

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 663 283**

51 Int. Cl.:

C12N 15/82 (2006.01)

A01N 63/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.12.2010 PCT/US2010/060817**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.06.2011 WO11075588**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.12.2010 E 10838260 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.01.2018 EP 2512222**

54 Título: **Uso combinado de las proteínas CRY1Ca y CRY1Fa para el control de insectos resistentes**

30 Prioridad:

16.12.2009 US 284281 P

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

11.04.2018

73 Titular/es:

**DOW AGROSCIENCES LLC (100.0%)
9330 Zionsville Road
Indianapolis, IN 46268-1054, US**

72 Inventor/es:

**MEADE, THOMAS;
NARVA, KENNETH;
STORER, NICHOLAS, P.;
SHEETS, JOEL, J.;
WOOSLEY, AARON, T. y
BURTON, STEPHANIE, L.**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 663 283 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

Uso combinado de las proteínas CRY1Ca y CRY1Fa para el control de insectos resistentes

Antecedentes de la invención

5 Los seres humanos cultivan el maíz para aplicaciones alimentarias y energéticas. Los seres humanos también cultivan muchos otros cultivos, incluyendo la soja y el algodón. Los insectos comen y dañan las plantas y, por lo tanto, socavan estos esfuerzos humanos. Miles de millones de dólares se gastan cada año para controlar las plagas de insectos y miles de millones se pierden por el daño que infligen. Los insecticidas químicos orgánicos sintéticos han sido las principales herramientas utilizadas para controlar las plagas de insectos, pero los insecticidas biológicos, tales como las proteínas insecticidas derivadas de *Bacillus thuringiensis* (Bt), han desempeñado un papel importante en algunas áreas. La capacidad de producir plantas resistentes a los insectos mediante la transformación con genes de proteínas insecticidas Bt ha revolucionado la agricultura moderna y ha aumentado la importancia y el valor de las proteínas insecticidas y sus genes.

10 Varias proteínas Bt se han utilizado para crear plantas transgénicas resistentes a los insectos que se han registrado y comercializado con éxito hasta la fecha. Estos incluyen Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1F y Cry3Bb en maíz, Cry1Ac y Cry2Ab en algodón, y Cry3A en patata.

15 Los productos comerciales que expresan estas proteínas expresan una única proteína, excepto en los casos en que se desee el espectro insecticida combinado de 2 proteínas (por ejemplo, Cry1Ab y Cry3Bb en maíz combinado para proporcionar resistencia a plagas de lepidópteros y al gusano de la raíz, respectivamente) o donde la acción independiente de las proteínas las hace útiles como una herramienta para retrasar el desarrollo de la resistencia en poblaciones de insectos susceptibles (por ejemplo, Cry1Ac y Cry2Ab en el algodón combinado para proporcionar el control de resistencia para el gusano cogollero del tabaco).

20 Es decir, algunas de las cualidades de las plantas transgénicas resistentes a los insectos que han llevado a una rápida y generalizada adopción de esta tecnología también dan lugar a la preocupación de que las poblaciones de plagas desarrollarán resistencia a las proteínas insecticidas producidas por estas plantas. Se han sugerido varias estrategias para preservar la utilidad de rasgos de resistencia a los insectos basados en Bt que incluyen el despliegue de proteínas a una dosis alta en combinación con un refugio, y la alternancia, o el co-despliegue, con diferentes toxinas (McGaughey et al. (1998), "B.t. Resistance Management", *Nature Biotechnol.* 16:144 - 146).

25 Las proteínas seleccionadas para su uso en una pila de manejo resistente a insectos (IRM) necesitan ejercer su efecto insecticida independientemente, de modo que la resistencia desarrollada a una proteína no confiera resistencia a la segunda proteína (es decir, no hay resistencia cruzada a las proteínas). Si, por ejemplo, una población de plagas que es resistente a la "Proteína A" es sensible a la "Proteína B", se concluiría que no existe resistencia cruzada y que una combinación de Proteína A y Proteína B sería efectiva para retrasar la resistencia a la Proteína A sola.

30 En ausencia de poblaciones de insectos resistentes, las evaluaciones pueden hacerse basándose en otras características que se supone están relacionadas con el mecanismo de acción y el potencial de resistencia cruzada. La utilidad de la unión mediada por receptores en la identificación de proteínas insecticidas que probablemente no presentan resistencia cruzada ha sido sugerida (van Mellaert et al., 1999). El principal predictor de la falta de resistencia cruzada inherente en este enfoque es que las proteínas insecticidas no compiten por los receptores en una especie de insecto sensible.

35 En el caso de que dos toxinas Bt compitan por el mismo receptor, entonces si ese receptor muta en ese insecto de modo que una de las toxinas ya no se une a ese receptor y, por lo tanto, ya no es un insecticida contra el insecto, podría ser el caso de que el insecto también fuera resistente a la segunda toxina (que se une competitivamente al mismo receptor). Es decir, se dice que el insecto es resistente a ambas toxinas Bt. Sin embargo, si dos toxinas se unen a dos receptores diferentes, esto podría ser una indicación de que el insecto no sería simultáneamente resistente a esas dos toxinas.

40 La proteína Cry1Fa es útil en el control de muchas especies de plagas de lepidópteros, incluyendo la barrenadora europea del maíz (ECB, *Ostrinia nubilalis* (Hubner)) y el gusano de la caña (FAW, *Spodoptera frugiperda*), y es activa contra la barrena de la caña de azúcar (SCB, *Diatraea saccharalis*).

45 La proteína Cry1Fa, tal como se produce en plantas de maíz transgénicas que contienen el evento TC1507, es responsable de un rasgo de resistencia a los insectos líder en la industria para el control de FAW. Cry1Fa se despliega adicionalmente en los productos Herculex®, SmartStax™, y WideStrike™.

La capacidad de llevar a cabo estudios de unión a receptores (competitivos u homólogos) usando la proteína Cry1Fa es limitada debido a que la técnica más común disponible para marcar proteínas para su detección en ensayos de unión a receptores inactiva la actividad insecticida de la proteína Cry1Fa.

55 Otras toxinas Cry se enumeran en el sitio web del comité de nomenclatura oficial de B.t. (Crickmore et al.,

lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/). Véase el Apéndice A, adjunto. Actualmente hay cerca de 60 grupos principales de toxinas "Cry" (Cry1-Cry59), con toxinas Cyt adicionales y toxinas VIP y similares. Muchos de cada grupo numérico tienen subgrupos de letras mayúsculas, y los subgrupos de letras mayúsculas tienen sub-subgrupos de letras minúsculas. (Cry1 tiene A-L, y Cry1A tiene a-i, por ejemplo).

5 Breve exposición de la invención

La presente invención se refiere en parte al descubrimiento sorprendente de que una población de gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda*; FAW) seleccionada por la resistencia a la actividad insecticida de la proteína Cry1Fa no es resistente a la actividad insecticida de la proteína Cry1Ca. Como los expertos en la materia reconocerán, con el beneficio de esta descripción, las plantas que expresan estas dos proteínas insecticidas, o porciones insecticidas de las mismas, serán útiles para retrasar o prevenir el desarrollo de la resistencia a cualquiera de estas proteínas insecticidas solas.

La presente invención también se apoya en el descubrimiento de que Cry1Fa y Cry1Ca no compiten entre sí por la unión de receptores intestinales de FAW (o de *Diatraea saccharalis* (barrenador de caña de azúcar, SCB)).

La presente invención también se refiere en parte a pilas triples o "pirámides" de tres (o más) toxinas, siendo las toxinas Cry1Fa y Cry1C el par de bases. Una pirámide preferida proporciona al menos dos proteínas que proporcionan actividad no resistente cruzada contra dos plagas: el FAW y el BCE (perforador europeo del maíz; *Ostrinia nubilalis*): Cry1Fa más Cry1Ca más una o más toxinas anti-ECB como Cry1Ab. En algunas realizaciones de pirámides preferidas, las toxinas seleccionadas tienen tres modos de acción separados contra FAW. Las combinaciones de pirámides preferidas son Cry1Fa más Cry1Ca más otra toxina/gen seleccionado del grupo que consiste en Vip3Ab, Cry1D, Cry1Be y Cry1E. Las plantas (y la superficie plantada con tales plantas) que producen estas proteínas se incluyen dentro del alcance de la presente invención. También se pueden agregar toxinas/genes adicionales, pero estas pilas triples particulares, de acuerdo con la presente invención, proporcionan de manera ventajosa y sorprendente tres modos de acción contra FAW. Esto puede ayudar a reducir o eliminar la necesidad de áreas de refugio.

La presente invención también se refiere en general al uso de tres proteínas insecticidas (Cripoteínas en algunas realizaciones preferidas) que no compiten entre sí contra una única plaga diana.

Breve descripción de las figuras

Figura 1: Calificaciones de daños en la alimentación de trozos de hojas de maíz expuestos in vitro a larvas recién nacidas de gusano cogollero (FAW) y gusano cogollero resistente a Cry1F (rFAW). Las plantas T0 transgénicas seleccionadas después de la transformación con pDAS5162 se dividieron en dos grupos mediante cribado por inmunotransferencia usando el anticuerpo DIG152RPC1: plantas que no producen DIG-109 (en el lado izquierdo de la Figura), y aquellas que tienen niveles detectables de DIG-109 (en el centro de la figura). Las plantas DIG-109 positivas se clasifican por el nivel de expresión (de izquierda a derecha, de menor a mayor). El análisis de HP para DSM2 se completó en 36 líneas transformadas con pDAS5162. Se detectó un evento de integración simple, definido como 1-2 copias del gen, en el 95% de las muestras. Los resultados del bioanálisis de las plantas de control positivos y negativos se muestran en el lado derecho de la figura.

Figura 2: Competencia para unirse a los BBMV de *Spodoptera frugiperda* por la toxina central Cry1Fa, la toxina central Cry1Ca y la toxina nuclear Cry1Ca marcada con 125I.

Breve descripción de las secuencias

40 SEQ ID NO: 1 proteína quimérica de núcleo Cry1Ca/protoxina Cry1Ab de 1164 aa (DIG-152) (versión pMYC2547)

SEQ ID NO: 2 segunda proteína quimérica de núcleo Cry1Ca/protoxina Cry1Ab de 1164 aa (DIG-109) (versión de maíz)

SEQ ID NO: 3 Codificación CDS optimizada para maíz DIG-109 de 3492 bp

SEQ ID NO: 4 es una toxina de núcleo Cry1Fa.

45 SEQ ID NO: 5 es una toxina de núcleo Cry1Ca.

Descripción detallada de la invención

Como se muestra en este documento, la toxina Cry1Ca producida en maíz transgénico y otras plantas (algodón y soja, por ejemplo) es muy efectiva para controlar el gusano cogollero (FAW; *Spodoptera frugiperda*) que ha desarrollado resistencia a la actividad de Cry1Fa. Por lo tanto, la presente invención se refiere en parte al sorprendente descubrimiento de que el gusano cogollero resistente a Cry1Fa es susceptible (es decir, no es resistente inespecíficamente) a Cry1Ca.

La presente invención también se refiere en parte al descubrimiento sorprendente de que la toxina Cry1Ca es eficaz

para proteger plantas (tales como plantas de maíz contra el daño causado por el cogollero del maíz resistente a Cry1Fa. Para una discusión sobre esta plaga, véase, p. ej., Tabashnik, PNAS (2008), vol. 105 no. 49, 19029-19030.

5 La presente invención incluye el uso de la toxina Cry1Ca para proteger el maíz y otras especies de plantas económicamente importantes frente al daño y la pérdida de rendimiento causada por la alimentación del gusano cogollero o las poblaciones de gusanos cogolleros que han desarrollado resistencia contra Cry1Fa.

Por lo tanto, la presente invención muestra una pila de IRM para prevenir o mitigar el desarrollo de la resistencia por el gusano cogollero frente a Cry1Fa y/o a Cry1Ca..

La presente invención proporciona composiciones para controlar plagas de lepidópteros que comprenden células que producen una proteína que contiene toxina nuclear Cry1Fa y una proteína que contiene toxina nuclear Cry1Ca.

10 La invención comprende además un huésped transformado para producir tanto una proteína que contiene toxina nuclear Cry1Fa como una proteína que contiene toxina nuclear Cry1Ca, en donde dicho huésped es un microorganismo o una célula vegetal. El o los polinucleótidos objeto están preferiblemente en una construcción genética bajo control (operativamente unidos/que comprenden) de un promotor no de *Bacillus thuringiensis*. Los polinucleótidos objeto pueden comprender el uso de codones para una expresión mejorada en una planta.

15 Se pretende además que la invención proporcione un método de control de plagas lepidópteras que comprende poner en contacto dichas plagas o el medio ambiente de dichas plagas con una cantidad eficaz de una composición que contiene una proteína que contiene toxina nuclear Cry1Fa y además contiene una proteína que contiene toxina nuclear Cry1Ca.

20 Una realización de la invención comprende una planta de maíz (y otras plantas, por ejemplo, algodón y soja) que comprende un gen expresable en planta que codifica una proteína que contiene toxina nuclear Cry1Ca y un gen expresable en planta que codifica una proteína que contiene toxina nuclear Cry1Fa, y semillas de dicha planta. Una realización adicional de la invención comprende una planta de maíz (y otras plantas, por ejemplo, algodón y soja) en donde un gen expresable en plantas que codifica una proteína que contiene toxina nuclear Cry1Ca y un gen expresable en plantas que codifica una proteína que contiene toxina nuclear Cry1Fa se han introgressado en dicha
25 planta de maíz y semilla de dicha planta.

(Para una revisión de Cry1C como bioinsecticida potencial en plantas, véase Avisar et al., 2009). Avisar D, Eilenberg H, Keller M, Reznik N, Segal M, Sneh B, Zilberstein A (2009) The *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin Cry1C as a potential bioinsecticide in plants. *Plant Science* 176: 315-324.)

30 Receptores de insecto. Como se describe en los Ejemplos, los estudios de unión a receptores competitivos usando la proteína de toxina nuclear Cry1Ca radiomarcada muestran que la proteína de toxina nuclear Cry1Fa no compete por el sitio de unión de alta afinidad presente en tejidos de insecto FAW a los que Cry1Ca se une. Estos resultados indican que la combinación de las proteínas Cry1Fa y Cry1Ca es un medio eficaz para mitigar el desarrollo de la resistencia en poblaciones FAW frente a Cry1Fa (y del mismo modo, el desarrollo de la resistencia frente a Cry1Ca), y probablemente aumentaría el nivel de resistencia frente a esta plaga en las plantas de maíz que expresan ambas
35 proteínas.

De este modo, basándose en parte en los datos descritos anteriormente y en otras partes de este documento, se cree que la coproducción (apilamiento) de las proteínas Cry1Ca y Cry1Fa puede usarse para producir una pila IRM de dosis alta para FAW. Se pueden agregar otras proteínas a esta combinación para expandir el espectro de control de insectos. Por ejemplo, en el maíz, la adición de Cry1Ab crearía una pirámide IRM para controlar el barrenador europeo del maíz
40

Otra opción de despliegue sería utilizar una o ambas de las proteínas Cry1Fa y Cry1Ca en combinación con la proteína Cry1Ab para mitigar el desarrollo de la resistencia. Por lo tanto, otra opción de despliegue de la presente invención sería el uso de una o ambas de las proteínas Cry1Fa y Cry1Ca en las regiones de cultivo donde el desarrollo de la proteína Cry1Ab se ha vuelto ineficaz en el control del barrenador de la caña de azúcar debido al desarrollo de poblaciones de resistencia. En consecuencia, una combinación preferida de "triple pila" o "pirámide" para su uso de acuerdo con la presente invención es Cry1F más Cry1C más Cry1Ab.
45

La presente invención también se refiere en parte a pilas triples o "pirámides" de tres (o más) toxinas, siendo las toxinas Cry1Fa y Cry1C el par de bases. Una pirámide preferida proporciona al menos dos proteínas que proporcionan actividad no resistente inespecífica contra dos plagas: el FAW y el ECB (perforador europeo del maíz; *Ostrinia nubilalis*): Cry1Fa más Cry1Da más una o más toxinas ECB, tales como Cry1Ab (véase el documento US 2008 0311096), ya que Cry1F es activo contra ambos insectos. Otras toxinas ECB incluyen Cry1Be (véase el documento USSN 61/284.290; presentado el 16 de diciembre de 2009), Cry1I (véase el documento USSN 61/284.278; presentado el 16 de diciembre de 2009), Cry2Aa (véase el documento USSN 61/284.278; presentado el 16 de diciembre de 2009) y DIG -3 (véase el documento US 2010 00269223). En algunas realizaciones de pirámides preferidas, las toxinas seleccionadas tienen tres modos de acción separados contra FAW; estas combinaciones de pirámide preferidas son Cry1Fa más Cry1Ca más otra toxina/gen seleccionado del grupo que consiste en Vip3Ab, Cry1D (véase el documento USSN 61/284.252; presentado el 16 de diciembre de 2009), Cry1Be y Cry1E (véase el
55

documento USSN 61/284.278; presentado el 16 de diciembre de 2009). Las plantas (y la superficie sembrada con tales plantas) que producen estas tres toxinas están incluidas dentro del alcance de la presente invención. También pueden añadirse otras toxinas/genes, pero estas pilas triples particulares, de acuerdo con la presente invención, proporcionarían de manera ventajosa y sorprendente tres modos de acción contra FAW. Esto puede ayudar a reducir o eliminar el requisito de superficies de refugio. De este modo, se incluye dentro de la presente invención un campo así plantado de más de 10 acres.

Otras toxinas Vip3, por ejemplo, se enumeran en el Apéndice A adjunto. También pueden usarse aquellos números del GENBANK para obtener las secuencias para cualquiera de los genes y proteínas descritos o mencionados en la presente memoria.

La Patente de Estados Unidos N° 5.188.960 y la Patente de Estados Unidos N° 5.827.514 describen proteínas que contienen toxina nuclear Cry1Fa adecuadas para su uso en la realización de la presente invención. La patente de Estados Unidos N° 6.218.188 describe secuencias de ADN optimizadas para plantas que codifican proteínas que contienen la toxina nuclear Cry1Fa que son adecuadas para su uso en la presente invención.

Las combinaciones de las toxinas descritas en la presente invención se pueden usar para controlar plagas de lepidópteros. Los lepidópteros adultos, por ejemplo, las mariposas y polillas, se alimentan principalmente del néctar de las flores y son un importante efector de polinización. Casi todas las larvas de lepidópteros, es decir, las orugas, se alimentan de plantas y muchas son plagas graves. Las orugas se alimentan del follaje o dentro de éste o en las raíces o el tallo de las plantas, privando a la planta de nutrientes y a menudo destruyendo la estructura física de la planta. Además, las orugas se alimentan de frutas, tejidos y granos y harinas almacenadas, arruinando estos productos para la venta o reduciendo gravemente su valor. Tal como se utiliza en la presente memoria, la referencia a las plagas de lepidópteros se refiere a varias etapas de la vida de la plaga, incluyendo las etapas larvarias.

Algunas toxinas quiméricas de la presente invención comprenden una porción completa de toxina nuclear N-terminal de una toxina Bt y, en algún punto más allá del extremo de la porción de toxina nuclear, la proteína tiene una transición a una secuencia heteróloga de protoxina. La porción de toxina N-terminal, activa de forma insecticida, de una toxina Bt se denomina toxina "núcleo". La transición desde el segmento de toxina nuclear al segmento de protoxina heteróloga puede producirse aproximadamente en la unión toxina/protoxina o, en alternativa, puede conservarse una porción de la protoxina nativa (que se extiende más allá de la porción de toxina nuclear), ocurriendo la transición a la protoxina heteróloga posteriormente.

Como ejemplo, una toxina quimérica de la presente invención, es una porción de toxina de núcleo completo de Cry1Fa (de los aminoácidos 1 a 601) y/o una protoxina heteróloga (de los aminoácidos 602 al extremo C). En una realización preferida, la porción de una toxina quimérica que comprende la protoxina se deriva de una toxina proteica Cry1Ab. Como segundo ejemplo, una segunda toxina quimérica de la presente invención, como se describe en la SEQ ID NO: 1, tiene la porción de toxina nuclear completa de Cry1Ca (aminoácidos 1 a 619) y una protoxina heteróloga (aminoácidos 620 al extremo C-terminal). En una realización preferida, la porción de una toxina quimérica que comprende la protoxina se deriva de una toxina de la proteína Cry1Ab.

Cualquier persona experta en esta técnica apreciará que las toxinas Bt, incluso dentro de una cierta clase tal como Cry1F, variarán en cierta medida en longitud y en la ubicación precisa de la transición desde la porción de la toxina del núcleo a la porción de la protoxina. Típicamente, las toxinas Cry1Ca y Cry1Fa tienen una longitud de aproximadamente 1150 a aproximadamente 1200 aminoácidos. La transición de la parte de la toxina del núcleo a la porción de protoxina típicamente ocurrirá entre aproximadamente el 50% y aproximadamente el 60% de la toxina de longitud completa. La toxina quimérica de la presente invención incluirá la extensión completa de esta porción de toxina nuclear N-terminal. De este modo, la toxina quimérica comprenderá al menos aproximadamente el 50% de toda la longitud de la proteína de la toxina Bt de Cry1Fa o al menos aproximadamente el 50% de la longitud total de la proteína de la toxina Bt de Cry1Ca. Esto será típicamente al menos aproximadamente 590 aminoácidos. Con respecto a la porción de protoxina, la extensión total de la porción de protoxina de Cry1Ab se extiende desde el extremo de la porción de toxina de núcleo hasta el extremo C de la molécula.

Genes y toxinas. Los genes y las toxinas útiles de acuerdo con la presente invención incluyen no sólo las secuencias de longitud completa descritas, sino también los fragmentos de estas secuencias, variantes, mutantes y proteínas de fusión que retienen la actividad pesticida característica de las toxinas específicamente ejemplificada en la presente memoria. Como se usa en la presente memoria, los términos "variantes" o "variaciones" de genes se refieren a secuencias de nucleótidos que codifican las mismas toxinas o que codifican toxinas equivalentes que tienen actividad pesticida. Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "toxinas equivalentes" se refiere a toxinas que tienen la misma actividad biológica o esencialmente la misma contra las plagas diana como las toxinas reivindicadas.

Tal como se usa en el presente documento, los límites representan aproximadamente el 95% (Cry1Fa y 1Ca), 78% (Cry1F y Cry1C), y 45% (Cry1) de identidad de secuencia, por "Revision of the Nomenclature for the Bacillus thuringiensis Pesticidal Crystal Proteins", N. Crickmore, D.R. Zeigler, J. Feitelson, E. Schnepf, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum y D.H. Dean. Microbiology and Molecular Biology Reviews (1998) Vol. 62: 807 - 813. Estos cortes también se pueden aplicar a las toxinas del núcleo solamente (para las toxinas Cry1F y Cry1C).

Debe ser evidente para cualquier persona experta en esta técnica que los genes que codifican las toxinas activas pueden ser identificados y obtenidos a través de varios medios. Los genes o porciones de genes específicos ejemplificados en este documento pueden obtenerse a partir de los aislamientos depositados en un depósito de cultivo. Estos genes, o porciones o variantes de los mismos, también pueden construirse sintéticamente, por ejemplo, mediante el uso de un sintetizador de genes. Las variaciones de genes pueden construirse fácilmente utilizando técnicas estándar para realizar mutaciones puntuales. Además, pueden hacerse fragmentos de estos genes utilizando exonucleasas o endonucleasas comercialmente disponibles según procedimientos estándar. Por ejemplo, pueden usarse enzimas tales como Bal31 o mutagénesis dirigida al sitio para cortar sistemáticamente los nucleótidos de los extremos de estos genes. Los genes que codifican fragmentos activos también se pueden obtener usando una variedad de enzimas de restricción. Las proteasas pueden usarse para obtener directamente fragmentos activos de estas toxinas proteicas.

