo.
4. Una célula huésped que contiene la molécula de ácido nucleico recombinante de la reivindicación 3, preferentemente que es una célula huésped bacteriana o una célula de planta.
- 20 5. Una planta transgénica que comprende la célula huésped de la planta de la reivindicación 4, preferentemente donde dicha planta se selecciona de entre el grupo que consiste en maíz, sorgo, trigo, col, girasol, tomate, crucíferas, pimientos, patata, algodón, arroz, soja, remolacha azucarera, caña de azúcar, tabaco, cebada y colza.
6. Un polipéptido recombinante con actividad plaguicida, donde dicho polipéptido es una variante de SEQ ID NO:2, donde dicho polipéptido tiene actividad plaguicida mejorada relativa a la SEQ ID NO:2 y comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEQ ID NO: 7, 8, 9, 10, 11 o 12, preferentemente que comprende
25 adicionalmente secuencias de aminoácidos heterólogos.
7. Un anticuerpo que se une selectivamente al polipéptido de la reivindicación 6.
- 30 8. Una composición que comprende el polipéptido de la reivindicación 6, preferentemente donde dicha composición:
- (a) se selecciona de entre el grupo que consiste en un polvo, un polvo fino, un microgránulo, un gránulo, una pulverización, una emulsión, un coloide y una solución;
- 35 (b) se prepara por desecación, liofilización, homogeneización, extracción, filtración, centrifugación, sedimentación o concentración de un cultivo de células de *Bacillus thuringiensis*;
- (c) comprende de aproximadamente 1 % a aproximadamente 99 % en peso de dicho polipéptido.
9. Un método de control o eliminación de una población de plagas de lepidópteros o coleópteros que comprende
40 poner en contacto dicha población con una cantidad eficaz como plaguicida del polipéptido de la reivindicación 6.
10. Un método de producción de un polipéptido con actividad plaguicida, que comprende cultivar la célula huésped de la reivindicación 4 en condiciones en las que se expresa la molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido.
- 45 11. Una planta que tiene incorporada de forma estable en su genoma una construcción de ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que es una variante de SEQ ID NO:2, donde dicho polipéptido tiene actividad plaguicida mejorada relativa a la SEQ ID NO:2, donde dicha secuencia de nucleótidos se selecciona de entre SEQ ID NO:4, 5 o 6, o una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEQ ID NO:7, 8, 9, 10, 11 o 12, donde dicha secuencia de nucleótidos está operativamente
50 unida a un promotor que dirige la expresión de una secuencia de codificación en una célula de planta, preferentemente donde dicha planta es una célula de planta.
12. Una semilla transgénica de la planta de la reivindicación 11, donde dicha semilla comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada de entre SEQ ID NO:4, 5 o 6, o una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEQ ID NO:7, 8, 9, 10, 11 o 12.
55
13. Un método de protección de una planta de una plaga de insectos, que comprende expresar en una planta o célula de la misma una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que es una variante de SEQ ID NO:2, donde dicho polipéptido tiene actividad plaguicida mejorada relativa a la SEQ ID NO:2, donde dicha secuencia de
60 nucleótidos se selecciona de entre SEQ ID NO:4, 5 o 6, o una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEQ ID NO:7, 8, 9, 10, 11 o 12.
14. El método de la reivindicación 13, donde dicha planta produce un polipéptido plaguicida que tiene actividad plaguicida contra una plaga de lepidópteros o coleópteros.
65
15. Un método de aumento del rendimiento en una planta que comprende cultivar en un campo una planta o una

5 semilla de la misma que tiene incorporado de manera estable en su genoma una construcción de ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína que tiene actividad plaguicida, donde dicha secuencia de nucleótidos codifica un polipéptido que es una variante de SEQ ID NO:2, donde dicho polipéptido tiene actividad plaguicida mejorada relativa a la SEQ ID NO:2, donde dicha secuencia de nucleótidos se selecciona de entre SEQ ID NO:4, 5 o 6, o una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEQ ID NO:7, 8, 9, 10, 11 o 12, donde dicho campo está infestado con una plaga contra la cual dicho polipéptido tiene actividad plaguicida.