Los fragmentos y equivalentes que retienen la actividad plaguicida de las toxinas ejemplificadas estarían dentro del alcance de la presente invención. Además, debido a la redundancia del código genético, una variedad de diferentes secuencias de ADN pueden codificar las secuencias de aminoácidos descritas en la presente memoria. Está dentro de la habilidad de cualquier persona entrenada en la técnica crear estas secuencias de ADN alternativas que codifican las mismas, o esencialmente las mismas, toxinas. Estas secuencias de ADN variantes están dentro del alcance de la presente invención. Como se usa en este documento, la referencia a la secuencia "esencialmente igual" se refiere a secuencias que tienen sustituciones, deleciones, adiciones o inserciones de aminoácidos que no afectan materialmente a la actividad pesticida. También se incluyen en esta definición fragmentos de genes que codifican proteínas que retienen actividad pesticida.

Un método adicional para identificar los genes que codifican las toxinas y partes de genes útiles de acuerdo con la presente invención es mediante el uso de sondas de oligonucleótidos. Estas sondas son secuencias de nucleótidos detectables. Estas secuencias pueden ser detectables en virtud de un marcador apropiado o pueden hacerse inherentemente fluorescentes como se describe en la Solicitud Internacional No. WO93/16094. Como es bien conocido en la técnica, si la molécula sonda y la muestra de ácido nucleico se hibridan formando una fuerte unión entre las dos moléculas, puede suponerse razonablemente que la sonda y la muestra tienen homología sustancial. Preferiblemente, la hibridación se lleva a cabo bajo condiciones rigurosas mediante técnicas bien conocidas en la técnica, como se describe, por ejemplo, en Keller, G. H, M. M. Manak (1987) DNA Probes, Stockton Press, New York, N.Y., pp. 169-170. Algunos ejemplos de concentraciones de sales y combinaciones de temperaturas son los siguientes (en orden creciente de rigurosidad): 2X SSPE o SSC a temperatura ambiente; 1X SSPE o SSC a 42°C; 0,1X SSPE o SSC a 42°C; 0,1X SSPE o SSC a 65°C. La detección de la sonda proporciona un medio para determinar de una manera conocida si ha ocurrido la hibridación. Tal análisis de sonda proporciona un método rápido para identificar genes que codifican la toxina de la presente invención. Los segmentos de nucleótidos que se utilizan como sondas de acuerdo con la invención se pueden sintetizar usando un sintetizador de ADN y procedimientos estándar. Estas secuencias de nucleótidos también se pueden usar como cebadores de PCR para amplificar los genes de la presente invención.

Toxinas variantes. Ciertas toxinas de la presente invención se han ejemplificado específicamente en la presente memoria. Dado que estas toxinas son meramente ejemplares de las toxinas de la presente invención, debería ser fácilmente evidente que la presente invención comprende toxinas variantes o equivalentes (y secuencias de nucleótidos que codifican toxinas equivalentes) que tienen la misma actividad pesticida o similar de la toxina ejemplificada. Las toxinas equivalentes tendrán una homología de aminoácidos con una toxina ejemplificada. Esta homología de aminoácidos será típicamente mayor que 75%, preferiblemente mayor que 90% y más preferiblemente mayor que 95%. La homología de aminoácidos será la mayor en regiones críticas de la toxina que representan la actividad biológica o están implicadas en la determinación de la configuración tridimensional que en última instancia es la responsable de la actividad biológica. A este respecto, ciertas sustituciones de aminoácidos son aceptables y pueden esperarse si estas sustituciones están en regiones que no son críticas para la actividad o son sustituciones conservativas de aminoácidos que no afectan a la configuración tridimensional de la molécula. Por ejemplo, los aminoácidos se pueden colocar en las siguientes clases: no polares, polares no cargados, básicos y ácidos. Las sustituciones conservadoras por las que un aminoácido de una clase se sustituye por otro aminoácido del mismo tipo caen dentro del alcance de la presente invención siempre y cuando la sustitución no altere materialmente la actividad biológica del compuesto. La Tabla 1 proporciona una lista de ejemplos de aminoácidos pertenecientes a cada clase.

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

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

Huéspedes recombinantes. Los genes que codifican las toxinas de la presente invención se pueden introducir en una amplia variedad de huéspedes microbianos o vegetales. La expresión del gen de la toxina resulta, directa o indirectamente, en la producción y mantenimiento intracelular del plaguicida. La transferencia conjugada y la transferencia recombinante se pueden usar para crear una cepa Bt que exprese ambas toxinas de la presente invención. Otros organismos huésped también pueden ser transformados con uno o ambos de los genes de la toxina usados entonces para lograr el efecto sinérgico. Con huéspedes microbianos adecuados, por ejemplo, *Pseudomonas*, los microbios se pueden aplicar al sitio de la plaga, donde proliferarán y se ingerirán. El resultado es el control de la plaga. Alternativamente, el microbio que aloja el gen de la toxina puede ser tratado bajo condiciones que prolongan la actividad de la toxina y estabilizan la célula. La célula tratada, que retiene la actividad tóxica, puede aplicarse entonces al medio ambiente de la plaga diana.

Cuando el gen de la toxina Bt se introduce a través de un vector adecuado en un huésped microbiano, y dicho huésped se aplica al medio ambiente en un estado vivo, es esencial que se utilicen ciertos microbios huéspedes. Se seleccionan huéspedes de microorganismos que se sabe que ocupan la "fitosfera" (filoplano, filosfera, rizósfera y/o rizoplano) de uno o más cultivos de interés. Estos microorganismos se seleccionan de manera que sean capaces de competir exitosamente en el entorno particular (cultivo y otros hábitats de insecto) con los microorganismos de tipo salvaje, proporcionar un mantenimiento estable y la expresión del gen que expresa el plaguicida polipeptídico, y, deseablemente, proporcionar una mejor protección del plaguicida frente a la degradación e inactivación del medio ambiente.

Se sabe que un gran número de microorganismos habitan el filoplano (la superficie de las hojas de la planta) y/o la rizosfera (el suelo que rodea las raíces de las plantas) de una amplia variedad de cultivos importantes. Estos microorganismos incluyen bacterias, algas y hongos. De particular interés son microorganismos, tales como bacterias, por ejemplo, los géneros *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Serratia*, *Klebsiella*, *Xanthomonas*, *Streptomyces*, *Rhizobium*, *Rhodopseudomonas*, *Methylophilus*, *Agrobacterium*, *Acetobacter*, *Lactobacillus*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Leuconostoc* y *Alcaligenes*; hongos, particularmente levaduras, por ejemplo, los géneros *Saccharomyces*, *Cryptococcus*, *Kluyveromyces*, *Sporobolomyces*, *Rhodotorula* y *Aureobasidium*. Son de particular interés las especies bacterianas de fitosfera tales como *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas fluorescens*, *Serratia marcescens*, *Acetobacter xylinum*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Rhodopseudomonas spheroides*, *Xanthomonas campestris*, *Rhizobium melioli*, *Alcaligenes entrophus* y *Azotobacter vinlandii*; y especies de levaduras de fitosfera tales como *Rhodotorula rubra*, *R. glutinis*, *R. marina*, *R. aurantiaca*, *Cryptococcus albidus*, *C. diffluens*, *C. laurentii*, *Saccharomyces rosei*, *S. pretoriensis*, *S. cerevisiae*, *Sporobolomyces roseus*, *S. odoratus*, *Kluyveromyces veronae* y *Aureobasidium pullulans*. De particular interés son los microorganismos pigmentados.

Está disponible una amplia variedad de métodos para introducir un gen Bt que codifica una toxina en un huésped de microorganismo en condiciones que permitan el mantenimiento estable y la expresión del gen. Estos métodos son bien conocidos por los expertos en la técnica y se describen, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos N° 5.135.867.

Tratamiento de las células. *Bacillus thuringiensis* o células recombinantes que expresan las toxinas Bt pueden tratarse para prolongar la actividad de la toxina y estabilizar la célula. La microcápsula de pesticida que se forma comprende la toxina Bt o toxinas dentro de una estructura celular que se ha estabilizado y protegerá la toxina cuando la microcápsula se aplica al entorno de la plaga diana. Las células huésped adecuadas pueden incluir procariotas o eucariotas, estando normalmente limitadas a aquellas células que no producen sustancias tóxicas para organismos superiores, tales como mamíferos. Sin embargo, podrían utilizarse organismos que producen sustancias tóxicas para organismos superiores, donde las sustancias tóxicas son inestables o el nivel de aplicación es suficientemente bajo como para evitar cualquier posibilidad de toxicidad para un huésped mamífero. Como anfitriones, de particular interés serán los procariotas y los eucariotas inferiores, tales como los hongos.

La célula normalmente estará intacta y estará sustancialmente en la forma proliferativa cuando se trata, en lugar de en forma de esporas, aunque en algunos casos pueden emplearse esporas.

El tratamiento de la célula microbiana, por ejemplo, un microbio que contiene el gen o los genes de la toxina B.t. pueden ser por medios químicos o físicos, o por una combinación de medios químicos y/o físicos, siempre y cuando la técnica no afecte negativamente a las propiedades de la toxina, ni disminuya la capacidad celular de proteger la toxina. Ejemplos de reactivos químicos son agentes halogenantes, particularmente halógenos del número atómico 17-80. Más particularmente, se puede usar yodo en condiciones suaves y durante un tiempo suficiente para conseguir los resultados deseados. Otras técnicas adecuadas incluyen el tratamiento con aldehídos, tales como glutaraldehído; anti-infecciosos, tales como cloruro de zefirano y cloruro de cetilpiridinio; alcoholes, tales como isopropilo y etanol; varios fijadores histológicos, tales como lugol yodo, fijador de Bouin, diversos ácidos y fijador de Helly (véase: Humason, Gretchen L., *Animal Tissue Techniques*, W. H. Freeman and Company, 1967); o una combinación de agentes físicos (calor) y químicos que preservan y prolongan la actividad de la toxina producida en la célula cuando la célula se administra al medio huésped. Los ejemplos de medios físicos son radiación de longitud de onda corta, tal como la radiación gamma y radiación X, congelación, irradiación UV, liofilización y similares. Los

métodos para el tratamiento de células microbianas se describen en las Patentes de EE.UU. Números 4.695.455 y 4.695.462

5 Las células generalmente tendrán una estabilidad estructural mejorada que aumentará la resistencia a las condiciones ambientales. Cuando el plaguicida está en una proforma, el método de tratamiento celular debe seleccionarse de manera que no inhiba el procesamiento de la proforma a la forma madura del plaguicida por el patógeno de plaga diana. Por ejemplo, el formaldehído reticulará las proteínas y podría inhibir el procesamiento de la proforma de un plaguicida polipeptídico. El método de tratamiento debe retener al menos una porción sustancial de la biodisponibilidad o bioactividad de la toxina.

10 Las características de particular interés en la selección de una célula huésped con fines de producción incluyen la facilidad de introducción del gen o genes B.t. en el huésped, la disponibilidad de sistemas de expresión, la eficiencia de expresión, la estabilidad del plaguicida en el huésped y la presencia de capacidades genéticas auxiliares. Las características de interés para su uso como microcápsula de pesticida incluyen cualidades protectoras para el pesticida, tales como paredes celulares gruesas, pigmentación y empaquetado intracelular o formación de cuerpos de inclusión; supervivencia en ambientes acuosos; falta de toxicidad de los mamíferos; atractivo para las plagas por ingestión; facilidad de matar y fijar sin dañar la toxina; y similares. Otras consideraciones incluyen la facilidad de formulación y manipulación, economía, estabilidad al almacenamiento, y similares.

15 Crecimiento de células. El huésped celular que contiene el gen o genes B.t. insecticidas se puede cultivar en cualquier medio nutriente conveniente, donde la construcción de ADN proporciona una ventaja selectiva, proporcionando un medio selectivo de manera que sustancialmente todas, o todas, las células retengan al gen B.t. Estas células pueden ser luego cosechadas de acuerdo con los procedimientos convencionales. Alternativamente, las células pueden ser tratadas antes de la cosecha.

20 Las células B.t. que producen las toxinas de la invención se pueden cultivar usando técnicas de fermentación y medios de la técnica estándar. Una vez completado el ciclo de fermentación, las bacterias se pueden cosechar separando primero las esporas B.t. y los cristales del caldo de fermentación por medios bien conocidos en la técnica. Las esporas y cristales B.t. recuperadas se pueden formular en un polvo humectable, concentrado líquido, gránulos u otras formulaciones mediante la adición de tensioactivos, dispersantes, vehículos inertes y otros componentes para facilitar el manejo y la aplicación de plagas particulares. Estas formulaciones y procedimientos de aplicación son bien conocidos en la técnica.

25 Formulaciones. Gránulos de cebo formulados que contienen un atrayente y esporas, cristales y toxinas de los aislamientos B.t. o microbios recombinantes que comprenden los genes obtenibles a partir de los aislados B.t. descritos en este documento, se pueden aplicar al suelo. El producto formulado también se puede aplicar como tratamiento de recubrimiento de semillas o de raíz o como tratamiento total de la planta en etapas posteriores del ciclo del cultivo. Los tratamientos de plantas y suelos de células B.t. se pueden emplear como polvos humectables, gránulos o polvos, mezclando con diversos materiales inertes, tales como minerales inorgánicos (filosilicatos, carbonatos, sulfatos, fosfatos y similares) o materiales botánicos (mazorcas de maíz en polvo, cáscaras de arroz, cáscaras de nuez y similares). Las formulaciones pueden incluir adyuvantes de adhesivo separador, agentes estabilizantes, otros aditivos pesticidas o tensioactivos. Las formulaciones líquidas pueden ser acuosas o no acuosas y emplearse como espumas, geles, suspensiones, concentrados emulsionables o similares. Los ingredientes pueden incluir agentes reológicos, tensioactivos, emulsionantes, dispersantes o polímeros.

30 Como apreciaría cualquier experto en la materia, la concentración de pesticida variará ampliamente dependiendo de la naturaleza de la formulación particular, particularmente si es un concentrado o se usa directamente. El plaguicida estará presente en al menos 1% en peso y puede ser 100% en peso. Las formulaciones secas tendrán de aproximadamente 1-95% en peso del plaguicida mientras que las formulaciones líquidas serán generalmente de aproximadamente 1 - 60% en peso de los sólidos en la fase líquida. Las formulaciones tendrán generalmente de aproximadamente 10^2 a aproximadamente 10^4 células/mg. Estas formulaciones se administrarán a aproximadamente 50 mg (líquido o seco) a 1 kg o más por hectárea.

Las formulaciones se pueden aplicar al medio ambiente de la plaga de lepidópteros, por ejemplo, follaje o suelo, por vaporización, pulverización, aspersión o similares.

35 Transformación de plantas. Un huésped recombinante preferido para la producción de las proteínas insecticidas de la presente invención es una planta transformada. Los genes que codifican proteínas de toxina Bt, como se describe en este documento, se pueden insertar en células vegetales usando una variedad de técnicas que son bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, un gran número de vectores de clonación que comprenden un sistema de replicación en *Escherichia coli* y un marcador que permite la selección de las células transformadas están disponibles para la preparación para la inserción de genes extraños en plantas superiores. Los vectores comprenden, por ejemplo, pBR322, serie pUC, serie M13mp, pACYC184, entre otros. Por consiguiente, el fragmento de ADN que tiene la secuencia que codifica la proteína de la toxina Bt puede insertarse en el vector en un sitio de restricción adecuado. El plásmido resultante se utiliza para la transformación en *E. coli*. Las células de *E. coli* se cultivan en un medio nutriente adecuado, después se recogen y se lisan. Se recupera el plásmido. El análisis de secuencias, el análisis de restricción, la electroforesis y otros métodos bioquímicos y biológicos moleculares se

llevan a cabo generalmente como métodos de análisis. Después de cada manipulación, la secuencia de ADN utilizada puede escindirse y unirse a la siguiente secuencia de ADN. Cada secuencia de plásmido puede clonarse en el mismo plásmido o en otros plásmidos. Dependiendo del método de inserción de genes deseados en la planta, pueden ser necesarias otras secuencias de ADN. Si, por ejemplo, se usa el plásmido Ti o Ri para la transformación de la célula vegetal, entonces se debe unir como mínimo el borde derecho, pero a menudo el borde derecho e izquierdo del T-ADN del plásmido Ti o Ri, como la región flanqueante de los genes a insertar. El uso de T-ADN para la transformación de células de planta ha sido intensamente investigado y suficientemente descrito en el documento EP 120 516, Lee y Gelvin (2008), Hoekema (1985), Fraley et al., (1986) y An et al., (1985), y está bien establecido en la técnica.

Una vez que el ADN insertado ha sido integrado en el genoma de la planta, éste es relativamente estable. El vector de transformación contiene normalmente un marcador seleccionable que confiere la resistencia en las células vegetales transformadas a un antibiótico, tal como Bialaphos, Kanamicina, G418, Bleomicina, o Higromicina, entre otros. Por lo tanto, el marcador empleado individualmente debería permitir la selección de células transformadas en lugar de células que no contienen el ADN insertado.

Se dispone de un gran número de técnicas para insertar ADN en una célula huésped vegetal. Esas técnicas incluyen la transformación con T-DNA usando *Agrobacterium tumefaciens* o *Agrobacterium rhizogenes* como agente de transformación, fusión, inyección, biolística (bombardeo de micropartículas), o electroporación, así como otros métodos posibles. Si se utilizan agrobacterias para la transformación, el ADN a insertar tiene que ser clonado en plásmidos especiales, a saber, ya sea en un vector intermedio o en un vector binario. Los vectores intermedios se pueden integrar en el plásmido Ti o Ri por recombinación de homólogos debido a secuencias que son homólogas a las secuencias en el T-DNA. El plásmido Ti o Ri también comprende la región vir necesaria para la transferencia del T-DNA.

Los vectores intermedios no pueden replicarse en *Agrobacteria*. El vector intermedio puede transferirse a *Agrobacterium tumefaciens* por medio de un plásmido auxiliar (conjugación). Los vectores binarios pueden replicarse ellos mismos tanto en *E. coli* como en *Agrobacteria*. Comprenden un gen marcador de selección y un enlazador o polienlazador que están enmarcados por las regiones frontera derecha e izquierda del ADN-T. Pueden transformarse directamente en *Agrobacteria* (Holsters et al., 1978). El *Agrobacterium* usado como célula huésped comprende un plásmido que lleva una región vir. La región vir es necesaria para la transferencia del T-DNA a la célula de planta. Puede contener T-DNA adicional. La bacteria así transformada se utiliza para la transformación de células de planta. Los explantes de plantas se pueden cultivar ventajosamente con *Agrobacterium tumefaciens* o *Agrobacterium rhizogenes* para la transferencia del ADN a la célula de planta. Las plantas enteras pueden entonces regenerarse a partir del material vegetal infectado (por ejemplo, trozos de hoja, segmentos de tallo, raíces, pero también protoplastos o células cultivadas en suspensión) en un medio adecuado, que puede contener antibióticos o biocidas para la selección. Las plantas así obtenidas pueden entonces ser ensayadas en cuanto a la presencia del ADN insertado. No se hacen demandas especiales de los plásmidos en el caso de la inyección y la electroporación. Es posible utilizar plásmidos ordinarios, tales como, por ejemplo, derivados de pUC.

Las células transformadas crecen dentro de las plantas de la manera usual. Pueden formar células germinales y transmitir el(los) rasgo(s) transformado(s) a las plantas progenie. Tales plantas pueden crecer de la manera normal y cruzarse con plantas que tienen los mismos factores hereditarios transformados u otros factores hereditarios. Los individuos híbridos resultantes tienen las propiedades fenotípicas correspondientes.

En una realización preferida de la presente invención, las plantas se transformarán con genes en los que se ha optimizado el uso de codones para plantas. Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 5.380.831. Aunque algunas toxinas truncadas se ejemplifican en la presente memoria, es bien conocido en la técnica de Bt que las toxinas de tipo 130 kDa (de longitud completa) tienen una mitad N-terminal que es la toxina nuclear y una mitad C-terminal que es la protoxina "cola". De este modo, se pueden usar "colas" apropiadas con toxinas truncadas/nucleares de la presente invención. Véase p. ej. la Patente de Estados Unidos N° 6.218.188 y la Patente de Estados Unidos N° 6.673.990. Además, se conocen en la técnica métodos para crear genes Bt sintéticos para uso en plantas (Stewart y Burgin, 2007). Un ejemplo no limitativo de una planta transformada preferida es una planta de maíz fértil que comprende un gen expresable en planta que codifica una proteína Cry1Fa, y que comprende además un segundo gen expresable en planta que codifica una proteína Cry1Ca.

La transferencia (o introgresión) del rasgo o de los rasgos determinados por Cry1Fa- y Cry1Ca en líneas de maíz consanguíneas puede lograrse mediante la reproducción recurrente por selección, por ejemplo mediante retrocruzamiento. En este caso, un progenitor recurrente deseado se cruza primero con un donante endogámico (el progenitor no recurrente) que lleva el gen(es) apropiado(s) para Cry1F- y Cry1C. La progenie de este cruce se vuelve a acoplar entonces al progenitor recurrente seguido por la selección en la progenie resultante para el/los rasgo(s) deseado(s) a ser transferidos del progenitor no recurrente. Después de tres, preferiblemente cuatro, más preferiblemente cinco o más generaciones de retrocruzamientos con el progenitor recurrente con selección para el/los rasgo(s) deseado(s), la progenie será heterocigótica para los loci que controlan el/los rasgo/s que se transfieren, pero será como el progenitor recurrente para la mayoría o casi todos los otros genes (véase, por ejemplo, Poehlman & Sleper (1995) *Breeding Field Crops*, 4th Ed., 172-175; Fehr (1987) *Principles of Cultivar Development*, Vol. 1: Theory and Technique, 360 - 376).

Estrategias de Manejo de la Resistencia de Insectos (IRM). Roush et al., por ejemplo, describen las estrategias de dos toxinas, también llamadas "pirámides" o "pilas", para el manejo de cultivos transgénicos insecticidas. (The Royal Society. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. (1998) 353, 1777 - 1786).

5 En su sitio web, la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (epa.gov/oppbpd1/biopesticides/pips/bt_corn_refuge_2006.htm) publica los siguientes requisitos para proporcionar refugios no transgénicos (es decir, no B.t.) (una sección o bloque de cultivos no Bt/maíz) para uso con cultivos transgénicos que producen una única proteína Bt activa contra plagas diana.

"Los requisitos estructurados específicos para los productos de maíz Bt (Cry1Ab o Cry IF) protegidos por el barrenador del maíz son los siguientes:

10 Refugios estructurados: 20% de refugio de maíz Bt no Lepidóptero en el Cinturón de Maíz;
50% de refugio Bt no Lepidóptero en Cinturón de Algodón

Bloques

Internos (es decir, dentro del campo Bt)

15 Externos (es decir, campos separados dentro de 1/2 milla (1/4 de milla si es posible) del campo Bt para maximizar el acoplamiento al azar)

Franjas en el campo

Las franjas deben tener al menos 4 filas de ancho (preferiblemente 6 filas) para reducir los efectos del movimiento larvario"

Además, la Asociación Nacional de Productores de Maíz, en su sitio web:

20 (ncga.com/insect-resistance-management-fact-sheet-bt-corn)

también proporciona una orientación similar con respecto a los requisitos de refugio. Por ejemplo:

"Requisitos del IRM del barrenador del maíz:

-Plantar al menos el 20% de sus acres de maíz para refugiar híbridos

-En las regiones productoras de algodón, el refugio debe ser del 50%

25 -Debe ser sembrado dentro de 1/2 milla de los híbridos de refugio

-El refugio se puede plantar como franjas dentro del campo Bt; las franjas de refugio deben tener al menos 4 filas de ancho

-El refugio pueden tratarse con plaguicidas convencionales sólo si se alcanzan los umbrales económicos para los insectos objetivo

30 -Los insecticidas pulverizables basados en Bt no se pueden usar en el maíz de refugio

-Debe plantarse un refugio adecuado en todas las fincas con maíz Bt"

35 Como lo indican Roush et al. (por ejemplo, en las columnas de la derecha de las páginas 1780 y 1784), el apilamiento o pirámide de dos proteínas diferentes cada una eficaz contra las plagas diana y con poca o ninguna resistencia cruzada puede permitir el uso de un refugio más pequeño. Roush sugiere que para una pila exitosa, un refugio de tamaño menor del 10% de refugio, puede proporcionar un manejo de resistencia comparable a un 50% de refugio para un rasgo único (no piramidal). Para los productos de maíz Bt piramidales actualmente disponibles, la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos requiere que se deposite significativamente menos refugio estructurado (generalmente 5%) de maíz no Bt que para productos de un solo rasgo (generalmente 20%).

40 Existen varias maneras de proporcionar los efectos IRM de un refugio, incluyendo varios patrones de siembra geométricos en los campos (como se mencionó anteriormente) y mezclas de semillas dentro de bolsa, como se describe más adelante por Roush et al. (supra) y la Patente de Estados Unidos N° 6.551.962.

45 Los porcentajes anteriores, o relaciones de refugio similares, se pueden usar para las pilas o pirámides dobles o triples objeto. Para las pilas triples con tres modos de acción contra una única plaga objetivo, un objetivo sería cero refugio (o menos del 5% de refugio, por ejemplo). Esto es particularmente cierto para la superficie comercial - de más de 10 acres por ejemplo.

Los siguientes son ejemplos que ilustran procedimientos para practicar la invención. Estos ejemplos no deben

interpretarse como limitantes. Todos los porcentajes son en peso y todas las proporciones de la mezcla de disolventes son en volumen a menos que se indique lo contrario. Todas las temperaturas están en grados Celsius.

A menos que se indique específicamente o se implique, los términos "un", "uno/a", y "el/ella" significan "al menos uno" tal como se utiliza en este documento.

5 Ejemplo 1. Diseño de toxinas nucleares Cry1Ca quiméricas y protoxinas Cry1Ab

Toxinas quiméricas. Se han mostrado previamente proteínas quiméricas que utilizan el dominio de toxina nuclear de una toxina Cry fusionada al segmento de protoxina de otra toxina Cry, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos N° 5593881 y la Patente de Estados Unidos N° 5932209. Se deposita una secuencia de proteína de endotoxina delta Cry1Ca3 como el número de entrada del GenBank AAA22343 bajo una terminología obsoleta de CryIc(b).

10 Las variantes de proteína quimérica Cry1Ca de esta invención incluyen toxinas quiméricas que comprenden un segmento de toxina nuclear N-terminal derivado de una toxina insecticida Cry1Ca3 fusionada a un segmento de protoxina de endotoxina delta heteróloga en algún punto más allá del final del segmento de toxina nuclear. La transición de la toxina nuclear al segmento de protoxina heteróloga puede ocurrir aproximadamente en la unión nativa de toxina nuclear/protoxina o, en la alternativa, se puede retener una porción de la protoxina nativa (que se
15 extiende más allá del segmento de toxina nuclear), con la transición a la protoxina heteróloga que ocurre aguas abajo. De forma variante, los segmentos de toxina nuclear y protoxina pueden comprender exactamente la secuencia de aminoácidos de las toxinas nativas de las que se derivan, o pueden incluir adiciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos que no disminuyen, y que pueden potenciar la función biológica de los segmentos cuando se fusionan entre sí.

20 Por ejemplo, una toxina quimérica de la presente invención comprende un segmento de toxina nuclear derivado de Cry1Ca3 y una protoxina heteróloga. En una realización preferida de la invención, el segmento de toxina nuclear derivado de Cry1Ca3 (619 aminoácidos) se fusiona a un segmento heterólogo que comprende un segmento de protoxina derivado de una delta-endotoxina Cry1Ab (545 aminoácidos). La secuencia de aminoácidos de 1164 de la proteína quimérica, denominada en este documento DIG-152, se describe como SEQ ID NO: 1. Una segunda
25 realización preferida de la invención comprende una proteína quimérica en la que el segmento de toxina nuclear Cry1Ca (619 aminoácidos) se une a un segundo segmento de protoxina de 545 aminoácidos derivado de Cry1Ab. La secuencia de 1164 aminoácidos de la segunda proteína quimérica, denominada DIG-109, se describe como SEQ ID NO: 2 (versión optimizada de maíz). Debe entenderse que otras fusiones quiméricas que comprenden variantes de toxina nuclear de Cry1Ca y protoxinas derivadas de Cry1Ab están dentro del alcance de esta invención.

30 Se observa que las proteínas quiméricas DIG-152 y DIG-109 son esencialmente equivalentes funcionales entre sí, difiriendo en secuencia solo en una posición única (aminoácido 620, que une el segmento de toxina nuclear Cry1Ca con el segmento de protoxina Cry1Ab).

Ejemplo 2

35 Construcción de plásmidos de expresión que codifican proteínas quiméricas nuclear Cry1Ca/de protoxina Cry1Ab y expresión en *Pseudomonas*

Los métodos de clonación estándar (como se describe, por ejemplo, en Sambrook et al., (1989) y Ausubel et al., (1995) y actualizaciones de los mismos) se usaron en la construcción del constructo de expresión pMYC2547 de *Pseudomonas fluorescens* (Pf) diseñado para producir una proteína quimérica DIG-152 de longitud completa (como se describe en la SEQ ID NO: 1). La producción de proteína se realizó en la cepa MB214 de *Pseudomonas fluorescens* (un derivado de la cepa MB101; biovar I de *P. fluorescens*), que tiene una inserción de un operón lac modificado como se describe en la patente de Estados Unidos N° 5169760. La estrategia de clonación básica implicaba la subclonación de un fragmento de ADN que codifica DIG-152 en vectores plasmídicos, por lo que se
40 coloca bajo el control de expresión del promotor Ptac y el terminador rrnBT1T2 del plásmido pKK223-3 (PL Pharmacia, Milwaukee, WI). Uno de tales plásmidos se denominó pMYC2547, y el aislado MB214 que alberga este plásmido se denomina Dpf108.

Análisis del crecimiento y la expresión en matraces agitados. La producción de la proteína DIG-152 para la caracterización y el bioensayo de insectos se realizó mediante la cepa Dpf108 de *P. fluorescens*, crecida en matraz. La producción de proteína DIG-152 impulsada por el promotor Ptac se realizó como se describió previamente en la Patente de Estados Unidos N° 5527883. Los detalles de las manipulaciones microbiológicas están disponibles en
50 Squires et al., (2004), Solicitud de Patente de Estados Unidos 20060008877, Solicitud de Patente de Estados Unidos 20080193974 y Solicitud de Patente de Estados Unidos 20080058262. La expresión se indujo mediante la adición de isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) después de una incubación inicial de 24 horas a 30°C con agitación. Se tomaron muestras de los cultivos en el momento de la inducción y en varios momentos después de la inducción. La densidad celular se midió por densidad óptica a 600 nm (OD₆₀₀).

55 Fraccionamiento de células y Análisis SDS-PAGE de las muestras de los matraces agitados. En cada tiempo de muestreo, la densidad celular de las muestras se ajustó a OD₆₀₀ = 20 y se centrifugaron alícuotas de 1 ml a 14000 x g durante cinco minutos. Los sedimentos celulares se congelaron a -80°C. Se generaron fracciones solubles e

insolubles de muestras de sedimentos de células del matraz agitado congeladas usando la Solución de Extracción de Proteína Bacteriana EasyLyse™ (EPICENTRE® Biotechnologies, Madison, WI). Cada sedimento celular se resuspendió en 1 ml de solución EasyLyse™ y se diluyó adicionalmente 1:4 en tampón de lisis y se incubó con agitación a temperatura ambiente durante 30 minutos. El lisado se centrifugó a 14.000 rpm durante 20 minutos a 4°C y el sobrenadante se recuperó como la fracción soluble. El sedimento (fracción insoluble) se resuspendió luego en un volumen igual de solución salina tamponada con fosfato (PBS; Na₂HPO₄ 11,9 mM, NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, pH 7,4).

Las muestras se mezclaron 1:1 con tampón de muestra Laemmli 2X que contenía β-mercaptoetanol (Sambrook et al., Supra) y se hirvieron durante 5 minutos antes de la carga en geles Criterion XT Bis-Tris al 12% (Bio-Rad Inc., Hercules, CA). La electroforesis se realizó en el tampón XT MOPS recomendado. Los geles se tiñeron con Bio-Safe Coomassie Stain de acuerdo con el protocolo del fabricante (Bio-Rad) y se obtuvieron imágenes usando el sistema Alpha Innotech Imaging (San Leandro, CA).

Preparación del cuerpo de inclusión. Las preparaciones del cuerpo de inclusión de proteína DIG-152 (IB) se realizaron en células de fermentaciones de *P. fluorescens* que producían proteína insecticida Bt insoluble, como se demostró mediante SDS-PAGE y MALDI-MS (espectrometría de masa de desorción/ionización láser asistida por matriz). Los gránulos de fermentación de *P. fluorescens* se descongelaron en un baño maría a 37°C. Las células se resuspendieron al 25% p/v en tampón de lisis [Tris 50 mM, pH 7,5, NaCl 200 mM, sal disódica EDTA 20 mM (ácido etilendiaminotetraacético), Triton X-100 al 1% y ditiotreitilo 5 mM (DTT)]; se añadieron 5 ml/l de cóctel de inhibidor de proteasa bacteriano (catálogo n° P8465; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) justo antes de su uso]. Las células se suspendieron usando un homogeneizador de mano al ajuste más bajo (Tissue Tearor, BioSpec Products, Inc., Bartlesville, OK). Se añadió lisozima (25 mg de Sigma L7651, de clara de huevo de gallina) a la suspensión celular mediante mezcla con una espátula de metal, y la suspensión se incubó a temperatura ambiente durante una hora. La suspensión se enfrió en hielo durante 15 minutos, luego se sonicó usando un Branson Sonifier 250 (dos sesiones de 1 minuto, con un ciclo de trabajo del 50%, rendimiento del 30%). La lisis celular se verificó por microscopía. Se añadieron 25 mg adicionales de lisozima si fue necesario, y se repitieron la incubación y la sonicación. Tras la confirmación de la lisis celular por microscopía, el lisado se centrifugó a 11.500 x g durante 25 minutos (4°C) para formar el sedimento de IB, y el sobrenadante se descartó. El sedimento de IB se resuspendió con 100 ml de tampón de lisis, se homogeneizó con el mezclador manual y se centrifugó como anteriormente. El sedimento de IB se lavó repetidamente mediante resuspensión (en 50 ml de tampón de lisis), homogeneización, sonicación y centrifugación hasta que el sobrenadante se volvió incoloro y el sedimento de IB se volvió firme y de color blanquecino. Para el lavado final, el sedimento de IB se resuspendió en agua destilada filtrada estéril (0,22 μm) que contenía EDTA 2 mM y se centrifugó. El sedimento final se resuspendió en agua destilada filtrada estéril que contenía EDTA 2 mM y se almacenó en alícuotas de 1 ml a -80°C.

Se realizó un análisis SDS-PAGE y se cuantificó la proteína en preparaciones de IB descongelando una alícuota de 1 ml de sedimento de IB y diluyendo 1:20 con agua destilada filtrada estéril. La muestra diluida se hirvió entonces con tampón de muestra reductor 4X [Tris 250 mM, pH 6,8, glicerol al 40% (v/v), azul de bromofenol al 0,4% (p/v), SDS al 8% (p/v) y β-mercaptoetanol al 8% (v/v)] y se cargó en un Novex® 4-20% Tris-Glicina, 12 + 2 pocillos de gel (Invitrogen) administrado con tampón 1X Tris/Glicina/SDS (BioRad). El gel se corrió durante 60 minutos a 200 voltios y luego se tiñó con azul de Coomassie (50% G-250/50% R-250 en 45% de metanol, 10% de ácido acético) y se destiñó con ácido acético al 7% y metanol al 5% en agua destilada. La cuantificación de las bandas diana se realizó comparando los valores densitométricos de las bandas con las muestras estándar de albúmina sérica bovina (BSA) pasadas en el mismo gel para generar una curva estándar.

Solubilización de cuerpos de inclusión. Se centrifugaron seis ml de suspensión de cuerpo de inclusión DIG-152 del clon DPf108 de Pf en el ajuste más alto de una microcentrífuga Eppendorf modelo 5415C (aproximadamente 14.000 x g) para sedimentar las inclusiones. El sobrenadante del tampón de almacenamiento se eliminó y se reemplazó con 25 ml de tampón de carbonato sódico 100 mM, pH 11, en un tubo cónico de 50 ml. Las inclusiones se resuspendieron usando una pipeta y se agitaron en vórtice para mezclar completamente. El tubo se colocó en una plataforma suavemente oscilante a 4°C durante la noche para extraer la proteína diana. El extracto se centrifugó a 30.000 x g durante 30 min a 4°C, y el sobrenadante resultante se concentró 5 veces usando un dispositivo de filtro centrífugo de celulosa regenerado Amicon Ultra-15 (30,000 Molecular Weight Cutoff; Millipore). El tampón de muestra se cambió después a CAPS [ácido 3-(ciclohexamino)1-propanosulfónico] 10 mM, pH 10, utilizando columnas desechables PD-10 (GE Healthcare, Piscataway, NJ).

Solubilización y activación con tripsina de la proteína del cuerpo de inclusión. En algunos casos, la suspensión del cuerpo de inclusión DIG-152 del clon DPf108 de Pf se centrifugó en la configuración más alta de una microcentrífuga Eppendorf modelo 5415C (aproximadamente 14.000 x g) para sedimentar las inclusiones. El sobrenadante del tampón de almacenamiento se eliminó y se reemplazó por CAPS 100 mM, pH 11, para proporcionar una concentración de proteína de aproximadamente 50 mg/ml. El tubo se agitó a temperatura ambiente durante tres horas para solubilizar completamente la proteína. Se añadió tripsina a una cantidad igual a de 5% a 10% (p:p, basado en el peso inicial de polvo de IB) y la digestión se realizó mediante incubación mientras se balanceaba durante la noche a 4°C u oscilando 90-120 minutos a temperatura ambiente. El material insoluble se eliminó por centrifugación a 10.000 x g durante 15 minutos, y el sobrenadante se aplicó a una columna de intercambio de aniones MonoQ (10 mm por 10 cm). La proteína DIG-152 activada se eluyó (según se determinó mediante SDS-

PAGE, véase a continuación) mediante un gradiente de NaCl de 0% a 100% en más de 25 volúmenes de columna. Las fracciones que contenían la proteína activada se combinaron y, cuando fue necesario, se concentraron a menos de 10 ml usando un dispositivo de filtro centrífugo de celulosa regenerado Amicon Ultra-15 como se indica anteriormente. El material se pasó luego a través de una columna Superdex 200 (16 mm por 60 cm) en tampón que contenía NaCl 100 mM, 10% de glicerol, 0,5% de Tween-20 y 1 mM de EDTA. Se determinó por análisis de SDS-PAGE que la proteína activada (enzimáticamente truncada) eluye a 65 a 70 ml. Las fracciones que contenían la proteína activada se combinaron y se concentraron usando el concentrador centrífugo como se indicó anteriormente.

Electroforesis de gel. Las preparaciones proteicas concentradas se prepararon para la electroforesis diluyendo 1:50 en tampón de muestra NuPAGE® LDS (Invitrogen) que contenía DTT 5 mM como agente reductor y se calentaron a 95°C durante 4 minutos. La muestra se cargó en líneas duplicadas de un 4-12% de gel NuPAGE® junto con cinco estándares de BSA que varían de 0,2 µg a 2 µg/línea (para la generación de curvas estándar). El voltaje se aplicó a 200 V usando el tampón de funcionamiento MOPS SDS (Invitrogen) hasta que el colorante de seguimiento alcanzó el fondo del gel. El gel se tiñó con Coomassie Blue G-250 al 0,2% en metanol al 45%, ácido acético al 10% y se destiñó, primero brevemente con metanol al 45%, ácido acético al 10% y luego con ácido acético al 7% y metanol al 5% hasta que el fondo se aclaró. Después de la decoloración, el gel se escaneó con BioRad Fluor-S Multilmager. El Software v.4.5.2 del instrumento Quantity One se usó para obtener volúmenes restados del fondo de las bandas de proteína teñidas y para generar la curva estándar de BSA que se usó para calcular la concentración de proteína DIG-152 química en la solución madre.

Ejemplo 3

Actividad insecticida de la proteína DIG-152 producida en *Pseudomonas fluorescens*

Se demostró la actividad insecticida de la proteína DIG-152 en larvas del cogollero del maíz (FAW, *Spodoptera frugiperda* (JE Smith)) y en larvas de FAW resistente a Cry1F (rFAW).

Preparación de la muestra y bioensayos. Las preparaciones del cuerpo de inclusión (proteína nativa de longitud completa o proteína activada por tripsina) se transfirieron a tampón CAPS 10 mM, pH10, mediante métodos de intercambio tales como columnas de diálisis o PD-10. Las muestras se diluyeron luego adecuadamente en CAPS 10 mM, pH 10, y todos los bioensayos contenían un tratamiento de control que consistía en este tampón, que sirvió como verificación de antecedentes para mortalidad o inhibición del crecimiento.

Las concentraciones de proteína en tampón de bioensayo se estimaron mediante electroforesis en gel usando BSA para crear una curva estándar para densitometría de gel, que se midió usando un sistema de formación de imágenes BioRad como se indica anteriormente. Las proteínas en la matriz de gel se tiñeron con colorante a base de azul de Coomassie y se destiñeron antes de la lectura.

Se analizaron las proteínas purificadas para determinar su actividad insecticida en bioensayos realizados con larvas de lepidópteros neonatas sobre dieta de insectos artificiales. Las larvas de FAW nacieron de huevos obtenidos de una colonia mantenida por un insectario comercial (Benzon Research Inc., Carlisle, PA). Las larvas de rFAW se incubaron de huevos cosechados de una colonia no comercial (Dow AgroSciences, Indianápolis, IN).

Los bioensayos se realizaron en bandejas de plástico de 128 pocillos diseñadas específicamente para bioensayos de insectos (C-D International, Pitman, NJ). Cada pocillo contenía 1,0 ml de dieta de Lepidoptera multiespecífica (Southland Products, Lake Village, AR). Se suministró una alícuota de 40 µl de muestra de proteína mediante una pipeta sobre la superficie de la dieta de 1,5 cm² de cada pocillo (es decir, 26,7 µl/cm²). Las concentraciones de la dieta se calcularon como la cantidad (ng) de proteína DIG-152 por centímetro cuadrado de superficie en el pocillo. Las bandejas tratadas se mantuvieron en una campana extractora hasta que el líquido en la superficie de la dieta se evaporó o se absorbió en la dieta.

En unas pocas horas de eclosión, las larvas individuales se recogieron con un cepillo de pelo de camello humedecido y se depositaron en la dieta tratada, una larva por pocillo. Los pocillos infestados se sellaron entonces con láminas adhesivas de plástico transparente, ventiladas para permitir el intercambio de gases (C-D International). Las bandejas de bioensayo se mantuvieron bajo condiciones ambientales controladas [28°C, aproximadamente 40% de humedad relativa (HR), 16 horas:8 horas (claro:oscuro)] durante 5 días, tiempo después del cual el número total de insectos expuestos a cada muestra de proteína, se registró la cantidad de insectos muertos y el peso de los insectos supervivientes. El porcentaje de mortalidad y el porcentaje de inhibición del crecimiento se calcularon para cada tratamiento. El porcentaje de inhibición del crecimiento (GI) se calculó de la siguiente manera:

$$\%GI = [1 - (TWIT/TNIT)/(TWIBC/TNIBC)] \times 100$$

donde TWIT es el peso total de los insectos en el tratamiento,

TNIT es el número total de insectos en el tratamiento

TWIBC es el peso total de los insectos en la verificación del fondo (control del tampón)

y TNIBC es el número total de insectos en la verificación del fondo (control de tampón).

Se determinó que GI_{50} era la concentración de proteína DIG-152 química en la dieta en la que el valor de % GI era 50. La LC_{50} (50% de concentración letal) se registró como la concentración de proteína DIG-152 en la dieta en la cual el 50% de los insectos de prueba fueron matados. El análisis estadístico (ANOVA de una vía) se realizó utilizando el software JMP (SAS, Cary, NC).

La Tabla 2 presenta los resultados de bioensayos de ingestión de la proteína DIG-152 en larvas de insectos del cogollero de maíz.

Tabla 2. Valores de GI_{50} y LC_{50} (en ng/cm^2) calculados a partir de una dieta de insecto cargada con proteína DIG-152.

FAW		rFAW	
GI_{50}	LC_{50}	GI_{50}	LC_{50}
38,1	2828,7	78,9	2210,9

Es una característica de la proteína DIG-152 de la presente invención que el crecimiento de las larvas recién nacidas del gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda*) se inhiba después de la ingestión de la proteína DIG-152. Además, las larvas del gusano cogollero que son resistentes a la intoxicación por Cry1Fa son tan susceptibles a la actividad DIG-152 como lo son las larvas del gusano cogollero salvaje. El significado de la susceptibilidad de estos insectos resistentes a Cry1Fa a Cry1Ca se analiza con más detalle anteriormente.

Ejemplo 4

Diseño de una secuencia optimizada de codón de maíz que codifica la proteína DIG-109

Cualquier experto en la materia de biología molecular de plantas comprenderá que pueden diseñarse múltiples secuencias de ADN para codificar una única secuencia de aminoácidos. Un medio común para aumentar la expresión de una región codificante de una proteína de interés es adaptar la región codificante de tal manera que su composición de codón se asemeje a la composición de codón global del huésped en el que el gen está destinado a ser expresado. La orientación con respecto al diseño y producción de genes sintéticos puede encontrarse, por ejemplo, en el documento WO 1997/13402 y en la patente de Estados Unidos N° 5380831.

Se diseñó y sintetizó una secuencia de ADN con un sesgo de codón de maíz para producir la proteína insecticida química DIG-109 en plantas monocotiledóneas transgénicas. Se calculó una tabla de uso de codones para maíz (*Zea mays* L.) a partir de 706 secuencias codificantes de proteínas obtenidas de secuencias depositadas en GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov). Se calculó un conjunto de codones de maíz ponderado promedio después de omitir cualquier codón redundante utilizado menos de aproximadamente el 10% de los usos de codones totales para ese aminoácido. La representación del promedio ponderado para cada codón se calculó utilizando la fórmula:

$$\text{Promedio ponderado \% de C1} = 1/(\%C1 + \%C2 + \%C3 + \text{etc.}) \times \%C1 \times 100$$

donde C1 es el codón en cuestión y %C2, %C3, etc. representan los valores en % de uso promedio de los codones sinónimos restantes.

Para derivar una secuencia de ADN optimizada para codones de maíz que codifica la proteína DIG-109 de 1164 aminoácidos de SEQ ID NO: 2 se hicieron sustituciones de codones en la secuencia de ADN cry1Ca nativa que codifica el segmento de toxina nuclear Cry1Ca de manera que la secuencia de ADN resultante tenía la composición de codón global del codón de la tabla de sesgo optimizada para maíz. De manera similar, las sustituciones de codones frente a la secuencia de ADN cry1Ab nativa que codifica el segmento de protoxina Cry1Ab se realizaron de tal manera que la secuencia de ADN resultante tenía la composición de codón global de la tabla de sesgo de codones optimizada para maíz. Se realizaron refinamientos adicionales de las secuencias para eliminar los sitios de reconocimiento de enzimas de restricción indeseables, sitios potenciales de empalme de intrones de planta, corrimientos largos de residuos A/T o C/G y otros motivos que pudieran interferir con la estabilidad, transcripción o traducción del ARN de la región codificante en células de planta. Se realizaron otros cambios para introducir los sitios de reconocimiento de enzimas de restricción deseados y para eliminar los marcos de lectura abiertos internos largos (marcos distintos de +1). Todos estos cambios se realizaron dentro de las limitaciones de retener aproximadamente la composición de codones predispuesta por el maíz. Una secuencia completa optimizada de codones de maíz (que codifica la proteína DIG-109) se describe como SEQ ID NO: 3. La síntesis del fragmento de ADN fue realizada por un proveedor comercial (DNA2.0, Menlo Park, CA).

Ejemplo 5

Construcción de vectores de transformación de plantas que contienen genes expresables en plantas que codifican proteínas DIG-109

5 El sistema superbinario de *Agrobacterium* (Japan Tobacco, Tokyo, JP) es convenientemente utilizado para la transformación de hospedadores de plantas monocotiledóneas. El sistema superbinario emplea el plásmido del vector lanzadera pSB11 que contiene las secuencias para la repetición del borde del ADN-T derecho (RB) y la repetición del borde del ADN-T izquierdo (LB) separadas por múltiples sitios de clonación. Se preparó un derivado de pSB11 (denominado pDAB7691) por métodos de clonación de ADN convencionales. El plásmido pDAB7691 contiene la secuencia codificante de DIG-109 optimizada para maíz (CDS, es decir, SEQ ID NO: 3) bajo el control transcripcional del promotor de ubiquitina1 de maíz con el intrón1 asociado (Patente de Estados Unidos N° 5510474) y la región no traducida de Per5 3' del maíz (3' UTR) (Patente de Estados Unidos N° 7179902). Además, pDAB7691 contiene un gen marcador seleccionable de planta que comprende Dow AgroSciences DSM2 CDS (documento WO 2008/070845 A2) bajo el control transcripcional del promotor de actina1 del arroz con el intrón1 asociado (Patente de Estados Unidos N° 5641876) y el 3' UTR de Lipasa de maíz (Patente de EE.UU. No. 7179902). La disposición física de los componentes de la región T pDAB7691 se ilustra convenientemente como:

RB> promotor Ubi1 de maíz: DIG-109 CDS: maíz Per5 3'UTR> promotor Act1 de arroz:DSM2 CDS: Lip 3'UTR de maíz>LB

20 Un segundo derivado de pSB11 (llamado pDAB100276) se preparó por métodos de clonación de ADN convencionales. El plásmido pDAB100276 contiene la secuencia codificante de DIG-109 optimizada para maíz (CDS, es decir, SEQ ID NO: 3) bajo el control transcripción del promotor de ubiquitina1 de maíz con el intrón1 asociado y Per5 3' UTR de maíz. Además, pDAB100276 contiene un gen marcador seleccionable de planta que comprende Dow AgroSciences AAD1 CDS (Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 20090093366), bajo el control transcripcional del promotor de ubiquitina1 de maíz con el intrón1 asociado y la lipasa 3' UTR de maíz. La disposición física de los componentes de la región T pDAB100276 se ilustra convenientemente como:

25 RB> promotor Ubi1 de maíz: DIG-109 CDS:Per5 3' UTR de maíz>Promotor Ubi1 de maíz: AAD-1 CDS:Lip 3' UTR de maíz>LB

30 Para preparar para la transformación de *Agrobacterium*, se cultivó la cepa de clonación de *Escherichia coli* DH5 α que alberga el plásmido pDAB7691 o plásmido pDAB100276 a 37°C durante la noche en medio agar LB (g/l: Bacto Triptona, 10; Extracto de Levadura Bacto, 5; NaCl, 10; agar, 15) que contiene espectinomomicina (100 μ g/ml). Las células de la cepa DH5 α que contienen el plásmido pRK2013 de movilización conyugal se cultivaron en agar LB que contenía Kanamicina (50 μ g/ml). Después de la incubación, las placas se colocaron a 4°C para esperar la disponibilidad de la cepa LBA4404 de *Agrobacterium tumefaciens* que contiene el plásmido pSB1.

Ejemplo 6

Transformación de *Agrobacterium* para la generación de vectores superbinarios

35 El sistema superbinario de *Agrobacterium*, que emplea la cepa LBA4404 de *Agrobacterium tumefaciens* que contiene el plásmido pSB1, se usa convenientemente para la transformación de huéspedes de plantas monocotiledóneas. Las metodologías para construir y validar vectores superbinarios están bien establecidas, tal como se establece en el Manual de funcionamiento de pSB1 (Japan Tobacco). Se usaron métodos estándar microbiológicos y biológicos moleculares para generar y validar el plásmido superbinario pDAS5162, que es un plásmido cointegrante que comprende los plásmidos pSB1 y pDAB7691, y el plásmido superbinario pDAS5848, que es un plásmido cointegrante que comprende los plásmidos pSB1 y pDAB100276.

Ejemplo 7

Producción de la proteína DIG-109 en plantas de maíz

Transformación mediada por *Agrobacterium* de maíz

45 Se sembraron semillas de una cruce Hi-II F1 (Armstrong et al., 1991) en macetas de 5 galones que contenían una mezcla de 95% de sustrato de cultivo sin suelo Metro-Mix 360 (Sun Gro Horticulture, Bellevue, WA) y un 5% de tierra arcillosa/franca. Las plantas se cultivaron en un invernadero usando una combinación de lámparas de haluro de sodio y metal a alta presión con un fotoperíodo de luz de 16 horas:8 horas de oscuridad. Se realizaron polinizaciones de hermanos controladas para obtener embriones F2 inmaduros para la transformación. Las mazorcas de maíz se cosecharon aproximadamente a los 8-10 días después de la polinización cuando los embriones inmaduros tenían un tamaño entre 1,0 mm y 2,0 mm.

50 Infección y cocultivo. Las mazorcas de maíz se descascarillaron y se esterilizaron en superficie frotando con jabón líquido, sumergiendo en un 20% de blanqueador comercial (que contiene hipoclorito de sodio al 5%) durante aproximadamente 20 minutos, luego enjuagando tres veces con agua estéril. Una suspensión de células de

Agrobacterium tumefaciens que contiene pDAS5162, un vector superbinario que alberga un gen que codifica la proteína DIG-109 y que contiene el gen marcador seleccionable de planta DSM2, se preparó transfiriendo 1 ó 2 bucles de bacterias [cultivadas durante 2-3 días a 28°C en medio sólido YEP (g/L: Extracto de levadura Bacto, 10; Bacto Peptona, 10; NaCl, 5; agar, 15) que contiene 100 mg/L de espectinomicina, 10 mg/L de tetraciclina, y 250 mg/L de estreptomycin] en 5 mL de medio de infección líquido [LS Basal Medium (Linsmaier y Skoog, 1965), vitaminas N6 (Chu et al., 1975), 1,5 mg/L de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), 68,5 g/L sacarosa, glucosa 36,0 g/L, L-prolina 6 mM, pH 5,2] que contiene acetosiringona 100 µM.

Alternativamente, una suspensión de células de Agrobacterium tumefaciens que contiene pDAS5848, un vector superbinario que alberga un gen que codifica la proteína DIG-109 y que contiene el gen marcador seleccionable de planta AAD-1 se preparó transfiriendo 1 ó 2 bucles de bacterias cultivadas como se indicó anteriormente a 5 ml de medio de infección líquido que contiene de 100 a 200 µM de acetosiringona.

En ambos casos, la solución se agitó en vórtice hasta lograr una suspensión uniforme, y la concentración se ajustó a una densidad final de 200 unidades Klett utilizando un colorímetro Klett-Summerson con un filtro púrpura (para las transformaciones de pDAS5162), o a una densidad óptica de 1,2 a 550 nm (para las transformaciones de pDAS5848). Los embriones inmaduros se aislaron directamente en un tubo de microcentrifuga que contenía 2 ml del medio de infección. El medio se retiró y se reemplazó con 1 ml de solución de Agrobacterium y la solución de Agrobacterium/embrión se incubó durante 5 a 10 minutos a temperatura ambiente. Los embriones se transfirieron entonces a medio de cocultivo [LS Basal Medium, vitaminas N6, 1,5 mg/L 2,4-D, 30,0 g/L sacarosa, 6 mM L-prolina, 0,85 mg/L AgNO₃, 2,8 g/L goma Gellan (PhytoTechnology Laboratories, Lenexa, KS), pH 5,8] que contiene acetosiringona 100 µM (para los transformantes de pDAS5162) o que contienen de 100 a 200 µM de acetosiringona (para los transformantes de pDAS5848), y se cocultivaron durante 3-4 días a 20° en la oscuridad.

Después del cocultivo, los embriones se transfirieron a medio de reposo que contenía sales de MS y vitaminas, L-prolina 6 mM, mioinositol 100 mg/l, MES 500 mg/L, sacarosa 30 g/L, 1,5 mg/L de 2,4-D, 0,85 mg/l de AgNO₃, 250 mg/L de cefotaxima, 2,8 g/L de goma gellan, pH 5,8. Aproximadamente 7 días más tarde, los embriones se transfirieron al mismo medio suplementado con 3 mg/L de Bialaphos (para los transformantes de pDAS5162) o se suplementaron con haloxifop 100 nM (para los transformantes de pDAS5848) (medio de selección). Los aislados transformados se identificaron después de aproximadamente 8 semanas y se agruparon transfiriéndolos a un medio de selección nuevo a intervalos de 2 semanas para la regeneración y el análisis.

Regeneración y producción de semillas. Para la regeneración, los cultivos se transfirieron al medio de inducción "28" (sales MS y vitaminas, 30 g/L de sacarosa, 5 mg/L de bencilaminopurina, 0,25 mg/L de 2,4-D, 250 mg/L de cefotaxima, 2,5 g/L de goma Gellan, pH 5,7) suplementado con 3 mg/l de Bialaphos (para los transformantes de pDAS5162) o suplementado con 100 nM de haloxifop (para los transformantes de pDAS5848). La incubación fue durante 1 semana bajo condiciones de poca luz (14 µEm⁻²s⁻¹), luego 1 semana en condiciones de mucha luz (aproximadamente 89 µEm⁻²s⁻¹). Los tejidos se transfirieron posteriormente a un medio de regeneración "36" (el mismo que el medio de inducción, excepto que carecen de reguladores del crecimiento de las plantas). Cuando las plántulas tenían 3-5 cm de longitud, se transfirieron a tubos de cultivo de vidrio que contenían medio SHGA [(Schenk y Hildebrandt (1972) sales y vitaminas; PhytoTechnologies Labr.), 1,0 g/L de mioinositol, 10 g/L de sacarosa y 2,0 g/L de goma Gellan, pH 5,8] para permitir un mayor crecimiento y el desarrollo de los brotes y las raíces. Las plantas se trasplantaron a la misma mezcla de suelo que se describió anteriormente y se cultivaron en floración en el invernadero. Se realizaron polinizaciones controladas para la producción de semillas. Los expertos en la técnica de transformación del maíz comprenderán que hay otros métodos disponibles para la transformación del maíz y para la selección de plantas transformadas cuando se usan otros genes marcadores seleccionables (por ejemplo, genes de tolerancia a herbicidas).

Ejemplo 8

Análisis bioquímico y bioensayos de insectos de plantas de maíz que producen la proteína DIG-109.

La producción de proteína DIG-109 en plantas de maíz transgénico se examinó en proteínas extraídas de hojas de plantas jóvenes (generación T0). Se colocaron dos discos de hojas de maíz de 6 mm de diámetro en un tubo de muestra de una caja de tubos de 96 pozos profundos (Costar Cat N° 3957) y se congelaron a -80°C hasta el día del análisis. En ese momento, se añadieron dos Daisy™ BB recubiertos de cinc de 4,5 mm a cada tubo (congelado), junto con 200 µL de tampón de extracción compuesto por PBS (Solución salina tamponada con fosfato, Fisher Cat n° BP665 - 1) más Tween 20 al 0,05%. Cada tubo se tapó y la caja se colocó en un molino de bolas (Kleco™ 4-96 Pulverizer, Garcia Manufacturing, Visalia, CA) en un ajuste máximo durante tres minutos. Las muestras pulverizadas se centrifugaron durante 5 minutos a 2.500 xg y el sobrenadante que contenía proteínas solubles se utilizó en los inmunoensayos.

Los análisis de inmunotransferencia de proteínas de hojas de maíz extraídas revelaron que el anticuerpo policlonal DIG152RPC1 (preparado a partir de conejos inmunizados con la proteína de toxina nuclear Cry1Ca activada con tripsina) no reacciona inespecíficamente con proteínas extraídas de hojas de plantas no transgénicas. En extractos de plantas transformadas con pDAS5162, el anticuerpo DIG152PRC1 detectó varias especies de proteínas.

Es evidente que, aunque el transgén introducido en el maíz mediante la transformación con pDAS5162 codifica la proteína DIG-109 de longitud completa, la actividad proteolítica en las células de maíz procesa la proteína nascente a una abundancia de especies estables de peso molecular menor.

- 5 La toxicidad de insectos de hojas cosechadas de plantas de maíz transgénicas aisladas independientemente transformadas con la construcción pDAS5162 fue probada in vitro usando larvas recién nacidas del gusano cogollero (FAW, *Spodoptera frugiperda* (JE Smith)), y larvas de FAW (rFAW) resistentes a Cry1F. Los huevos FAW se obtuvieron de un insectario comercial (Benzon), y los huevos rFAW provenían de una población no comercial (Dow AgroSciences). Se tomaron muestras del segmento foliar para bioensayos de insectos de plantas T0 cultivadas en invernadero aproximadamente 2 semanas después de que las plantas se trasplantaran del laboratorio al invernadero. Se colocaron dos trozos de hoja de cada planta (cada uno de aproximadamente 1 pulgada cuadrada) en pocillos separados de una bandeja de 32 pocillos (CD International) en la parte superior de aproximadamente 3 ml de agar solidificado al 2%. Los huevos se incubaron con la dieta de lepidópteros multiespecífica (Southland Products) y las larvas recién nacidas se seleccionaron cuando tenían menos de 24 horas de vida. Aproximadamente 10 larvas por segmento de hoja se colocaron cuidadosamente en cada pocillo usando un pincel de pelo de camello. 10 Las bandejas infestadas se sellaron con las tapas perforadas suministradas con las bandejas, luego se mantuvieron a 28°C, 40% de HR, 16 horas de luz:8 horas de oscuridad durante tres días. El daño porcentual (% DAM) para cada pieza de hoja se registró al final de la prueba. Las calificaciones de daño se promediaron y se usaron para determinar qué plantas tenían el menor daño de cada tipo de insecto de prueba. Las pruebas se replicaron varias veces para todos los insectos. 15
- 20 Los datos se analizaron usando el software estadístico JMP (SAS, Cary, NC), promediando las puntuaciones en % de DAM para cada planta, para cada tipo de insecto. Se utilizó el modelo "Fit Y by X" para el análisis de ANOVA de una vía. Tukey-Kramer significa que se utilizó la separación según fue necesario para analizar las diferencias significativas entre las puntuaciones medias en % de DAM para cada tratamiento. Se hicieron comparaciones con las puntuaciones en % de DAM obtenidas de plantas de control de edad similar. Las plantas de control positivo se cultivaron a partir de semillas del híbrido Herculex I™ comercial, que produce la toxina B.t. de Cry1Fa. Los controles negativos (es decir, las plantas no transformadas) se representaron mediante las líneas Hi II y B104, y una Herculex I™ Isoline (una matriz que no contiene Cry del híbrido Herculex I™). 25

30 La Figura 1 resume los resultados obtenidos en dichas pruebas de bioensayo de insectos. Es un hallazgo sorprendente que exista una correlación positiva entre la producción de DIG-109 en las hojas transgénicas y la calificación en % de DAM. Para FAW, $F = 35,3$; d.f. = 1, 33; $P < 0,0001$; $r^2 = 0,52$, y para rFAW, $F = 25,3$; d.f. = 1,33; $P < 0,0001$; $r^2 = 0,43$. Otro hallazgo sorprendente y novedoso es que las larvas del gusano cogollero que son resistentes a la intoxicación por la toxina B.t. de Cry1Fa todavía están inhibidas de la alimentación por la toxina B.t. de DIG-109.

35 Se entiende que otras plagas de insectos de maíz pueden probarse de manera similar. Estas plagas incluyen, pero no se limitan a: *Agromyza parvicornis* (moscas minadoras de hojas), *Agrotis ipsilon* (gusanos grises), *Anticarsia gemmatalis* (oruga de las leguminosas), *Diatraea grandiosella* (barrenador del maíz del sudoeste), *Diatraea saccharalis* (barrenador de la caña de azúcar), *Elasmopalpus lignosellus* (perforador del tallo del maíz), *Helicoverpa zea* (gusano del maíz), *Heliothis virescens* (gusano del tabaco), *Ostrinia nubilalis* (perforador del maíz europeo), *O. nubilalis* resistente a Cry1F, *Plutella xylostella* (polilla del diamante), *P. xylostella* resistente a Cry1, *Spodoptera exigua* (gusano de la remolacha) y *Trichoplusia ni* (gusano falso medidor). 40

45 Las plantas de maíz transgénico transformadas con pDAS5848 (generación T0) también se examinaron mediante bioensayos de insectos y mediante inmunoanálisis. La cantidad de proteína DIG-109 en extractos de hojas se cuantificó usando un kit de detección ELISA Cry1C comercialmente disponible (Envirologix™, Portland, MA; n.º de catálogo AP007), y el nivel de proteína DIG-109 detectado se expresó en partes por millón (ppm; 1 ppm representa 1 ng de proteína DIG-109 por mg de proteína soluble total en el extracto).

El daño de alimentación por FAW y rFAW se codificó de la siguiente manera: 0 = sin daño o unas pocas marcas de alimentación porosas, 1 = de 25% a 50 % de hojas consumidas, y 2 = la mayoría de las hojas consumidas o no queda ninguna hoja. Una planta protegida es aquella cuya puntuación de daño que es 0,67 o inferior.

50 Los datos en la Tabla 3 muestran que existe una correlación positiva entre la presencia de especies de proteínas DIG-109 detectadas por ELISA en las plantas T0 y el control del daño por alimentación realizado por las larvas del cogollero del maíz en bioensayos in vitro. La planta con el nivel más alto detectado de proteína DIG-109 (planta 5848-005.4) tuvo el puntaje de daño de alimentación de hojas más bajo. Las hojas de plantas con niveles más bajos de proteína DIG-109 detectable en el rango de 190 a 230 ppm también sufrieron menos daño de alimentación que las observadas con plantas de control negativo (es decir, controles no transformados B104 y Hi II), que tenían puntuaciones de daño promedio de 1,7 y 1,8. En todas las hojas de pDAS5848 examinadas, la especie de proteína DIG-109 predominante detectada comprendía un doblete de péptidos de un tamaño aproximado de 60 kDa y 55 kDa. 55

Tabla 3. Niveles de proteína DIG-109 en extractos de hojas de maíz transgénico transformadas pDAS5848 y reducción del daño por alimentación del cogollero del maíz.

Identificador de planta	DIG-109 ppm	Daño FAW
5848-005.4	680	0
5848-008.4	230	0,67
5848-001.3	220	1
5848-001.1	210	1
5848-001.2	190	0,33
5848-003.1	190	1
5848-003.2	190	0,67
5848-003.3	190	0,67
Plantas Control (Número analizado)	DIG-109 ppm	Daño FLAW (SD ^b)
B104 (19)	NA ^a	1,8 (0,5)
Hi II (20)	NA	1,7 (0,5)
Herculex I™ (20)	NA	0,5 (0,6)

^aNA = No aplicable; ^bSD = desviación estándar de la media.

Por lo tanto, una característica de la presente invención es que la proteína DIG-109, cuando se produce en plantas de maíz, hace que las plantas sean resistentes al daño por la alimentación de las larvas de los gusanos cogolleros y las larvas del gusano cogollero resistentes a Cry1F.

Ejemplo 9

Experimentos de unión competitivos de proteínas de toxina nuclear Cry1Fa y Cry1Ca con vesículas de membrana de borde ciliado aisladas de *Spodoptera frugiperda*

Los siguientes ejemplos evalúan la unión competitiva de proteínas de toxina nuclear Cry1 frente a receptores putativos en tejidos de intestino de insecto. Se muestra que la proteína de la toxina nuclear Cry1Ca marcada con 125I se une con gran afinidad a las vesículas de membrana de borde ciliado (BBMV) preparadas a partir de *Spodoptera frugiperda* (gusano cogollero) y que la proteína de toxina nuclear Cry1Fa no compite con esta unión.

Purificación de proteínas Cry. Un gen que codifica una proteína quimérica que comprende la toxina nuclear Cry1Ca y la protoxina Cry1Ab se expresó en la cepa de expresión de *Pseudomonas fluorescens* como se describe en el Ejemplo 2. De manera similar, un gen que codifica una proteína quimérica, que comprende la toxina nuclear Cry1Fa (603 aminoácidos) y la protoxina Cry1Ab (545 aminoácidos) se expresó en el sistema Pf. Las proteínas se purificaron por los métodos del Ejemplo 2 y se realizó la digestión con tripsina para producir toxinas del núcleo activadas a partir de proteínas de longitud completa y los productos se purificaron mediante los métodos del Ejemplo 2. Las preparaciones de las proteínas procesadas con tripsina (toxina nuclear activada) tenían una pureza > 95% y un peso molecular de aproximadamente 65 kDa, determinado experimentalmente por SDS-PAGE.

Se emplearon métodos estándar de cuantificación de proteínas y electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida como se enseña, por ejemplo, en Sambrook et al. (1989) y Ausubel et al. (1995), y actualizaciones de los mismos.

Preparación y fraccionamiento de BBMV solubilizadas. Las larvas de *Spodoptera frugiperda* de último estadio se dejaron en ayunas durante la noche y luego se diseccionaron después de enfriar en hielo durante 15 minutos. El tejido del intestino medio se eliminó de la cavidad corporal, dejando atrás el intestino posterior unido a la epidermis. El intestino medio se colocó en un volumen 9X de tampón de homogeneización enfriado en hielo (manitol 300 mM, EGTA 5 mM, base Tris 17 mM, pH 7,5), complementado con cóctel inhibidor de proteasa (Sigma-Aldrich P-2714) diluido según lo recomendado por el proveedor. El tejido se homogeneizó con 15 golpes de un homogeneizador de tejido de vidrio. Las BBMV se prepararon mediante el método de precipitación con MgCl₂ de Wolfersberger (1993). Brevemente, se mezcló un volumen igual de una solución de MgCl₂ 24 mM en manitol 300 mM con el homogeneizado de intestino medio, se agitó durante 5 minutos y se dejó reposar sobre hielo durante 15 minutos. La solución se centrifugó a 2.500 x g durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante se guardó y el sedimento se suspendió en el volumen original de tampón de homogeneización diluido 0,5X y se centrifugó de nuevo. Los dos sobrenadantes se combinaron y centrifugaron a 27.000 x g durante 30 min a 4°C para formar la fracción de BBMV. El sedimento se suspendió en tampón de almacenamiento BBMV (HEPES 10 mM, KCl 130 mM, glicerol al 10%, pH 7,4) hasta una concentración de proteína de aproximadamente 3 mg/ml. La concentración de proteína se determinó usando albúmina sérica bovina (BSA) como estándar. La determinación de la fosfatasa alcalina (una enzima marcador para la fracción de BBMV) se realizó antes de congelar las muestras usando el kit de ensayo de fosfatasa alcalina QuantalChrom™ DALP-250 (Gentaur Molecular Products, Kampenhout, BE) siguiendo las instrucciones del

fabricante. La actividad específica de esta enzima típicamente aumentó 7 veces en comparación con la encontrada en la fracción de homogeneizado de partida del intestino medio. Se tomaron alícuotas de las BBMV en muestras de 250 μ L, se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C.

5 Electroforesis. El análisis de las proteínas mediante SDS-PAGE se realizó bajo condiciones reductoras (es decir, en 5% de β -mercaptoetanol, BME) y desnaturalización (es decir, calentadas 5 minutos a 90° en presencia de SDS al 2%). Las proteínas se cargaron en pocillos de un gel de poliacrilamida Tris-Glicina del 4% al 20% (BioRad, Hercules, CA) y se separaron a 200 voltios durante 60 minutos. Las bandas de proteínas se detectaron mediante tinción con Coomassie Brilliant Blue R-250 (BioRad) durante una hora, y se destiñeron con una solución de metanol al 5% en ácido acético al 7%. Se obtuvieron las imágenes de los geles y se analizaron usando un BioRad Fluro-S Multi
10 Imager™. Los pesos moleculares relativos de las bandas de proteína se determinaron por comparación con las movilidades de proteínas de peso molecular conocidas observadas en una muestra de BenchMark™ Protein Ladder (Life Technologies, Rockville, MD) cargada en un pocillo del gel. Yodación de la proteína de toxina del núcleo Cry1Ca

15 La proteína de la toxina nuclear Cry1Ca purificada fue yodada usando Perlas de Yodación Pierce (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL). Brevemente, dos perlas de yodación se lavaron dos veces con 500 μ L de PBS (fosfato de sodio 20 mM, NaCl 0,15 M, pH 7,5), y se colocaron en un tubo de centrifuga de 1,05 mL con 100 μ L de PBS. Se añadieron 0,5 mCi de yoduro de sodio marcado con ¹²⁵I, se permitió que los componentes reaccionasen durante 5 minutos a temperatura ambiente, luego se añadió 1 μ g de proteína de toxina nuclear Cry1Ca a la solución y se dejó reaccionar durante 3 a 5 minutos adicionales. La reacción se terminó pipeteando la solución de las perlas de
20 yodación y aplicándola a una columna de centrifugación Zeba™ (Invitrogen) equilibrada en CAPS 50 mM, pH 10,0, DTT (ditiotreitól) 1 mM, EDTA 1 mM y 5% de glicerol. Las perlas de yodación se lavaron dos veces con 10 μ l de PBS y la solución de lavado también se aplicó a la columna de desalación Zeba™. La solución radiactiva se eluyó a través de la columna de centrifugación centrifugando a 1.000 x g durante 2 min. La proteína de toxina nuclear radiomarcada con ¹²⁵I fue entonces dializada frente a CAPS 50 mM, pH 10,0, DTT 1 mM, EDTA 1 mM y 5 % de
25 glicerol.

Imagina. La pureza radiográfica de la proteína toxina nuclear Cry1Ca radioyodada radiada fue de aproximadamente 6,8 μ Ci / μ g de proteína. La proteína radiomarcada también se caracterizó por SDS-PAGE y se visualizó mediante Visualización de imágenes. La radio-pureza de la proteína de la toxina nuclear Cry1Ca fue determinada por SDS-PAGE y formación de imágenes con fósforo. Brevemente, los geles de SDS-PAGE se secaron usando un aparato de
30 secado de gel BioRad siguiendo las instrucciones del fabricante. Los geles secos se visualizaron envolviéndolos en película Mylar™ (12 μ m de grosor) y exponiéndolos bajo un generador de imágenes de fósforo Molecular Dynamics Storm 820 y la imagen se analizó usando el software ImageQuant™.

Ejemplo 10

Unión de la proteína de la toxina nuclear Cry1 marcada con ¹²⁵I a BBMV de Spodoptera frugiperda.

35 Se generó una curva de saturación usando proteína de toxina nuclear Cry1Ac radiomarcada con ¹²⁵I para determinar la cantidad óptima de proteína BBMV para usar en los ensayos de unión con las proteínas de toxina nuclear Cry1Ca y Cry1Fa. Se incubaron 0,5 nM de proteína de toxina nuclear Cry1Ac radiomarcada con ¹²⁵I durante 1 hora a 28°C en tampón de unión (NaHPO₄ 8 mM, KH₂PO₄ 2 mM, NaCl 150 mM, BSA al 0,1%, pH 7,4) con cantidades de proteína de BBMV que variaban desde 0 μ g/mL a 500 μ g/mL (volumen total de 0,5 mL). La proteína
40 de la toxina nuclear Cry1Ac marcada con ¹²⁵I unida a las proteínas BBMV se separó de la fracción no unida muestreando 150 μ L de la mezcla de reacción por triplicado en tubos de centrifuga separados de 1,5 mL y centrifugando las muestras a 14.000 x g durante 8 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante se eliminó suavemente y el sedimento se lavó tres veces con tampón de unión helado. El fondo del tubo de centrifuga que contiene el sedimento se cortó, se colocó en un tubo de cultivo de vidrio de 13 x 75 mm y las muestras se contaron
45 durante 5 minutos cada una en el contador gamma. Se representó gráficamente CPM (cuentas por minuto) obtenido menos CPM de fondo (reacción sin proteína de BBMV) frente a la concentración de proteína de BBMV. De acuerdo con otros resultados también, se determinó que la concentración óptima de proteína BBMV para usar en los ensayos de unión era de 150 μ g/ml.

50 Ejemplo 11. Ensayos de unión competitiva a BBMV de S. frugiperda con proteínas de toxinas nucleares de Cry1Ca y Cry1Fa.

Se realizaron ensayos de unión competitivos homólogos y heterólogos usando 150 μ g/mL de proteína BBMV y 0,5 nM de la proteína de toxina nuclear Cry1Ca radiomarcada con ¹²⁵I. Las concentraciones de la proteína de la toxina nuclear Cry1Ca no radiomarcada competitiva añadida a la mezcla de reacción fue de 0,045 nM a 1000 nM y se añadieron al mismo tiempo que la proteína radiactiva de toxina nuclear Cry1Ca para asegurar una verdadera
55 competencia de unión. Las incubaciones se llevaron a cabo durante 1 h a 28°C y la cantidad de proteína de toxina nuclear Cry1Ca marcada con ¹²⁵I unida a BBMV (unión específica) se midió como se describió anteriormente. La unión no específica se representó mediante los recuentos obtenidos en presencia de 1.000 nM de proteína de toxina nuclear Cry1Ca no radiomarcada. Se consideró que la unión total del cien por ciento era la cantidad de unión en ausencia de cualquier proteína de toxina nuclear Cry1Fa competitiva.

Los ensayos de unión a receptores usando la proteína de toxina nuclear Cry1Ca marcada con 125I determinaron la capacidad de la proteína de la toxina nuclear Cry1Fa para desplazar este ligando radiomarcado de su sitio de unión en BBMV de *S. frugiperda*. Los resultados (Figura 2) muestran que la proteína de toxina nuclear Cry1Fa no desplazó a la proteína de toxina nuclear Cry1Ca marcada con 125I unida de su(s) proteína(s) receptora(s) a concentraciones tan altas como 300 nM (600 veces la concentración del ligando de unión radioactivo). Como se esperaba, la proteína de toxina nuclear Cry1Ca no marcada pudo desplazar a la proteína de toxina nuclear Cry1Ca radiomarcada de su(s) proteína(s) de unión, exhibiendo una curva de dosis respuesta sigmoidal con un 50% de desplazamiento que ocurre a 5 nM.

De este modo, se indica que la proteína de la toxina nuclear de Cry1Ca interactúa con un sitio de unión en BBMV de *S. frugiperda* que no se une a la proteína de la toxina nuclear Cry1Fa.

Véase la Figura 2: Competencia para unirse a BBMV de *Spodoptera frugiperda* por la toxina nuclear Cry1Fa, la toxina nuclear Cry1Ca y la toxina nuclear Cry1Ca marcada con 125I.

EJEMPLO 12

Unión competitiva de la proteína de la toxina nuclear Cry1Ca y la proteína de la toxina nuclear Cry1Fa marcada con biotina a BBMV de *Diatraea saccharalis*

Los siguientes ejemplos evalúan la unión competitiva de las proteínas de la toxina nuclear Cry1 a receptores putativos en los tejidos del intestino de los insectos. Se muestra que la proteína de toxina nuclear Cry1Fa marcada con biotina se une con alta afinidad a las vesículas de membrana de borde ciliado (BBMV) preparadas a partir de *Diatraea saccharalis* (barrenador del tallo) y que la proteína de toxina nuclear Cry1Ca no compite con esta unión.

Preparación y fraccionamiento de BBMV solubilizadas. Las larvas de última etapa de *D. saccharalis* se dejaron en ayunas durante la noche y luego se disecaron después de enfriar en hielo durante 15 minutos. Las preparaciones de BBMV se realizaron siguiendo los métodos descritos en el Ejemplo 10.

Los resultados del ensayo de unión competitiva que usan proteína de toxina nuclear Cry1Fa marcada con 125I pueden tener una relevancia biológica limitada, ya que la yodación de la proteína Cry1Fa hace que la proteína sea inactiva en los bioensayos de alimentación de insectos. Por el contrario, se ha descubierto que la proteína de la toxina nuclear Cry1Fa biotinilada conserva su toxicidad contra los insectos. Además, es posible medir la interacción de esta proteína (biotinilada) con receptores en presencia de proteínas de toxina nuclear Cry no biotiniladas (competidoras). Tal experimento de competición puede detectar la unión de la proteína de la toxina nuclear Cry1Fa marcada con biotina a los receptores en BBMV de *D. saccharalis* después de la electroforesis de las proteínas BBMV y la transferencia de la muestra completa a una membrana de PVDF (fluoruro de polivinilideno). La avidina conjugada con peroxidasa de rábano picante, en combinación con un reactivo de luminiscencia química potenciado, se usa para visualizar la proteína de la toxina nuclear Cry1Fa marcada con biotina.

La proteína de toxina nuclear Cry1Fa se marcó con biotina usando un kit de biotinilación Pierce EZ-Link® Sulfo-NHS-LC (Thermo Fisher Scientific). Brevemente, se añadieron 40 µl de Sulfo-NHS-LC-biotina (10 mg/ml en dimetil sulfóxido) a 500 µl de proteína de toxina central Cry1Fa (2,0 mg/ml) en tampón de fosfato de sodio 0,1 M, pH 7,2. La reacción se incubó a 4°C durante la noche, luego se retiró Sulfo-NHS-LC-biotina sin reaccionar usando una columna de desalación Zeba™. La incorporación de biotina en la proteína de la toxina nuclear Cry1Fa se midió usando el ensayo de desplazamiento Pierce HABA-avidina (Thermo Fisher Scientific) según lo descrito por el fabricante.

La proteína de la toxina nuclear Cry1Fa marcada con biotina (2,5 nM) se incubó durante 1 hora a 28°C con 0,2 mg de BBMV preparadas a partir de *D. saccharalis* [en un volumen total de 1,0 ml] en presencia o ausencia de un exceso de 500 veces de proteínas de toxina nuclear Cry1Fa o Cry1Ca no marcadas. La proteína de toxina nuclear Cry1Fa marcada con biotina no unida se eliminó mediante centrifugación a 16.000 x g durante 10 min y el sedimento resultante se lavó 3 veces con tampón de unión helado. El sedimento se suspendió en 15 µL de tampón de muestra Laemmli 4X, se agitó en vórtice y se sonicó para asegurar la solubilización completa y se calentó a 90°C durante 3 min. La muestra completa se cargó en un gel de Tris glicina del 4% al 20%, se separó por SDS-PAGE y se transfirió electrolíticamente a una membrana de PVDF según las instrucciones del proveedor (BioRad). 1.000 ng de la proteína de la toxina nuclear Cry1Fa y la proteína de la toxina nuclear Cry1Ca también se corrieron en el gel como controles negativos. La proteína de la toxina nuclear Cry1Fa marcada con biotina se visualizó con peroxidasa de rábano picante conjugada con avidina a una dilución 1:15.000 con quimioluminiscencia mejorada usando una mezcla 1:1 de solución de peróxido de West Pico SuperSignal® con Luminal Enhancer Solution (Thermo Fisher Scientific, números de catálogo 1859674 y 1859675). Las bandas se grabaron usando un Biorad Fluor-S Multimager con el software Quantity One v.4.5.2.

Los resultados demostraron la detección de la proteína de la toxina nuclear Cry1Fa marcada con biotina unida a los receptores en BBMV de *D. saccharalis*, y además mostró que la proteína de la toxina nuclear Cry1Fa no biotinilada a una concentración en exceso de 500 veces desplazó completamente a la proteína de la toxina nuclear Cry1Fa biotinilada unida de su(s) receptor(es). Por el contrario, una concentración en exceso de 500 veces de proteína de toxina nuclear Cry1Ca no pudo desplazar la proteína de toxina nuclear Cry1Fa biotinilada unida, lo que indica que la proteína de toxina nuclear Cry1Ca no compite por el sitio o sitios de unión a la proteína de toxina nuclear Cry1Fa en

BBMV de *D. saccharalis*. De este modo, se indica que, de forma análoga a los resultados obtenidos con BBMV de *S. frugiperda*, la proteína de toxina nuclear Cry1Fa y la proteína de toxina nuclear Cry1Ca se unen a sitios de unión separados en BBMV de *D. saccharalis*.

Referencias

- 5 Finney, D.J. 1971. Probit analysis. Cambridge University Press, England.
- Hua, G., L. Masson, J. L. Jurat-Fuentes, G. Schwab, and M., J. Adang. Binding analyses of *Bacillus thuringiensis* Cry1 d-endotoxins using brush border membrane vesicles of *Ostrinia nubilalis*. *Applied and Environmental Microbiology* 67[2], 872-879. 2001.
- LeOra Software. 1987. POLO-PC. A user's guide to probit and logit analysis. Berkeley, CA.
- 10 McGaughey, W. H. F. Gould, and W. Gelernter. Bt resistance management. *Nature Biotechnology* 16[2], 144-146. 1998.
- Marçon, P.R.G.C., L. J. Young, K. Steffey, and B.D. Siegfried. 1999. Baseline susceptibility of the European Corn Borer, *Ostrinia nubilalis* (Hübner) (Lepidoptera: Pyralidae) to *Bacillus thuringiensis* toxins. *J. Econ. Entomol.* 92 (2): 280-285.
- 15 Robertson, L. J. and H. K. Preisler. 1992. Pesticide bioassays with arthropods. CRC Press, Boca Ranton, FL.
- SAS Institute Inc. 1988. SAS procedures guide, Release 6.03 edition. SAS Institute Inc, Cary, NC.
- Stone, B. F. 1968. A formula for determining degree of dominance in cases of monofactorial inheritance of resistance to chemicals. *Bull. WHO* 38:325-329.
- 20 Van Mellaert, H., J. Botterman, J. Van Rie, and H. Joos. Transgenic plants for the prevention of development of insects resistant to *Bacillus thuringiensis* toxins. (Plant Genetic Systems N.V., Belg. 89-401499[400246], 57-19901205. EP. 5-31-1989

Apéndice A

Lista de delta-endotoxinas - del sitio web de Crickmore et al. (citado en la solicitud)

El número de entrada es la entrada NCBI (si está disponible)

Nombre	Nº. entrada	Autores	Año	Cepa fuente	Comentario
Cry1Aa1	AAA22353	Schnepf et al	1985	Bt kurstaki HD1	
Cry1Aa2	AAA22552	Shibano et al	1985	Bt sotto	
Cry1Aa3	BAA00257	Shimizu et al	1988	Bt aizawai IPL7	
Cry1Aa4	CAA31886	Masson et al	1989	Bt entomocidus	
Cry1Aa5	BAA04468	Udayasuriyan et al	1994	Bt Fu-2-7	
Cry1Aa6	AAA86265	Masson et al	1994	Bt kurstaki NRD-12	
Cry1Aa7	AAD46139	Osman et al	1999	Bt C12	
Cry1Aa8	126149	Liu	1996		Solo la secuencia de ADN
Cry1Aa9	BAA77213	Nagamatsu et al	1999	Bt dendrolimus T84A1	
Cry1Aa10	AAD55382	Hou and Chen	1999	Bt kurstaki HD-1-02	
Cry1Aa11	CAA70856	Tounsi et al	1999	Bt kurstaki	
Cry1Aa12	AAP80146	Yao et al	2001	Bt Ly30	
Cry1Aa13	AAM44305	Zhong et al	2002	Bt sotto	
Cry1Aa14	AAP40639	Ren et al	2002	no publicado	
Cry1Aa15	AAV66993	Sauka et al	2005	Bt INTA Mol-12	

ES 2 663 283 T3

Nombre	Nº. entrada	Autores	Año	Cepa fuente	Comentario
Cry1Ab1	AAA22330	Wabiko et al	1986	Bt berliner 1715	
Cry1Ab2	AAA22613	Thorne et al	1986	Bt kurstaki	
Cry1Ab3	AAA22561	Geiser et al	1986	Bt kurstaki HD1	
Cry1Ab4	BAA00071	Kondo et al	1987	Bt kurstaki HD1	
Cry1Ab5	CAA28405	Hofte et al	1986	Bt berliner 1715	
Cry1Ab6	AAA22420	Hefford et al	1987	Bt kurstaki NRD-12	
Cry1Ab7	CAA31620	Haider & Ellar	1988	Bt aizawai IC1	
Cry1Ab8	AAA22551	Oeda et al	1987	Bt aizawai IPL7	
Cry1Ab9	CAA38701	Chak & Jen	1993	Bt aizawai HD133	
Cry1Ab10	A29125	Fischhoff et al	1987	Bt kurstaki HD1	
Cry1Ab11	112419	Ely & Tippett	1995	Bt A20	Solo la secuencia de ADN
Cry1Ab12	AAC64003	Silva-Werneck et al	1998	Bt kurstaki S93	
Cry1Ab13	AAN76494	Tan et al	2002	Bt c005	
Cry1Ab14	AAG16877	Meza-Basso & Theoduloz	2000	Native Chilean Bt	
Cry1Ab15	AAO13302	Li et al	2001	Bt B-Hm-16	
Cry1Ab16	AAK55546	Yu et al	2002	Bt AC-11	
Cry1Ab17	AAT46415	Huang et al	2004	Bt WB9	
Cry1Ab18	AAQ88259	Stobdan et al	2004	Bt	
Cry1Ab19	AAW31761	Zhong et al	2005	Bt X-2	
Cry1Ab20	ABB72460	Liu et al	2006	BtC008	
Cry1Ab21	ABS18384	Swiecicka et al	2007	BtIS5056	
Cry1Ab22	ABW87320	Wu and Feng	2008	BtS2491Ab	
Cry1Ab-like	AAK14336	Nagarathinam et al	2001	Bt kunthala RX24	secuencia incierta
Cry1Ab-like	AAK14337	Nagarathinam et al	2001	Bt kunthala RX28	secuencia incierta
Cry1Ab-like	AAK14338	Nagarathinam et al	2001	Bt kunthala RX27	secuencia incierta
Cry1Ab-like	ABG88858	Lin et al	2006	Bt ly4a3	secuencia insuficiente
Cry1Ac1	AAA22331	Adang et al	1985	Bt kurstaki HD73	
Cry1Ac2	AAA22338	Von Tersch et al	1991	Bt kenyae	
Cry1Ac3	CAA38098	Dardenne et al	1990	Bt BTS89A	
Cry1Ac4	AAA73077	Feitelson	1991	Bt kurstaki PS85A1	
Cry1Ac5	AAA22339	Feitelson	1992	Bt kurstaki PS81GG	
Cry1Ac6	AAA86266	Masson et al	1994	Bt kurstaki NRD-12	
Cry1Ac7	AAB46989	Herrera et al	1994	Bt kurstaki HD73	
Cry1Ac8	AAC44841	Omolo et al	1997	Bt kurstaki HD73	

ES 2 663 283 T3

Nombre	Nº. entrada	Autores	Año	Cepa fuente	Comentario
Cry1Ac9	AAB49768	Gleave et al	1992	Bt DSIR732	
Cry1Ac10	CAA05505	Sun	1997	Bt kurstaki YBT-1520	
Cry1Ac11	CAA10270	Makhdoom & Riazuddin	1998		
Cry1Ac12	I12418	Ely & Tippett	1995	Bt A20	Solo la secuencia de ADN
Cry1Ac13	AAD38701	Qiao et al	1999	Bt kurstaki HD1	
Cry1Ac14	AAQ06607	Yao et al	2002	Bt Ly30	
Cry1Ac15	AAN07788	Tzeng et al	2001	Bt de Taiwan	
Cry1Ac16	AAU87037	Zhao et al	2005	Bt H3	
Cry1Ac17	AAX18704	Hire et al	2005	Bt kenyae HD549	
Cry1Ac18	AAV88347	Kaur & Allam	2005	Bt SK-729	
Cry1Ac19	ABD37053	Gao et al	2005	Bt C-33	
Cry1Ac20	ABB89046	Tan et al	2005		
Cry1Ac21	AAV66992	Sauka et al	2005	INTA Mol-12	
Cry1Ac22	ABZ01836	Zhang & Fang	2008	Bt WO5-1	
Cry1Ac23	CAQ30431	Kashyap et al	2008	Bt	
Cry1Ac24	ABL01535	Arango et al	2008	Bt 146-158-01	
Cry1Ac25	FJ513324	Guan Peng et al	2008	Bt Tm37-6	Sin enlace NCBI Julio 09
Cry1Ac26	FJ617446	Guan Peng et al	2009	Bt Tm41-4	Sin enlace NCBI Julio 09
Cry1Ac27	FJ617447	Guan Peng et al	2009	Bt Tm44-1B	Sin enlace NCBI Julio 09
Cry1Ac28	ACM90319	Li et al	2009	Bt Q-12	
Cry1Ad1	AAA22340	Feitelson	1993	Bt aizawai PS81I	
Cry1Ad2	CAA01880	Anonymous	1995	Bt PS81RR1	
Cry1Ae1	AAA22410	Lee & Aronson	1991	Bt alesti	
Cry1Af1	AAB82749	Kang et al	1997	Bt NT0423	
Cry1Ag1	AAD46137	Mustafa	1999		
Cry1Ah1	AAQ14326	Tan et al	2000		
Cry1Ah2	ABB76664	Qi et al	2005	Bt alesti	
Cry1Ai1	AAO39719	Wang et al	2002		
Cry1A-tipo	AAK14339	Nagarathinam et al	2001	Bt kunthala nags3	secuencia incierta
Cry1Ba1	CAA29898	Brizzard & Whiteley	1988	Bt thuringiensis HD2	
Cry1Ba2	CAA65003	Soetaert	1996	Bt entomocidus HD110	
Cry1Ba3	AAK63251	Zhang et al	2001		
Cry1Ba4	AAK51084	Nathan et al	2001	Bt entomocidus HD9	
Cry1Ba5	ABO20894	Song et al	2007	Bt sfw-12	

ES 2 663 283 T3

Nombre	Nº. entrada	Autores	Año	Cepa fuente	Comentario
Cry1Ba6	ABL60921	Martins et al	2006	Bt S601	
Cry1Bb1	AAA22344	Donovan et al	1994	Bt EG5847	
Cry1Bc1	CAA86568	Bishop et al	1994	Bt morrisoni	
Cry1Bd1	AAD10292	Kuo et al	2000	Bt wuhanensis HD525	
Cry1Bd2	AAM93496	Isakova et al	2002	Bt 834	
Cry1Be1	AAC32850	Payne et al	1998	Bt PS158C2	
Cry1Be2	AAQ52387	Baum et al	2003		
Cry1Be3	FJ716102	Xiaodong Sun et al	2009	Bt	Sin enlace NCBI Julio 09
Cry1Bf1	CAC50778	Arnaut et al	2001		
Cry1Bf2	AAQ52380	Baum et al	2003		
Cry1Bg1	AAO39720	Wang et al	2002		
Cry1Ca1	CAA30396	Honee et al	1988	Bt entomocidus 60.5	
Cry1Ca2	CAA31951	Sanchis et al	1989	Bt aizawai 7.29	
Cry1Ca3	AAA22343	Feitelson	1993	Bt aizawai PS81I	
Cry1Ca4	CAA01886	Van Mellaert et al	1990	Bt entomocidus HD110	
Cry1Ca5	CAA65457	Strizhov	1996	Bt aizawai 7.29	
Cry1Ca6	AAF37224	Yu et al	2000	Bt AF-2	
Cry1Ca7	AAG50438	Aixing et al	2000	Bt J8	
Cry1Ca8	AAM00264	Chen et al	2001	Bt c002	
Cry1Ca9	AAL79362	Kao et al	2003	Bt G10-01A	
Cry1Ca10	AAN16462	Lin et al	2003	Bt E05-20a	
Cry1Ca11	AAX53094	Cai et al	2005	Bt C-3	
Cry1Cb1	M97880	Kalman et al	1993	Bt galleriae HD29	Solo la secuencia de ADN
Cry1Cb2	AAG35409	Song et al	2000	Bt c001	
Cry1Cb3	ACD50894	Huang et al	2008	Bt 087	
Cry1Cb-like	AAX63901	Thammasittirong et al	2005	Bt TA476-1	secuencia insuficiente
Cry1Da1	CAA38099	Hofte et al	1990	Bt aizawai HD68	
Cry1Da2	176415	Payne & Sick	1997		Solo la secuencia de ADN
Cry1Db1	CAA80234	Lambert	1993	Bt BTS00349A	
Cry1Db2	AAK48937	Li et al	2001	Bt B-Pr-88	
Cry1Dc1	ABK35074	Lertwiriawong et al	2006	BtJC291	
Cry1Ea1	CAA37933	Visser et al	1990	Bt kenyae 4F1	
Cry1Ea2 Ea2	CAA39609	Bosse et al	1990	Bt kenyae	

ES 2 663 283 T3

Nombre	Nº. entrada	Autores	Año	Cepa fuente	Comentario
Cry1Ea3	AAA22345	Feitelson	1991	Bt kenyae PS81F	
Cry1Ea4	AAD04732	Barboza-Corona et al	1998	Bt kenyae LBIT-147	
Cry1Ea5	A15535	Botterman et al	1994		Solo la secuencia de ADN
Cry1Ea6	AAL50330	Sun et al	1999	Bt YBT-032	
Cry1Ea7	AAW72936	Huehne et al	2005	Bt JC190	
Cry1Ea8	ABX11258	Huang et al	2007	Bt HZM2	
Cry1Eb1	AAA22346	Feitelson	1993	Bt aizawai PS81A2	
Cry1Fa1	AAA22348	Chambers et al	1991	Bt aizawai EG6346	
Cry1Fa2	AAA22347	Feitelson	1993	Bt aizawai PS81I	
Cry1Fb1	CAA80235	Lambert	1993	Bt BTS00349A	
Cry1Fb2	BAA25298	Masuda & Asano	1998	Bt morrisoni INA67	
Cry1Fb3	AAF21767	Song et al	1998	Bt morrisoni	
Cry1Fb4	AAC10641	Payne et al	1997		
Cry1Fb5	AAO13295	Li et al	2001	Bt B-Pr-88	
Cry1Fb6	ACD50892	Huang et al	2008	Bt 012	
Cry1Fb7	ACD50893	Huang et al	2008	Bt 087	
Cry1Ga1	CAA80233	Lambert	1993	Bt BTS0349A	
Cry1Ga 2	CAA70506	Shevelev et al	1997	Bt wuhanensis	
Cry1Gb1	AAD10291	Kuo & Chak	1999	Bt wuhanensis HD525	
Cry1Gb2	AAO13756	Li et al	2000	Bt B-Pr-88	
Cry1Gc	AAQ52381	Baum et al	2003		
Cry1Ha1	CAA80236	Lambert	1993	Bt BTS02069AA	
Cry1Hb1	AAA79694	Koo et al	1995	Bt morrisoni BF190	
Cry1H-like	AAF01213	Srifah et al	1999	Bt JC291	secuencia insuficiente
Cry1Ia1	CAA44633	Taylor et al	1992	Bt kurstaki	
Cry1Ia2	AAA22354	Gleave et al	1993	Bt kurstaki	
Cry1Ia3	AAC36999	Shin et al	1995	Bt kurstaki HD1	
Cry1Ia4	AAB00958	Kostichka et al	1996	Bt AB88	
Cry1Ia5	CAA70124	Selvapandiyan	1996	Bt 61	
Cry1Ia6	AAC26910	Zhong et al	1998	Bt kurstaki S101	
Cry1Ia7	AAM73516	Porcar et al	2000	Bt	
Cry1Ia8	AAK66742	Song et al	2001		
Cry1Ia9	AAQ08616	Yao et al	2002	Bt Ly30	
Cry1Ia10	AAP86782	Espindola et al	2003	Bt thuringiensis	

ES 2 663 283 T3

Nombre	Nº. entrada	Autores	Año	Cepa fuente	Comentario
Cry1Ia11	CAC85964	Tounsi et al	2003	Bt kurstaki BNS3	
Cry1Ia12	AAV53390	Grossi de Sa et al	2005	Bt	
Cry1Ia13	ABF83202	Martins et al	2006	Bt	
Cry1Ia14	ACG63871	Liu & Guo	2008	Bt11	
Cry1Ia15	FJ617445	Guan Peng et al	2009	Bt E-1B	Sin enlace NCBI Julio 2009
Cry1Ia16	FJ617448	Guan Peng et al	2009	Bt E-1A	Sin enlace NCBI Julio 2009
Cry1Ib1	AAA82114	Shin et al	1995	Bt entomocidus BP465	
Cry1Ib2	ABW88019	Guan et al	2007	BtPP61	
Cry1Ib3	ACD75515	Liu & Guo	2008	Bt GS8	
Cry1Ic1	AAC62933	Osman et al	1998	Bt C18	
Cry1Ic2	AAE71691	Osman et al	2001		
Cry1Id1	AAD44366	Choi	2000		
Cry1Ie1	AAG43526	Song et al	2000	Bt BTC007	
Cry1If1	AAQ52382	Baum et al	2003		
Cry1I-like	AAC31094	Payne et al	1998		secuencia insuficiente
Cry1I-like	ABG88859	Lin & Fang	2006	Bt ly4a3	secuencia insuficiente
Cry1Ja1	AAA22341	Donovan	1994	Bt EG5847	
Cry1Jb1	AAA98959	Von Tersch & Gonzalez	1994	Bt EG5092	
Cry1Jc1	AAC31092	Payne et al	1998		
Cry1Jc2	AAQ52372	Baum et al	2003		
Cry1Jd1	CAC50779	Arnaut et al	2001	Bt	
Cry1Ka1	AAB00376	Koo et al	1995	Bt morrisoni BF190	
Cry1La1	AAS60191	Je et al	2004	Bt kurstaki K1	
Cry1-like	AAC31091	Payne et al	1998		secuencia insuficiente
Cry2Aa1	AAA22335	Donovan et al	1989	Bt kurstaki	
Cry2Aa2	AAA83516	Widner & Whiteley	1989	Bt kurstaki HD1	
Cry2Aa3	D86064	Sasaki et al	1997	Bt sotto	Solo la secuencia de ADN
Cry2Aa4	AAC04867	Misra et al	1998	Bt kenyae HD549	
Cry2Aa5	CAA10671	Yu & Pang	1999	Bt SL39	
Cry2Aa6	CAA10672	Yu & Pang	1999	Bt YZ71	
Cry2Aa7	CAA10670	Yu & Pang	1999	Bt CY29	
Cry2Aa8	AAO13734	Wei et al	2000	Bt Dongbei 66	

ES 2 663 283 T3

Nombre	Nº. entrada	Autores	Año	Cepa fuente	Comentario
Cry2Aa9	AAO13750	Zhang et al	2000		
Cry2Aa10	AAQ04263	Yao et al	2001		
Cry2Aa11	AAQ52384	Baum et al	2003		
Cry2Aa12	ABI83671	Tan et al	2006	Bt Rpp39	
Crv2Aa13	ABL01536	Arango et al	2008	But 146-158-01	
Cry2Aa14	ACF04939	Hire et al	2008	Bt HD-550	
Cry2Ab1	AAA22342	Widner & Whiteley	1989	Bt kurstaki HD1	
Cry2Ab2	CAA39075	Dankocsik et al	1990	Bt kurstaki HD1	
Cry2Ab3	AAG36762	Chen et al	1999	Bt BTC002	
Cry2Ab4	AAO13296	Li et al	2001	Bt B-Pr-88	
Cry2Ab5	AAQ04609	Yao et al	2001	Bt ly30	
Cry2Ab6	AAP59457	Wang et al	2003	Bt WZ-7	
Cry2Ab7	AAZ66347	Udayasuriyan et al	2005	Bt 14-1	
Cry2Ab8	ABC95996	Huang et al	2006	Bt WB2	
Cry2Ab9	ABC74968	Zhang et al	2005	Bt LLB6	
Cry2Ab10	EF157306	Lin et al	2006	Bt LyD	
Cry2Ab11	CAM84575	Saleem et al	2007	Bt CMBL-BT1	
Cry2Ab12	ABM21764	Lin et al	2007	Bt LyD	
Cry2Ab13	ACG76120	Zhu et al	2008	Bt ywc5-4	
Cry2Ab14	ACG76121	Zhu et al	2008	Bt Bts	
Cry2Ac1	CAA40536	Aronson	1991	Bt shanghai S1	
Cry2Ac2	AAG35410	Song et al	2000		
Cry2Ac3	AAQ52385	Baum et al	2003		
Cry2Ac4	ABC95997	Huang et al	2006	Bt WB9	
Cry2Ac5	ABC74969	Zhang et al	2005		
Cry2Ac6	ABC74793	Xia et al	2006	Bt wuhanensis	
Cry2Ac7	CAL18690	Saleem et al	2008	Bt SBSBT-1	
Cry2Ac8	CAM09325	Saleem et al	2007	Bt CMBL-BT1	
Cry2Ac9	CAM09326	Saleem et al	2007	Bt CMBL-BT2	
Cry2Ac10	ABN15104	Bai et al	2007	Bt QCL-1	
Cry2Ac11	CAM83895	Saleem et al	2007	Bt HD29	
Cry2Ac12	CAM83896	Saleem et al	2007	Bt CMBL-BT3	
Cry2Ad1	AAF09583	Choi et al	1999	Bt BR30	
Cry2Ad2	ABC86927	Huang et al	2006	Bt WB10	

ES 2 663 283 T3

Nombre	Nº. entrada	Autores	Año	Cepa fuente	Comentario
Cry2Ad3	CAK29504	Saleem et al	2006	Bt 5_2AcT(1)	
Cry2Ad4	CAM32331	Saleem et al	2007	Bt CMBL-BT2	
Cry2Ad5	CAO78739	Saleem et al	2007	Bt HD29	
Cry2Ae1	AAQ52362	Baum et al	2003		
Cry2Af1	ABO30519	Beard et al	2007	Bt C81	
Cry2Ag	ACH91610	Zhu et al	2008	Bt JF19-2	
Cry2Ah	EU939453	Zhang et al	2008	Bt	Sin enlace NCBI Julio 09
Cry2Ah2	ACL80665	Zhang et al	2009	Bt BRC-ZQL3	
Cry2Ai	FJ788388	Udayasuriyan et al	2009	Bt	Sin enlace NCBI Julio 09
Cry3Aa1	AAA22336	Herrnstadt et al	1987	Bt san diego	
Cry3Aa2	AAA22541	Sekar et al	1987	Bt tenebrionis	
Cry3Aa3	CAA68482	Hofte et al	1987		
Cry3Aa4	AAA22542	McPherson et al	1988	Bt tenebrionis	
Cry3Aa5	AAA50255	Donovan et al	1988	Bt morrisoni EG2158	
Cry3Aa6	AAC43266	Adams et al	1994	Bt tenebrionis	
Cry3Aa7	CAB41411	Zhang et al	1999	Bt 22	
Cry3Aa8	AAS79487	Gao and Cai	2004	Bt YM-03	
Cry3Aa9	AAWO659	Bulla and Candas	2004	Bt UTD-001	
Cry3Aa10	AAU29411	Chen et al	2004	Bt 886	
Cry3Aa11	AAW82872	Kurt et al	2005	Bt tenebrionis Mm2	
Cry3Aa12	ABY49136	Sezen et al	2008	Bt tenebrionis	
Cry3Ba1	CAA34983	Sick et al	1990	Bt tolworthi 43F	
Cry3Ba2	CAA00645	Peferoen et al	1990	Bt PGSI208	
Cry3Bb1	AAA22334	Donovan et al	1992	Bt EG4961	
Cry3Bb2	AAA74198	Donovan et al	1995	Bt EG5144	
Cry3Bb3	I15475	Peferoen et al	1995		Solo la secuencia de ADN
Cry3Ca1	CAA42469	Lambert et al	1992	Bt kurstaki Btl109P	
Cry4Aa1	CAA68485	Ward & Ellar	1987	Bt israelensis	
Cry4Aa2	BAA00179	Sen et al	1988	Bt israelensis HD522	
Cry4Aa3	CAD30148	Berry et al	2002	Bt israelensis	
Cry4A-like	AA96321	Mahalakshmi et al	2005	Bt LDC-9	secuencia insuficiente
Cry4Ba1	CAA30312	Chungjatpornchai et al	1988	Bt israelensis 4Q2-72	
Cry4Ba2	CAA30114	Tungpradubkul et al	1988	Bt israelensis	
Cry4Ba3	AAA22337	Yamamoto et al	1988	Bt israelensis	

ES 2 663 283 T3

Nombre	Nº. entrada	Autores	Año	Cepa fuente	Comentario
Cry4Ba4	BAA00178	Sen et al	1988	Bt israelensis HD522	
Cry4Ba5	CAD30095	Berry et al	2002	Bt israelensis	
Cry4Ba-like	ABC47686	Mahalakshmi et al	2005	Bt LDC-9	secuencia insuficiente
Cry4Ca1	EU646202	Shu et al	2008		Sin enlace NCBI Julio 09
Cry4Cb1	FJ403208	Jun & Furong	2008	Bt HS18-1	Sin enlace NCBI Julio 09
Cry4Cb2	FJ597622	Jun & Furong	2008	Bt Ywc2-8	Sin enlace NCBI Julio 09
Cry4Cc1	FJ403207	Jun & Furong	2008	Bt MC28	Sin enlace NCBI Julio 09
Cry5Aa1	AAA67694	Narva et al	1994	Bt darmstadiensis PS17	
Cry5Ab1	AAA67693	Narva et al	1991	Bt darmstadiensis PS17	
Cry5Ac1	I34543	Payne et al	1997		Solo la secuencia de ADN
Cry5Ad1	ABQ82087	Lenane et al	2007	Bt L366	
Cry5Ba1	AAA68598	Foncerrada & Narva	1997	Bt PS86Q3	
Cry5Ba2	ABW88932	Guo et al	2008	YBT 1518	
Cry6Aa1	AAA22357	Narva et al	1993	Bt PS52A1	
Cry6Aa2	AAM46849	Bai et al	2001	YBT 1518	
Cry6Aa3	ABH03377	Jia et al	2006	Bt 96418	
Cry6Ba1	AAA22358	Narva et al	1991	Bt PS69D1	
Cry7Aa1	AAA22351	Lambert et al	1992	Bt galleriae PGSI245	
Cry7Ab1	AAA21120	Narva & Fu	1994	Bt dakota HD511	
Cry7Ab2	AAA21121	Narva & Fu	1994	Bt kumamotoensis 867	
Cry7Ab3	ABX24522	Song et al	2008	Bt WZ-9	
Cry7Ab4	EU380678	Shu et al	2008	Bt	Sin enlace NCBI Julio 09
Cry7Ab5	ABX79555	Aguirre-Arzola et al	2008	Bt monterrey GM-33	
Cry7Ab6	ACI44005	Deng et al	2008	Bt HQ122	
Cry7Ab7	FJ940776	Wang et al	2009		Sin enlace NCBI Sept 09
Cry7Ab8	GU145299	Feng Jing	2009		Sin enlace NCBI Nov 09
Cry7Ba1	ABB70817	Zhang et al	2006	Bt huazhongensis	
Cry7Ca1	ABR67863	Gao et al	2007	Bt BTH-13	
Cry7Da1	ACQ99547	Yi et al	2009	Bt LH-2	
Cry8Aa1	AAA21117	Narva & Fu	1992	Bt kumamotoensis	
Cry8Ab1	EU044830	Cheng et al	2007	Bt B-JJX	Sin enlace NCBI Julio 09
Cry8Ba1	AAA21118	Narva & Fu	1993	Bt kumamotoensis	

ES 2 663 283 T3

Nombre	Nº. entrada	Autores	Año	Cepa fuente	Comentario
Cry8Bb1	CAD57542	Abad et al	2002		
Cry8Bc1	CAD57543	Abad et al	2002		
Cry8Ca1	AAA21119	Sato et al.	1995	Bt japonensis Buibui	
Cry8Ca2	AAR98783	Shu et al	2004	Bt HBF-1	
Cry8Ca3	EU625349	Du et al	2008	Bt FTL-23	Sin enlace NCBI Julio 09
Cry8Da1	BAC07226	Asano et al	2002	Bt galleriae	
Cry8Da2	BD133574	Asano et al	2002	Bt	Solo la secuencia de ADN
Cry8Da3	BD133575	Asano et al	2002	Bt	Solo la secuencia de ADN
Cry8Db1	BAF93483	Yamaguchi et al	2007	Bt BBT2-5	
Cry8Ea1	AAQ73470	Fuping et al	2003	Bt 185	
Cry8Ea2	EU047597	Liu et al	2007	Bt B-DLL	Sin enlace NCBI Julio 09
Cry8Fa1	AAT48690	Shu et al	2004	Bt 185	también AAW81032
Cry8Ga1	AAT46073	Shu et al	2004	Bt HBF-18	
Cry8Ga2	ABC42043	Yan et al	2008	Bt 145	
Cry8Ga3	FJ198072	Xiaodong et al	2008	Bt FCD114	Sin enlace NCBI Julio 09
Cry8Ha1	EF465532	Fuping et al	2006	Bt 185	Sin enlace NCBI Julio 09
Cry8Ia1	EU381044	Yan et al	2008	Bt su4	Sin enlace NCBI Julio 09
Cry8Ja1	EU625348	Du et al	2008	Bt FPT-2	Sin enlace NCBI Julio 09
Cry8Ka1	FJ422558	Quezado et al	2008		Sin enlace NCBI Julio 09
Cry8Ka2	ACN87262	Noguera & Ibarra	2009	Bt kenya	
Cry8-like	FJ770571	Noguera & Ibarra	2009	Bt canadensis	Solo la secuencia de ADN
Cry8-like	ABS53003	Mangena et al	2007	Bt	
Cry9Aa1	CAA41122	Shevelev et al	1991	Bt galleriae	
Cry9Aa2	CAA41425	Gleave et al	1992	Bt DSIR517	
Cry9Aa3	GQ249293	Su et al	2009	Bt SC5(D2)	Sin enlace NCBI Julio 09
Cry9Aa4	GQ249294	Su et al	2009	Bt T03C001	Sin enlace NCBI Julio 09
Cry9Aa like	AAQ52376	Baum et al.	2003		secuencia incompleta
Cry9Ba1	CAA52927	Shevelev et al	1993	Bt galleriae	
Cry9Bb1	AAV28716	Silva-Werneck et al	2004	Btjaponensis	
Cry9Ca1	CAA85764	Lambert et al	1996	Bt tolworthi	
Cry9Ca2	AAQ52375	Baum et al	2003		
Cry9Da1	BAA 19948	Asano	1997	Bt japonensis N141	
Cry9Da2	AAB97923	Wasano & Ohba	1998	Bt japonensis	
Cry9Da3	GQ249295	Su et al	2009	Bt T03B001	Sin enlace NCBI Julio 09

ES 2 663 283 T3

Nombre	Nº. entrada	Autores	Año	Cepa fuente	Comentario
Cry9Da4	GQ249297	Su et al	2009	Bt T03B001	Sin enlace NCBI Julio 09
Cry9Db1	AAX78439	Flannagan & Abad	2005	Bt kurstaki DP1019	
Cry9Ea1	BAA34908	Midoh & Oyama	1998	Bt aizawai SSK-10	
Cry9Ea2	AAO12908	Li et al	2001	Bt B-Hm-16	
Cry9Ea3	ABM21765	Lin et al	2006	Bt IyA	
Cry9Ea4	ACE88267	Zhu et al	2008	Bt ywc5-4	
Cry9Ea5	ACF04743	Zhu et al	2008	Bts	
Cry9Ea6	ACG63872	Liu & Guo	2008	Bt 11	
Cry9Ea7	FJ380927	Sun et al	2008		Sin enlace NCBI Julio 09
Cry9Ea8	GQ249292	Su et al	2009	GQ249292	Sin enlace NCBI Julio 09
Cry9Eb1	CAC50780	Arnaut et al	2001		
Cry9Eb2	GQ249298	Su et al	2009	Bt T03B001	Sin enlace NCBI Julio 09
Cry9Ec1	AAC63366	Wasano et al	2003	Bt galleriae	
Cry9Ed1	AAX78440	Flannagan & Abad	2005	Bt kurstaki DP1019	
Cry9Ee1	GQ249296	Su et al	2009	Bt T03B001	Sin enlace NCBI Aug 09
Cry9-like	AAC63366	Wasano et al	1998	Bt galleriae	secuencia insuficiente
Cry10Aa1	AAA22614	Thorne et al	1986	Bt israelensis	
Cry10Aa2	E00614	Aran & Toomasu	1996	Bt israelensis ONR-60A	Solo la secuencia de ADN
Cry10Aa3	CAD30098	Berry et al	2002	Bt israelensis	
Cry10Alike	DQ167578	Mahalakshmi et al	2006	Bt LDC-9	secuencia incompleta
Cry11Aa1	AAA22352	Donovan et al	1988	Bt israelensis	
Cry11Aa2	AAA22611	Adams et al	1989	Bt israelensis	
Cry11Aa3	CAD30081	Berry et al	2002	Bt israelensis	
Cry11Aa-like	DQ166531	Mahalakshmi et al	2007	Bt LDC-9	secuencia incompleta
Cry11Ba1	CAA60504	Delecluse et al	1995	Bt jegathesan 367	
Cry11Bb1	AAC97162	Orduz et al	1998	Bt medellin	
Cry12Bb1	AAA22355	Narva et al	1991	Bt PS33F2	
Cry13Bb1	AAA22356	Narva et al	1992	Bt PS63B	
Cry14Aa1	AAA21516	Narva et al	1994	Bt sotto PS80JJ1	
Cry15Aa1	AAA22333	Brown & Whiteley	1992	Bt thompsoni	
Cry16Aa1	CAA63860	Barloy et al	1996	Cb malaysia CH18	
Cry17Aa1	CAA67841	Barloy et al	1998	Cb malaysia CH18	
Cry18Aa1	CAA67506	Zhang et al	1997	Paenibacillus popilliae	
Cry18Ba1	AAF89667	Patel et al	1999	Paenibacillus popilliae	

ES 2 663 283 T3

Nombre	Nº. entrada	Autores	Año	Cepa fuente	Comentario
Cry18Ca1	AAF89668	Patel et al	1999	Paenibacillus popilliae	
Cry19Aa1	CAA68875	Rosso & Delecluse	1996	Bt jegathesan 367	
Cry19Ba1	BAA32397	Hwang et al	1998	Bt higo	
Cry20Aa1	AAB93476	Lee & Gill	1997	Bt fukuokaensis	
Cry20Ba1	ACS93601	Noguera & Ibarra	2009	Bt higo LBIT-976	
Cry20-like	GQ144333	Yi et al	2009	Bt Y-5	Solo la secuencia de ADN
Cry21Aa1	I32932	Payne et al	1996		Solo la secuencia de ADN
Cry21Aa2	I66477	Feitelson	1997		Solo la secuencia de ADN
Cry21Ba1	BAC06484	Sato & Asano	2002	Bt roskildiensis	
Cry22Aa1	I34547	Payne et al	1997		Solo la secuencia de ADN
Cry22Aa2	CAD43579	Isaac et al	2002	Bt	
Cry22Aa3	ACD93211	Du et al	2008	Bt FZ-4	
Cry22Ab1	AAK50456	Baum et al	2000	Bt EG4140	
Cry22Ab2	CAD43577	Isaac et al	2002	Bt	
Cry22Ba1	CAD43578	Isaac et al	2002	Bt	
Cry23Aa1	AAF76375	Donovan et al	2000	Bt	Binario con Cry37Aa1
Cry24Ba1	AAC61891	Kawalek and Gill	1998	Bt jegathesan	
Cry24Ba1	BAD32657	Ohgushi et al	2004	Bt sotto	
Cry24Ca1	CAJ43600	Beron & Salerno	2005	Bt FCC-41	
Cry25Aa1	AAC61892	Kawalek and Gill	1998	Bt jegathesan	
Cry26Aa1	AAD25075	Wojciechowska et al	1999	Bt finitimus B-1166	
Cry27Aa1	BAA82796	Saitoh	1999	Bt higo	
Cry28Aa1	AAD24189	Wojciechowska et al	1999	Bt finitimus B-1161	
Cry28Aa2	AAG00235	Moore y Debro	2000	Bt finitimus	
Cry29Aa1	CAC80985	Delecluse et al	2000	Bt medellin	
Cry30Aa1	CAC80986	Delecluse et al	2000	Bt medellin	
Cry30Ba1	BAD00052	Ito et al	2003	Bt entomocidus	
Cry30Ca1	BAD67157	Ohgushi et al	2004	Bt sotto	
Cry30Ca2	ACU24781	Sun and Park	2009	Bt jegathesan 367	
Cry30Da1	EF095955	Shu et al	2006	Bt Y41	Sin enlace NCBI Julio 09
Cry30Db1	BAE80088	Kishida et al	2006	Bt aizawai BUN1-14	
Cry30Ea1	ACC95445	Fang et al	2007	BtS2160-1	
Cry30Ea2	FJ499389	Jun et al	2008	Bt Ywc2-8	Sin enlace NCBI July09

ES 2 663 283 T3

Nombre	Nº. entrada	Autores	Año	Cepa fuente	Comentario
Cry30Fa1	ACI22625	Tan et al	2008	Bt MC28	
Cry30Ga1	ACG60020	Zhu et al	2008	Bt HS 18-1	
Cry31Aa1	BAB11757	Saitoh & Mizuki	2000	Bt 84-HS-1-11	
Cry31Aa2	AAL87458	Jung and Cote	2000	Bt M15	
Cry31Aa3	BAE79808	Uemori et al	2006	Bt B0195	
Cry31Aa4	BAF32571	Yasutake et al	2006	Bt 79-25	
Cry31Aa5	BAF32572	Yasutake et al	2006	Bt 92-10	
Cry31Ab1	BAE79809	Uemori et al	2006	Bt B0195	
Cry31Ab2	BAF32570	Yasutake et al	2006	Bt 31-5	
Cry31Ac1	BAF34368	Yasutake et al	2006	Bt 87-29	
Cry32Aa1	AAG36711	Balasubramanian et al	2001	Bt yunnanensis	
Cry32Ba1	BAB78601	Takebe et al	2001	Bt	
Cry32Ca1	BAB78602	Takebe et al	2001	Bt	
Cry32Da1	BAB78603	Takebe et al	2001	Bt	
Cry33Aa1	AAL26871	Kim et al	2001	Bt dakota	
Cry34Aa1	AAG50341	Ellis et al	2001	Bt PS80JJ1	Binario con Cry35Aa1
Cry34Aa2	AAK64560	Rupar et al	2001	Bt EG5899	Binario con Cry35Aa2
Cry34Aa3	AAT29032	Schnepf et al	2004	Bt PS69Q	Binario con Cry35Aa3
Cry34Aa4	AAT29030	Schnepf et al	2004	Bt PS185GG	Binario con Cry35Aa4
Cry34Ab1	AAG41671	Moellenbeck et al	2001	Bt PS149B1	Binario con Cry35Ab1
Cry34Ac1	AAG50118	Ellis et al	2001	Bt PS167H2	Binario con Cry35Ac1
Cry34Ac2	AAK64562	Rupar et al	2001	Bt EG9444	Binario con Cry35Ab2
Cry34Ac3	AAT29029	Schnepf et al	2004	Bt KR1369	Binario con Cry35Ab3
Cry34Ba1	AAK64565	Rupar et al	2001	Bt EG4851	Binario con Cry35Ba1
Cry34Ba2	AAT29033	Schnepf et al	2004	Bt PS201L3	Binario con Cry35Ba2
Cry34Ba3	AAT29031	Schnepf et al	2004	Bt PS201HH2	Binario con Cry35Ba3
Cry35Aa1	AAG50342	Ellis et al	2001	Bt PS80JJ1	Binario con Cry34Aa1
Cry35Aa2	AAK64561	Rupar et al	2001	Bt EG5899	Binario con Cry34Aa2
Cry35Aa3	AAT29028	Schnepf et al	2004	Bt PS69Q	Binario con Cry34Aa3
Cry35Aa4	AAT29025	Schnepf et al	2004	Bt PS185GG	Binario con Cry34Aa4
Cry35Ab1	AAG41672	Moellenbeck et al	2001	Bt PS149B1	Binario con Cry34Ab1
Cry35Ab2	AAK64563	Rupar et al	2001	Bt EG9444	Binario con Cry34Ac2
Cry35Ab3	AY536891	AAT29024	2004	Bt KR1369	Binario con Cry34Ab3
Cry35Ac1	AAG50117	Ellis et al	2001	Bt PS167H2	Binario con Cry34Ac1

ES 2 663 283 T3

Nombre	Nº. entrada	Autores	Año	Cepa fuente	Comentario
Cry35Ba1	AAK64566	Rupar et al	2001	Bt EG4851	Binario con Cry34Ba1
Cry35Ba2	AAT29027	Schnepf et al	2004	BtPS201L3	Binario con Cry34Ba2
Cry35Ba3	AAT29026	Schnepf et al	2004	Bt PS201HH2	Binario con Cry34Ba3
Cry36Aa1	AAK64558	Rupar et al	2001	Bt	
Cry37Aa1	AAF76376	Donovan et al	2000	Bt	Binario con Cry23Aa
Cry38Aa1	AAK64559	Rupar et al	2000	Bt	
Cry39Aa1	BAB72016	Ito et al	2001	Bt aizawai	
Cry40Aa1	BAB72018	Ito et al	2001	Bt aizawai	
Cry40Ba1	BAC77648	Ito et al	2003	Bun1-14	
Cry40Ca1	EU381045	Shu et al	2008	Bt Y41	Sin enlace NCBI July09
Cry40Da1	ACF15199	Zhang et al	2008	Bt S2096-2	
Cry41Aa1	BAD35157	Yamashita et al	2003	Bt A1462	
Cry41Ab1	BAD35163	Yamashita et al	2003	Bt A1462	
Cry42Aa1	BAD35166	Yamashita et al	2003	Bt A1462	
Cry43Aa1	BAD15301	Yokoyama and Tanaka	2003	P. lentimorbus semadara	
Cry43Aa2	BAD95474	Nozawa	2004	P. popilliae popilliae	
Cry43Ba1	BAD15303	Yokoyama and Tanaka	2003	P. lentimorbus semadara	
Cry43-like	BAD15305	Yokoyama and Tanaka	2003	P. lentimorbus semadara	
Cry44Aa	BAD08532	Ito et al	2004	Bt entomocidus INA288	
Cry45Aa	BAD22577	Okumura et al	2004	Bt 89-T-34-22	
Cry46Aa	BAC79010	Ito et al	2004	Bt dakota	
Cry46Aa2	BAG68906	Ishikawa et al	2008	Bt A1470	
Cry46Ab	BAD35170	Yamagiwa et al	2004	Bt	
Cry47Aa	AAJ24695	Kongsuwan et al	2005	Bt CAA890	
Cry48Aa	CAJ18351	Jones and Berry	2005	Bs IAB59	Binario con 49Aa
Cry48Aa2	CAJ86545	Jones and Berry	2006	Bs 47-6B	Binario con 49Aa2
Cry48Aa3	CAJ86546	Jones and Berry	2006	Bs NHA15b	Binario con 49Aa3
Cry48Ab	CAJ86548	Jones and Berry	2006	Bs LP1G	Binario con 49Ab1
Cry48Ab2	CAJ86549	Jones and Berry	2006	Bs 2173	Binario con 49Aa4
Cry49Aa	CAH56541	Jones and Berry	2005	Bs IAB59	Binario con 48Aa
Cry49Aa2	CAJ86541	Jones and Berry	2006	Bs 47-6B	Binario con 48Aa2
Cry49Aa3	CAJ86543	Jones and Berry	2006	BsNHA15b	Binario con 48Aa3

ES 2 663 283 T3

Nombre	Nº. entrada	Autores	Año	Cepa fuente	Comentario
Cry49Aa4	CAJ86544	Jones and Berry	2006	Bs 2173	Binario con 48Ab2
Cry49Ab1	CAJ86542	Jones and Berry	2006	Bs LP1G	Binario con 48Ab1
Cry50Aa1	BAE86999	Ohgushi et al	2006	Bt sotto	
Cry51Aa1	ABI14444	Meng et al	2006	Bt F14-1	
Cry52Aa1	EF613489	Song et al	2007	Bt Y41	Sin enlace NCBI July09
Cry52Ba1	FJ361760	Jun et al	2008	Bt BM59-2	Sin enlace NCBI July09
Cry53Aa1	EF633476	Song et al	2007	Bt Y41	Sin enlace NCBI July09
Cry53Ab1	FJ361759	Jun et al	2008	Bt MC28	Sin enlace NCBI July09
Cry54Aa1	ACA52194	Tan et al	2009	Bt MC28	
Cry55Aa1	ABW88931	Guo et al	2008	YBT 1518	
Cry55Aa2	AAE33526	Bradfish et al	2000	BT Y41	
Cry56Aa1	FJ597621	Jun & Furong	2008	Bt Ywc2-8	Sin enlace NCBI July09
Cry56Aa2	GQ483512	Guan Peng et al	2009	Bt G7-1	Sin enlace NCBI Aug09
Cry57Aa1	ANC87261	Noguera & Ibarra	2009	Bt kim	
Cry58Aa1	ANC87260	Noguera & Ibarra	2009	Bt entomocidus	
Cry59Aa1	ACR43758	Noguera & Ibarra	2009	Bt kim LBIT-980	

Vip3Aa1	Vip3Aa	AAC37036	Estruch et al	1996	PNAS 93, 5389-5394	AB88	
Vip3Aa2	Vip3Ab	AAC37037	Estruch et al	1996	PNAS 93, 5389-5394	AB424	
Vip3Aa3	Vip3Ac		Estruch et al	2000	US 6137033 Oct 2000		
Vip3Aa4	PS36A Sup	AAR81079	Feitelson et al	1998	US 6656908 Dic 2003	Bt PS36A	WO9818 932(A2, A3) 7 Mayo 1998
Vip3Aa5	PS81F Sup	AAR81080	Feitelson et al	1998	US 6656908 Dic 2003	Bt PS81F	WO9818 932(A2, A3) 7 Mayo 1998
Vip3Aa6	Jav90 Sup	AAR81081	Feitelson et al	1998	US 6656908 Dic 2003	Bt	WO9818 932(A2, A3) 7 Mayo 1998
Vip3Aa7	Vip83	AAK95326	Cai et al	2001	no publicado	Bt YBT- 833	
Vip3Aa8	Vip3A	AAK97481	Loguercio et al	2001	no publicado	Bt HD125	
Vip3Aa9	VipS	CAA76665	Selvapandiyan et al	2001	no publicado	Bt A13	

ES 2 663 283 T3

Vip3Aa10	Vip3V	AAN60738	Doss et al	2002	Protein Expr. Purif. 26, 82-88	Bt	
Vip3Aa11	Vip3A	AAR36859	Liu et al	2003	no publicado	Bt C9	
Vip3Aa12	Vip3A-WB5	AAM22456	Wu and Guan	2003	no publicado	Bt	
Vip3Aa13	Vip3A	AAL69542	Chen et al	2002	Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao 18, 687-692	Bt S184	
Vip3Aa14	Vip	AAQ12340	Polumetia et al	2003	no publicado	Bt tolworthi	
Vip3Aa15	Vip3A	AAP51131	Wu et al	2004	no publicado	Bt WB50	
Vip3Aa16	Vip3LB	AAW65132	Mesrati et al	2005	FEMS Micro Lett 244, 353-358	Bt	
Vip3Aa17	Jav90		Feitelson et al	1999	US 6603063 Ago 2003	Javelin 1990	WO9957 282(A2, A3) 11 Nov 1999
Vip3Aa18		AAX49395	Cai and Xiao	2005	no publicado	Bt 9816C	
Vip3Aa19	Vip3ALD	DQ241674	Liu et al	2006	no publicado	Bt AL	
Vip3Aa19	Vip3A-1	DQ539887	Hart et al	2006	no publicado		
Vip3Aa20	Vip3A-2	DQ539888	Hart et al	2006	no publicado		
Vip3Aa21	Vip	ABD84410	Panbangred	2006	no publicado	Bt aizawai	
Vip3Aa22	Vip3A-LS1	AAY41427	Lu et al	2005	no publicado	Bt LS1	
Vip3Aa23	Vip3A-LS8	AAY41428	Lu et al	2005	no publicado	Bt LS8	
Vip3Aa24		BI 880913	Song et al	2007	no publicado	Bt WZ-7	
Vip3Aa25		EF608501	Hsieh et al	2007	no publicado		
Vip3Aa26		EU294496	Shen and Guo	2007	no publicado	Bt TF9	
Vip3Aa27		EU332167	Shen and Guo	2007	no publicado	Bt 16	
Vip3Aa28		FJ494817	Xiumei Yu	2008	no publicado	Bt JF23-8	
Vip3Aa29		FJ626674	Xieumei et al	2009	no publicado	Bt JF21-1	
Vip3Aa30		FJ626675	Xieumei et al	2009	no publicado	MD2-1	
Vip3Aa31		FJ626676	Xieumei et al	2009	no publicado	JF21-1	
Vip3Aa32		FJ626677	Xieumei et al	2009	no publicado	MD2-1	
Vip3Ab1	Vip3B	AAR40284	Feitelson et al	1999	US 6603063 Ago 2003	Bt KB59A4-	WO9957 282(A2, A3) 11Nov

						6	1999
Vip3Ab2	Vip3D	AAY88247	Feng and Shen	2006	no publicado	Bt	
.							
Vip3Ac1	PS49C		Narva et al.	Solicitud US 2004012871 6			
.							
Vip3Ad1	PS158C2		Narva et al	.	Solicitud US 2004012871 6		
Vip3Ad2	ISP3B	CAI43276	Van Rie et al	2005	no publicado	Bt	
.							
Vip3Ae1	ISP3C	CAI43277	Van Rie et al	2005	no publicado	Bt	
.							
Vip3Af1	ISP3A	CAI43275	Van Rie et al	2005	no publicado	Bt	
Vip3Af2	Vip3C	ADN08753	Syngenta	.	WO 03/075655		
.				.			
Vip3Ag1	Vip3B	ADN08758	Syngenta	.	WO 02/078437		
Vip3Ag2		FJ556803	Audtho et al	2008		Bt	
.							
Vip3Ah1	Vip3S	DQ832323	Li y Shen	2006	No publicado	Bt	
.							
Vip3Ba1		AAV70653	Rang et al	2004	no publicado		
.							
Vip3Bb1	Vip3Z	ADN08760	Syngenta	.	WO 03/075655		
Vip3Bb2		EF439819	Akhurst et al	2007			

Listado de secuencias

<110> DOW AGROSCIENCES LLC

<120> USO COMBINADO DE CRY1FA Y CRY1CA PARA EL MANEJO DE INSECTOS RESISTENTES

5 <130> DAS-P0162-US-01

<160> 5

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 1164

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> proteína quimérica DIG-152

ES 2 663 283 T3

400> 1

Met Asp Asn Asn Pro Asn Ile Asn Glu Cys Ile Pro Tyr Asn Cys Leu
 1 5 10 15

Ser Asn Pro Glu Glu Val Leu Leu Asp Gly Glu Arg Ile Ser Thr Gly
 20 25 30

Asn Ser Ser Ile Asp Ile Ser Leu Ser Leu Val Gln Phe Leu Val Ser
 35 40 45

Asn Phe Val Pro Gly Gly Gly Phe Leu Val Gly Leu Ile Asp Phe Val
 50 55 60

Trp Gly Ile Val Gly Pro Ser Gln Trp Asp Ala Phe Leu Val Gln Ile
 65 70 75 80

Glu Gln Leu Ile Asn Glu Arg Ile Ala Glu Phe Ala Arg Asn Ala Ala
 85 90 95

Ile Ala Asn Leu Glu Gly Leu Gly Asn Asn Phe Asn Ile Tyr Val Glu
 100 105 110

Ala Phe Lys Glu Trp Glu Glu Asp Pro Lys Asn Pro Ala Thr Arg Thr
 115 120 125

Arg Val Ile Asp Arg Phe Arg Ile Leu Asp Gly Leu Leu Glu Arg Asp
 130 135 140

Ile Pro Ser Phe Arg Ile Ser Gly Phe Glu Val Pro Leu Leu Ser Val
 145 150 155 160

ES 2 663 283 T3

Tyr Ala Gln Ala Ala Asn Leu His Leu Ala Ile Leu Arg Asp Ser Val
 165 170 175
 Ile Phe Gly Glu Arg Trp Gly Leu Thr Thr Ile Asn Val Asn Glu Asn
 180 185 190
 Tyr Asn Arg Leu Ile Arg His Ile Asp Glu Tyr Ala Asp His Cys Ala
 195 200 205
 Asn Thr Tyr Asn Arg Gly Leu Asn Asn Leu Pro Lys Ser Thr Tyr Gln
 210 215 220
 Asp Trp Ile Thr Tyr Asn Arg Leu Arg Arg Asp Leu Thr Leu Thr Val
 225 230 235 240
 Leu Asp Ile Ala Ala Phe Phe Pro Asn Tyr Asp Asn Arg Arg Tyr Pro
 245 250 255
 Ile Gln Pro Val Gly Gln Leu Thr Arg Glu Val Tyr Thr Asp Pro Leu
 260 265 270
 Ile Asn Phe Asn Pro Gln Leu Gln Ser Val Ala Gln Leu Pro Thr Phe
 275 280 285
 Asn Val Met Glu Asn Ser Ala Ile Arg Asn Pro His Leu Phe Asp Ile
 290 295 300
 Leu Asn Asn Leu Thr Ile Phe Thr Asp Trp Phe Ser Val Gly Arg Asn
 305 310 315 320
 Phe Tyr Trp Gly Gly His Arg Val Ile Ser Ser Leu Ile Gly Gly Gly
 325 330 335
 Asn Ile Thr Ser Pro Ile Tyr Gly Arg Glu Ala Asn Gln Glu Pro Pro
 340 345 350
 Arg Ser Phe Thr Phe Asn Gly Pro Val Phe Arg Thr Leu Ser Asn Pro
 355 360 365
 Thr Leu Arg Leu Leu Gln Gln Pro Trp Pro Ala Pro Pro Phe Asn Leu
 370 375 380
 Arg Gly Val Glu Gly Val Glu Phe Ser Thr Pro Thr Asn Ser Phe Thr
 385 390 395 400
 Tyr Arg Gly Arg Gly Thr Val Asp Ser Leu Thr Glu Leu Pro Pro Glu
 405 410 415
 Asp Asn Ser Val Pro Pro Arg Glu Gly Tyr Ser His Arg Leu Cys His

ES 2 663 283 T3

Glu Arg Asn Leu Leu Gln Asp Pro Asn Phe Arg Gly Ile Asn Arg Gln
 690 695 700
 Leu Asp Arg Gly Trp Arg Gly Ser Thr Asp Ile Thr Ile Gln Gly Gly
 705 710 715 720
 Asp Asp Val Phe Lys Glu Asn Tyr Val Thr Leu Leu Gly Thr Phe Asp
 725 730 735
 Glu Cys Tyr Pro Thr Tyr Leu Tyr Gln Lys Ile Asp Glu Ser Lys Leu
 740 745 750
 Lys Ala Tyr Thr Arg Tyr Gln Leu Arg Gly Tyr Ile Glu Asp Ser Gln
 755 760 765
 Asp Leu Glu Ile Tyr Leu Ile Arg Tyr Asn Ala Lys His Glu Thr Val
 770 775 780
 Asn Val Pro Gly Thr Gly Ser Leu Trp Pro Leu Ser Ala Pro Ser Pro
 785 790 795 800
 Ile Gly Lys Cys Ala His His Ser His His Phe Ser Leu Asp Ile Asp
 805 810
 Val Gly Cys Thr Asp Leu Asn Glu Asp Leu Gly Val Trp Val Ile Phe
 820 825 830
 Lys Ile Lys Thr Gln Asp Gly His Ala Arg Leu Gly Asn Leu Glu Phe
 835 840 845
 Leu Glu Glu Lys Pro Leu Val Gly Glu Ala Leu Ala Arg Val Lys Arg
 850 855 860
 Ala Glu Lys Lys Trp Arg Asp Lys Arg Glu Lys Leu Glu Trp Glu Thr
 865 870 875 880
 Asn Ile Val Tyr Lys Glu Ala Lys Glu Ser Val Asp Ala Leu Phe Val
 885 890 895
 Asn Ser Gln Tyr Asp Arg Leu Gln Ala Asp Thr Asn Ile Ala Met Ile
 900 905 910
 His Ala Ala Asp Lys Arg Val His Ser Ile Arg Glu Ala Tyr Leu Pro
 915 920 925
 Glu Leu Ser Val Ile Pro Gly Val Asn Ala Ala Ile Phe Glu Glu Leu
 930 935 940

ES 2 663 283 T3

Glu Gly Arg Ile Phe Thr Ala Phe Ser Leu Tyr Asp Ala Arg Asn Val
 945 950 955 960

Ile Lys Asn Gly Asp Phe Asn Asn Gly Leu Ser Cys Trp Asn Val Lys
 965 970 975

Gly His Val Asp Val Glu Glu Gln Asn Asn His Arg Ser Val Leu Val
 980 985 990

Val Pro Glu Trp Glu Ala Glu Val Ser Gln Glu Val Arg Val Cys Pro
 995 1000 1005

Gly Arg Gly Tyr Ile Leu Arg Val Thr Ala Tyr Lys Glu Gly Tyr
 1010 1015 1020

Gly Glu Gly Cys Val Thr Ile His Glu Ile Glu Asn Asn Thr Asp
 1025 1030 1035

Glu Leu Lys Phe Ser Asn Cys Val Glu Glu Glu Val Tyr Pro Asn
 1040 1045 1050

Asn Thr Val Thr Cys Asn Asp Tyr Thr Ala Thr Gln Glu Glu Tyr
 1055 1060 1065

Glu Gly Thr Tyr Thr Ser Arg Asn Arg Gly Tyr Asp Gly Ala Tyr
 1070 1075 1080

Glu Ser Asn Ser Ser Val Pro Ala Asp Tyr Ala Ser Ala Tyr Glu
 1085 1090 1095

Glu Lys Ala Tyr Thr Asp Gly Arg Arg Asp Asn Pro Cys Glu Ser
 1100 1105 1110

Asn Arg Gly Tyr Gly Asp Tyr Thr Pro Leu Pro Ala Gly Tyr Val
 1115 1120 1125

Thr Lys Glu Leu Glu Tyr Phe Pro Glu Thr Asp Lys Val Trp Ile
 1130 1135 1140

Glu Ile Gly Glu Thr Glu Gly Thr Phe Ile Val Asp Ser Val Glu
 1145 1150 1155

Leu Leu Leu Met Glu Glu
 1160

<210> 2

ES 2 663 283 T3

<211> 1164
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 5 <223> proteína quimérica DIG-109

<400> 2

Met Asp Asn Asn Pro Asn Ile Asn Glu Cys Ile Pro Tyr Asn Cys Leu
 1 5 10 15

Ser Asn Pro Glu Glu Val Leu Leu Asp Gly Glu Arg Ile Ser Thr Gly
 20 25 30

Asn Ser Ser Ile Asp Ile Ser Leu Ser Leu Val Gln Phe Leu Val Ser
 35 40 45

Asn Phe Val Pro Gly Gly Gly Phe Leu Val Gly Leu Ile Asp Phe Val
 50 55 60

Trp Gly Ile Val Gly Pro Ser Gln Trp Asp Ala Phe Leu Val Gln Ile
 65 70 75 80

Glu Gln Leu Ile Asn Glu Arg Ile Ala Glu Phe Ala Arg Asn Ala Ala
 85 90 95

Ile Ala Asn Leu Glu Gly Leu Gly Asn Asn Phe Asn Ile Tyr Val Glu
 100 105 110

Ala Phe Lys Glu Trp Glu Glu Asp Pro Lys Asn Pro Ala Thr Arg Thr
 115 120 125

Arg Val Ile Asp Arg Phe Arg Ile Leu Asp Gly Leu Leu Glu Arg Asp
 130 135 140

Ile Pro Ser Phe Arg Ile Ser Gly Phe Glu Val Pro Leu Leu Ser Val
 145 150 155 160

Tyr Ala Gln Ala Ala Asn Leu His Leu Ala Ile Leu Arg Asp Ser Val
 165 170 175

Ile Phe Gly Glu Arg Trp Gly Leu Thr Thr Ile Asn Val Asn Glu Asn
 180 185 190

Tyr Asn Arg Leu Ile Arg His Ile Asp Glu Tyr Ala Asp His Cys Ala
 195 200 205

Asn Thr Tyr Asn Arg Gly Leu Asn Asn Leu Pro Lys Ser Thr Tyr Gln
 210 215 220

Asp Trp Ile Thr Tyr Asn Arg Leu Arg Arg Asp Leu Thr Leu Thr Val

ES 2 663 283 T3

Leu Arg Arg Asn Thr Phe Gly Asp Phe Val Ser Leu Gln Val Asn Ile
 500 505 510

Asn Ser Pro Ile Thr Gln Arg Tyr Arg Leu Arg Phe Arg Tyr Ala Ser
 515 520 525

Ser Arg Asp Ala Arg Val Ile Val Leu Thr Gly Ala Ala Ser Thr Gly
 530 535 540

Val Gly Gly Gln Val Ser Val Asn Met Pro Leu Gln Lys Thr Met Glu
 545 550 555 560

Ile Gly Glu Asn Leu Thr Ser Arg Thr Phe Arg Tyr Thr Asp Phe Ser
 565 570 575

Asn Pro Phe Ser Phe Arg Ala Asn Pro Asp Ile Ile Gly Ile Ser Glu
 580 585 590

Gln Pro Leu Phe Gly Ala Gly Ser Ile Ser Ser Gly Glu Leu Tyr Ile
 595 600 605

Asp Lys Ile Glu Ile Ile Leu Ala Asp Ala Thr Leu Glu Ala Glu Ser
 610 615 620

Asp Leu Glu Arg Ala Gln Lys Ala Val Asn Ala Leu Phe Thr Ser Ser
 625 630 635 640

Asn Gln Ile Gly Leu Lys Thr Asp Val Thr Asp Tyr His Ile Asp Arg
 645 650 655

Val Ser Asn Leu Val Glu Cys Leu Ser Asp Glu Phe Cys Leu Asp Glu
 660 665 670

Lys Lys Glu Leu Ser Glu Lys Val Lys His Ala Lys Arg Leu Ser Asp
 675 680 685

Glu Arg Asn Leu Leu Gln Asp Pro Asn Phe Arg Gly Ile Asn Arg Gln
 690 695 700

Leu Asp Arg Gly Trp Arg Gly Ser Thr Asp Ile Thr Ile Gln Gly Gly
 705 710 715 720

Asp Asp Val Phe Lys Glu Asn Tyr Val Thr Leu Leu Gly Thr Phe Asp
 725 730 735

Glu Cys Tyr Pro Thr Tyr Leu Tyr Gln Lys Ile Asp Glu Ser Lys Leu
 740 745 750

ES 2 663 283 T3

Lys Ala Tyr Thr Arg Tyr Gln Leu Arg Gly Tyr Ile Glu Asp Ser Gln
 755 760 765
 Asp Leu Glu Ile Tyr Leu Ile Arg Tyr Asn Ala Lys His Glu Thr Val
 770 775 780
 Asn Val Pro Gly Thr Gly Ser Leu Trp Pro Leu Ser Ala Pro Ser Pro
 785 790 795 800
 Ile Gly Lys Cys Ala His His Ser His His Phe Ser Leu Asp Ile Asp
 805 810 815
 Val Gly Cys Thr Asp Leu Asn Glu Asp Leu Gly Val Trp Val Ile Phe
 820 825 830
 Lys Ile Lys Thr Gln Asp Gly His Ala Arg Leu Gly Asn Leu Glu Phe
 835 840 845
 Leu Glu Glu Lys Pro Leu Val Gly Glu Ala Leu Ala Arg Val Lys Arg
 850 855 860
 Ala Glu Lys Lys Trp Arg Asp Lys Arg Glu Lys Leu Glu Trp Glu Thr
 865 870 875 880
 Asn Ile Val Tyr Lys Glu Ala Lys Glu Ser Val Asp Ala Leu Phe Val
 885 890 895
 Asn Ser Gln Tyr Asp Arg Leu Gln Ala Asp Thr Asn Ile Ala Met Ile
 900 905 910
 His Ala Ala Asp Lys Arg Val His Ser Ile Arg Glu Ala Tyr Leu Pro
 915 920 925
 Glu Leu Ser Val Ile Pro Gly Val Asn Ala Ala Ile Phe Glu Glu Leu
 930 935 940
 Glu Gly Arg Ile Phe Thr Ala Phe Ser Leu Tyr Asp Ala Arg Asn Val
 945 950 955 960
 Ile Lys Asn Gly Asp Phe Asn Asn Gly Leu Ser Cys Trp Asn Val Lys
 965 970 975
 Gly His Val Asp Val Glu Glu Gln Asn Asn His Arg Ser Val Leu Val
 980 985 990
 Val Pro Glu Trp Glu Ala Glu Val Ser Gln Glu Val Arg Val Cys Pro
 995 1000 1005

ES 2 663 283 T3

Gly Arg Gly Tyr Ile Leu Arg Val Thr Ala Tyr Lys Glu Gly Tyr
 1010 1015 1020

Gly Glu Gly Cys Val Thr Ile His Glu Ile Glu Asn Asn Thr Asp
 1025 1030 1035

Glu Leu Lys Phe Ser Asn Cys Val Glu Glu Glu Val Tyr Pro Asn
 1040 1045 1050

Asn Thr Val Thr Cys Asn Asp Tyr Thr Ala Thr Gln Glu Glu Tyr
 1055 1060 1065

Glu Gly Thr Tyr Thr Ser Arg Asn Arg Gly Tyr Asp Gly Ala Tyr
 1070 1075 1080

Glu Ser Asn Ser Ser Val Pro Ala Asp Tyr Ala Ser Ala Tyr Glu
 1085 1090 1095

Glu Lys Ala Tyr Thr Asp Gly Arg Arg Asp Asn Pro Cys Glu Ser
 1100 1105 1110

Asn Arg Gly Tyr Gly Asp Tyr Thr Pro Leu Pro Ala Gly Tyr Val
 1115 1120 1125

Thr Lys Glu Leu Glu Tyr Phe Pro Glu Thr Asp Lys Val Trp Ile
 1130 1135 1140

Glu Ile Gly Glu Thr Glu Gly Thr Phe Ile Val Asp Ser Val Glu
 1145 1150 1155

Leu Leu Leu Met Glu Glu
 1160

<210> 3

<211> 3492

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Región de codificación DIG-109 optimizada para el maíz

<400> 3

atggataaca accccaacat taacgagtgc atcccgtaca actgcctctc gaatccagaa	60
gaagtgctct tggatggcga gaggatttcg actggcaaca gtcocatcga catttcctc	120
tccttggttc agttccttgt gtctaacttc gtcctggcg gtggcttctc tgttgcctt	180
atcgacttcg tctggggaat tgtcggacct tcccagtggt atgcgtttct ggtgcagata	240
gagcagctga tcaacgagag gatcgctgag ttcgcgagaa atgctgcaat cgccaacctt	300

10

ES 2 663 283 T3

gaagggcttg gcaacaactt caacatctac gtggaggcgt tcaaggagtg ggaagaggac 360
 cctaagaatc cagcgaccag aacgagggtt atagatcggg tccgcatcct cgatggcctt 420
 ttggagaggg acatcccagag cttccgcatt tcgggatttg aggttcctct gctctcagtc 480
 tacgctcaag ctgctaactc gcatctggcc atcttgaggg attcagtcac ctttggcgaa 540
 cgctggggtc ttacgactat caacgtgaac gagaactaca atcggttgat tcggcacata 600
 gacgagtatg ccgaccactg tgctaacacc tacaataggg gtctgaacaa tctgccaaag 660
 tcaacgtatc aagactggat aacctacaat aggctcagac gggacctcac tctcacctg 720
 ctggacatag ctgccttctt tccgaactac gacaaccgga gatatcctat tcaaccctt 780
 ggtcagctca ctgcgaggt ctacaccgat cccctcatca acttcaatcc ccagctgcaa 840
 tcggtcgcac agctgccac cttcaatgtg atggaaaact cagcgatccg gaatccccat 900
 ctgtttgaca tacttaacaa cctcactatc ttcaccgatt ggttttcagt tggacgcaac 960
 ttctactggg gagggcacag agtgatttca agcctcattg gaggaggaa cattacatcg 1020
 cctatctatg gaagggaggc caaccaagag ccaccaaggt ctttcacctt caacggctccg 1080
 gtgttcagaa cacttagcaa tcccacattg cgcttgctgc aacagccgtg gccagcacca 1140
 ccattcaatc tgaggggagt ggagggtgtg gagtctctga cgcctacaaa ctcccttacg 1200
 tacagaggca gagggacagt ggactcactg acagaactcc cacctgagga caactctgtt 1260
 cctccgaggg agggctactc gcaccggctt tgccatgcca ccttcgtcca gaggtctggc 1320
 acgccttttc tgaccactgg ggttgtcttt agctggactc accgctcagc gacgctgacc 1380
 aacacaatcg acccagagag gatcaatcag atccctctgg tgaagggtt tcgctgttg 1440
 ggtggcacia gcgtgatcac cggacctggt ttcactgggt gggatatacct cagacgcaat 1500
 acgtttggcg atttcgtgag ccttcaagtc aacatcaatt cccaatcac ccagagatat 1560
 cggctccgct tcagatacgc ctcatccaga gacgcaaggg tcatcgtcct tactggagca 1620
 gccagcaccg gagtccgagg ccaagttagc gtcaacatgc cgttgcagaa aacgatggaa 1680
 atcggtgaaa acctcaccag cagaaccttt cgtatacag atttcagcaa ccctttctcc 1740
 ttcagagcca atccggacat aatcggcata tccgagcagc ccttgctcgg tgctgggtcc 1800
 atctctctg gcgagctgta catcgacaag attgagatca ttctcgcaga tgcgactctc 1860
 gaggtgaat cggatcttga aagggcacag aaggcagtca acgctctctt caccagctca 1920
 aatcagattg gccttaagac cgatgttact gactatcata tcgacagagt ttctaactt 1980
 gtcgagtgcc tctccgacga gttctgtctc gacgaaaaga aggaactctc cgagaaagt 2040
 aagcacgcga aacgcctctc ggatgaacgg aacttgctgc aagatccgaa cttcagaggc 2100
 atcaatcgcc agttggatag aggtggagg ggatcaaccg acataacat tcaaggtggg 2160
 gatgatgtgt tcaaggaaaa ctacgtgaca ttgctgggca ccttcgacga gtgctatccc 2220
 acgtatctct atcagaagat tgacgagtc aagctcaaag cctacacag ctatcagctc 2280

ES 2 663 283 T3

agaggctaca ttgaggactc tcaagacctc gaaatctact tgatcagata caacgccaaag 2340
cacgagacgg tgaacgtccc tgggactggg tcaactgtggc cactgtcggc accctcgcca 2400
atcggaaaagt gcgctcacca cagccaccac ttctcccttg acatagatgt tgggtgtacg 2460
gacttgaatg aggatctggg tgtgtgggtg atctttaaga tcaagacca agatggtcat 2520
gcgaggcttg gcaaccttga gttccttga gagaagcctt tggtcggaga ggcactggct 2580
cgcgtgaaga gggctgagaa gaaatggagg gacaagaggg agaaactgga gtgggagacc 2640
aacatagtgt acaaggaggc caaggagtca gtggacgcac tgtttgtcaa ttcccagtat 2700
gataggctcc aagcggacac gaacatcgcc atgatccatg cagcggacaa gagggttcac 2760
tcacataaggg aggcctatct tccggagctg tcagtgattc ctgggggtcaa cgcagccatc 2820
tttgaggaat tggaaggag gatcttcacc gctttctctc tgtacgacgc tcggaacgtc 2880
atcaagaatg gtgatttcaa caatggactc agctgctgga acgtgaaagg gcatgtcgat 2940
gttgaagaac agaacaatca ccgcagcgtg ctggtggttc cggagtggga agccgaggtc 3000
tcacaagaag tcagagtgtg ccctgggagg ggttacatct tgcgggtcac agcctacaag 3060
gaaggttatg gcgaaggctg tgtcacgatc catgagatcg aaaacaacac agacgagctg 3120
aagttttcca actgtgttga ggaggaggtc tatecctaaca atactgttac gtgcaacgac 3180
tacacagcca ctcaagagga gtacgagggc acttacacct ctcgcaacag aggctacgac 3240
ggtgcctacg agtcaaacag ctccgtgcca gcggactacg cctcggctta cgaagagaag 3300
gcgtacaccg acggtcggag ggataaccgg tgcgagagca atagaggcta tggcgactac 3360
actcctctcc cagctggcta cgtgaccaag gagttggagt actttccgga gacagacaaa 3420
gtctggattg agattggaga gacagaaggc acgttcatcg tggactctgt tgaactcttg 3480
ctgatggagg ag 3492

<210> 4

<211> 605

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cry1Fa

<400> 4

Met Glu Asn Asn Ile Gln Asn Gln Cys Val Pro Tyr Asn Cys Leu Asn
1 5 10 15

Asn Pro Glu Val Glu Ile Leu Asn Glu Glu Arg Ser Thr Gly Arg Leu
20 25 30

Pro Leu Asp Ile Ser Leu Ser Leu Thr Arg Phe Leu Leu Ser Glu Phe
35 40 45

10

ES 2 663 283 T3

Val Pro Gly Val Gly Val Ala Phe Gly Leu Phe Asp Leu Ile Trp Gly
50 55 60

Phe Ile Thr Pro Ser Asp Trp Ser Leu Phe Leu Leu Gln Ile Glu Gln
65 70 75 80

Leu Ile Glu Gln Arg Ile Glu Thr Leu Glu Arg Asn Arg Ala Ile Thr
85 90 95

Thr Leu Arg Gly Leu Ala Asp Ser Tyr Glu Ile Tyr Ile Glu Ala Leu
100 105 110

Arg Glu Trp Glu Ala Asn Pro Asn Asn Ala Gln Leu Arg Glu Asp Val
115 120 125

Arg Ile Arg Phe Ala Asn Thr Asp Asp Ala Leu Ile Thr Ala Ile Asn
130 135 140

Asn Phe Thr Leu Thr Ser Phe Glu Ile Pro Leu Leu Ser Val Tyr Val
145 150 155 160

Gln Ala Ala Asn Leu His Leu Ser Leu Leu Arg Asp Ala Val Ser Phe
165 170 175

Gly Gln Gly Trp Gly Leu Asp Ile Ala Thr Val Asn Asn His Tyr Asn
180 185 190

Arg Leu Ile Asn Leu Ile His Arg Tyr Thr Lys His Cys Leu Asp Thr
195 200 205

Tyr Asn Gln Gly Leu Glu Asn Leu Arg Gly Thr Asn Thr Arg Gln Trp
210 215 220

Ala Arg Phe Asn Gln Phe Arg Arg Asp Leu Thr Leu Thr Val Leu Asp
225 230 235 240

Ile Val Ala Leu Phe Pro Asn Tyr Asp Val Arg Thr Tyr Pro Ile Gln
245 250 255

Thr Ser Ser Gln Leu Thr Arg Glu Ile Tyr Thr Ser Ser Val Ile Glu
260 265 270

Asp Ser Pro Val Ser Ala Asn Ile Pro Asn Gly Phe Asn Arg Ala Glu
275 280 285

Phe Gly Val Arg Pro Pro His Leu Met Asp Phe Met Asn Ser Leu Phe
290 295 300

ES 2 663 283 T3

Val Thr Ala Glu Thr Val Arg Ser Gln Thr Val Trp Gly Gly His Leu
305 310 315 320

Val Ser Ser Arg Asn Thr Ala Gly Asn Arg Ile Asn Phe Pro Ser Tyr
325 330 335

Gly Val Phe Asn Pro Gly Gly Ala Ile Trp Ile Ala Asp Glu Asp Pro
340 345 350

Arg Pro Phe Tyr Arg Thr Leu Ser Asp Pro Val Phe Val Arg Gly Gly
355 360 365

Phe Gly Asn Pro His Tyr Val Leu Gly Leu Arg Gly Val Ala Phe Gln
370 375 380

Gln Thr Gly Thr Asn His Thr Arg Thr Phe Arg Asn Ser Gly Thr Ile
385 390 395 400

Asp Ser Leu Asp Glu Ile Pro Pro Gln Asp Asn Ser Gly Ala Pro Trp
405 410 415

Asn Asp Tyr Ser His Val Leu Asn His Val Thr Phe Val Arg Trp Pro
420 425 430

Gly Glu Ile Ser Gly Ser Asp Ser Trp Arg Ala Pro Met Phe Ser Trp
435 440 445

Thr His Arg Ser Ala Thr Pro Thr Asn Thr Ile Asp Pro Glu Arg Ile
450 455 460

Thr Gln Ile Pro Leu Val Lys Ala His Thr Leu Gln Ser Gly Thr Thr
465 470 475 480

Val Val Arg Gly Pro Gly Phe Thr Gly Gly Asp Ile Leu Arg Arg Thr
485 490 495

Ser Gly Gly Pro Phe Ala Tyr Thr Ile Val Asn Ile Asn Gly Gln Leu
500 505 510

Pro Gln Arg Tyr Arg Ala Arg Ile Arg Tyr Ala Ser Thr Thr Asn Leu
515 520 525

Arg Ile Tyr Val Thr Val Ala Gly Glu Arg Ile Phe Ala Gly Gln Phe
530 535 540

Asn Lys Thr Met Asp Thr Gly Asp Pro Leu Thr Phe Gln Ser Phe Ser
545 550 555 560

Tyr Ala Thr Ile Asn Thr Ala Phe Thr Phe Pro Met Ser Gln Ser Ser

ES 2 663 283 T3

565

570

575

Phe Thr Val Gly Ala Asp Thr Phe Ser Ser Gly Asn Glu Val Tyr Ile
580 585 590

Asp Arg Phe Glu Leu Ile Pro Val Thr Ala Thr Leu Glu
595 600 605

<210> 5

<211> 619

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cry1Ca

<400> 5

Met Asp Asn Asn Pro Asn Ile Asn Glu Cys Ile Pro Tyr Asn Cys Leu
1 5 10 15

Ser Asn Pro Glu Glu Val Leu Leu Asp Gly Glu Arg Ile Ser Thr Gly
20 25 30

Asn Ser Ser Ile Asp Ile Ser Leu Ser Leu Val Gln Phe Leu Val Ser
35 40 45

Asn Phe Val Pro Gly Gly Gly Phe Leu Val Gly Leu Ile Asp Phe Val
50 55 60

Trp Gly Ile Val Gly Pro Ser Gln Trp Asp Ala Phe Leu Val Gln Ile
65 70 75 80

Glu Gln Leu Ile Asn Glu Arg Ile Ala Glu Phe Ala Arg Asn Ala Ala
85 90 95

Ile Ala Asn Leu Glu Gly Leu Gly Asn Asn Phe Asn Ile Tyr Val Glu
100 105 110

Ala Phe Lys Glu Trp Glu Glu Asp Pro Lys Asn Pro Ala Thr Arg Thr
115 120 125

Arg Val Ile Asp Arg Phe Arg Ile Leu Asp Gly Leu Leu Glu Arg Asp
130 135 140

Ile Pro Ser Phe Arg Ile Ser Gly Phe Glu Val Pro Leu Leu Ser Val
145 150 155 160

Tyr Ala Gln Ala Ala Asn Leu His Leu Ala Ile Leu Arg Asp Ser Val
165 170 175

10

ES 2 663 283 T3

Ile Phe Gly Glu Arg Trp Gly Leu Thr Thr Ile Asn Val Asn Glu Asn
180 185 190

Tyr Asn Arg Leu Ile Arg His Ile Asp Glu Tyr Ala Asp His Cys Ala
195 200 205

Asn Thr Tyr Asn Arg Gly Leu Asn Asn Leu Pro Lys Ser Thr Tyr Gln
210 215 220

Asp Trp Ile Thr Tyr Asn Arg Leu Arg Arg Asp Leu Thr Leu Thr Val
225 230 235 240

Leu Asp Ile Ala Ala Phe Phe Pro Asn Tyr Asp Asn Arg Arg Tyr Pro
245 250 255

Ile Gln Pro Val Gly Gln Leu Thr Arg Glu Val Tyr Thr Asp Pro Leu
260 265 270

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

Asn Val Met Glu Asn Ser Ala Ile Arg Asn Pro His Leu Phe Asp Ile
290 295 300

Leu Asn Asn Leu Thr Ile Phe Thr Asp Trp Phe Ser Val Gly Arg Asn
305 310 315 320

Phe Tyr Trp Gly Gly His Arg Val Ile Ser Ser Leu Ile Gly Gly Gly
325 330 335

Asn Ile Thr Ser Pro Ile Tyr Gly Arg Glu Ala Asn Gln Glu Pro Pro
340 345 350

Arg Ser Phe Thr Phe Asn Gly Pro Val Phe Arg Thr Leu Ser Asn Pro
355 360 365

Thr Leu Arg Leu Leu Gln Gln Pro Trp Pro Ala Pro Pro Phe Asn Leu
370 375 380

Arg Gly Val Glu Gly Val Glu Phe Ser Thr Pro Thr Asn Ser Phe Thr
385 390 395 400

Tyr Arg Gly Arg Gly Thr Val Asp Ser Leu Thr Glu Leu Pro Pro Glu
405 410 415

Asp Asn Ser Val Pro Pro Arg Glu Gly Tyr Ser His Arg Leu Cys His
420 425 430

Ala Thr Phe Val Gln Arg Ser Gly Thr Pro Phe Leu Thr Thr Gly Val

REIVINDICACIONES

1. Una planta o célula vegetal transgénica que comprende ADN que codifica una proteína insecticida Cry1Ca y ADN que codifica una proteína insecticida Cry1Fa.
- 5 2. La semilla de una planta de la reivindicación 1, en la que dicha semilla comprende ADN que codifica una proteína insecticida de Cry1Ca y ADN que codifica una proteína insecticida de Cry1Fa.
3. Una mezcla de semillas que comprende semillas de refugio de plantas de refugio que no son Bt, y una pluralidad de semillas de la reivindicación 2, en la que dichas semillas refugio comprenden entre el 5% y el 40% de todas las semillas en la mezcla.
- 10 4. La planta transgénica de la reivindicación 1, comprendiendo dicha planta adicionalmente ADN que codifica una proteína que contiene toxina nuclear de Cry1Ab.
5. Una composición para controlar plagas de lepidópteros que comprende células vegetales que expresan cantidades efectivas de una proteína que contiene toxina nuclear de Cry1Fa y una proteína que contiene toxina nuclear de Cry1Ca.
- 15 6. Una composición de la reivindicación 5 que comprende un hospedador transformado para expresar tanto una proteína que contiene toxina nuclear Cry1Fa como una proteína que contiene toxina nuclear Cry1Ca, en donde dicho huésped es un microorganismo o una célula vegetal.
7. Un método para controlar plagas de lepidópteros que comprende presentar a dichas plagas o al medio ambiente de dichas plagas una cantidad eficaz de una composición de la reivindicación 5.
- 20 8. Una planta transgénica que produce una proteína Cry1Fa más una proteína Cry1Ca más una tercera proteína seleccionada del grupo que consiste en las proteínas Vip3A, Cry1D, Cry1Be y Cry1E.

Figura 2

