

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 665 514**

51 Int. Cl.:

A01H 5/00	(2006.01)
A01H 5/10	(2006.01)
C12N 5/04	(2006.01)
A01N 63/02	(2006.01)
C12N 15/82	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.04.2011 PCT/US2011/033618**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **27.10.2011 WO11133892**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.04.2011 E 11772786 (7)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.12.2017 EP 2560476**

54 Título: **Combinaciones que incluyen las proteínas Cry34Ab/35Ab y Cry3BA para impedir el desarrollo de resistencia en las larvas de crisomélidas del maíz (Diabrotica spp.)**

30 Prioridad:

20.04.2011 US 477447 P
15.04.2011 US 476005 P
30.09.2010 US 388273 P
23.04.2010 US 327240 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.04.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

NARVA, KENNETH E.;
MEADE, THOMAS;
FENCIL, KRISTIN J.;
LI, HUARONG;
HEY, TIMOTHY D.;
WOOSLEY, AARON T. y
OLSON, MONICA BRITT

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 665 514 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

Combinaciones que incluyen las proteínas Cry34Ab/35Ab y Cry3BA para impedir el desarrollo de resistencia en las larvas de crisomélidas del maíz (*Diabrotica* spp.)

Antecedentes

- 5 Los seres humanos cultivan maíz para usos alimentarios y energéticos. El maíz es un cultivo importante. Es una fuente importante de alimento, productos alimenticios y pienso para consumo animal en muchas regiones del mundo. Los insectos se comen las plantas y las dañan, con lo que socavan estos esfuerzos humanos. Se gastan miles de millones de dólares cada año para controlar las plagas de insectos y se pierden miles de millones más por el daño que infligen.
- 10 El daño ocasionado por las plagas de insectos es un factor importante en la pérdida de los cultivos de maíz del mundo, a pesar del uso de medidas protectoras, tales como los plaguicidas químicos. Ante esto, la resistencia a los insectos se ha introducido por ingeniería genética en los cultivos, tales como el maíz, para controlar el daño debido a los insectos y reducir la necesidad de plaguicidas químicos tradicionales.

- Más de 10 millones de acres de maíz en los EE. UU. acaban infectados al año con el complejo de especies de diabroticas de la raíz del maíz. El complejo de especies de diabroticas de la raíz del maíz incluye la diabrotica de la raíz del maíz septentrional (*Diabrotica barberi*), la diabrotica de la raíz del maíz meridional (*D. undecimpunctata howardi*) y la diabrotica de la raíz del maíz occidental (*D. virgifera virgifera*). (Otras especies incluyen *Diabrotica virgifera zea* (gusano afilerillo de la raíz del maíz de México), *Diabrotica balteata* (diabrotica de la raíz del maíz de Brasil) y el complejo de diabroticas de la raíz del maíz de Brasil (*Diabrotica viridula* y *Diabrotica speciosa*)).
- 15

- 20 Las larvas de estas especies de *Diabrotica* que habitan en el suelo se alimentan de la raíz de la planta del maíz, lo que provoca su encamado. El encamado reduce a la larga el rendimiento de maíz y a menudo provoca la muerte de la planta. Al alimentarse de las barbas del maíz, los escarabajos adultos reducen la polinización y, por lo tanto, afectan de manera perjudicial al rendimiento de maíz por planta. Además, los adultos y las larvas del género *Diabrotica* atacan los cultivos de cucurbitáceas (pepinos, melones, calabacines, etc.) y muchas verduras,
- 25 y los cultivos de campo, tanto en producción comercial como en los que se cultivan en huertos particulares.

- Los insecticidas sintéticos con sustancias orgánicas han sido las principales herramientas utilizadas para controlar las plagas de insectos, pero los insecticidas biológicos, tales como las proteínas insecticidas procedentes de *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), han desempeñado una función importante en algunas regiones. La capacidad de producir plantas resistentes a insectos a través de la transformación con genes de proteínas insecticidas *Bt* ha revolucionado la agricultura moderna y destacado la importancia y el valor de las proteínas insecticidas y de sus genes.
- 30

- Se conocen bien en la técnica los cristales proteínicos insecticidas de algunas cepas de *Bacillus thuringiensis* (*B.t.*). Véase, p. ej., Hofte et al., *Microbial Reviews*, vol. 53, n.º 2. págs. 242-255 (1989). Estas proteínas se producen típicamente en las bacterias como protoxinas de aproximadamente 130 kDa que luego son escindidas por proteasas en el intestino medio del insecto, después que el insecto la ingiera, para producir un corazón de toxina de aproximadamente 60 kDa. Estas proteínas se conocen como cristales proteínicos porque se pueden observar diferentes inclusiones cristalinas en las esporas en algunas cepas de *B.t.* Estas inclusiones cristalinas a menudo están compuestas por varias proteínas diferentes.
- 35

- Un grupo de genes que se han utilizado para producir cultivos transgénicos resistentes a insectos son las δ -endotoxinas de *Bacillus thuringiensis* (*B.t.*). Las δ -endotoxinas se han expresado con éxito en las plantas para cultivo, tales como algodón, patatas, arroz, girasol y también el maíz, y se ha demostrado que proporcionan un control excelente sobre las plagas de insectos (Perlak, F. J. et al. (1990) *Bio/Technology* 8, 939-943; Perlak, F. J. et al (1993) *Plant. Mol. Biol.* 22: 313-321; Fujimoto H. et al. (1993) *Bio/Technology* 11: 1151-1155; Tu et al. (2000) *Nature Biotechnology* 18: 1101-1104; solicitud de publicación de patente internacional en el marco del PCT n.º
- 40
- 45 WO 01/13731; y Bing J. W. et al. (2000) *Efficacy of Cry1F Transgenic Maize*, «14th Biennial International Plant Resistance to Insects Workshop», Fort Collins, Colo).

- Se han utilizado varias proteínas *Bt* para crear plantas transgénicas resistentes a insectos que se han registrado y comercializado con éxito hasta la fecha. Estas incluyen Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1F, Cry3Aa y Cry3Bb en el maíz, Cry1Ac y Cry2Ab en el algodón, y Cry3A en la patata. También está SMART STAX en el maíz, que comprende
- 50 Cry1A.105 y Cry2Ab, y además Cry34Ab/Cry35Ab y Cry3Bb, véase la patente de los EE. UU. US 2009/0300980.

- Los productos comerciales que expresan estas proteínas expresan una sola proteína, salvo en los casos donde se desea el espectro insecticida de la combinación de 2 proteínas (p. ej., la combinación de Cry1Ab y Cry3Bb en el maíz para proporcionar resistencia a las plagas de lepidópteros y de la diabrotica de la raíz, respectivamente), o donde la acción independiente de las proteínas las hace útiles como herramienta para retrasar el desarrollo de resistencia en las poblaciones de insectos susceptibles (p. ej., la combinación de Cry1Ac y Cry2Ab en el algodón para proporcionar control por resistencia a la oruga de las yemas de tabaco).
- 55

Algunas de las cualidades de las plantas transgénicas resistentes a insectos que han conducido a la adopción rápida y generalizada de esta tecnología también dieron lugar a la preocupación de si las poblaciones de plagas se volverán resistentes a las proteínas insecticidas producidas por estas plantas. Se han sugerido varias estrategias para conservar la utilidad de los rasgos de resistencia a insectos basados en *Bt*, que incluyen el desarrollo de proteínas a una dosis alta en combinación con un refugio, y la alternancia, o el codesarrollo, de diferentes toxinas (McGaughey et al. (1998), «*B.t. Resistance Management*», *Nature Biotechnol.* 16: 144-146).

Las proteínas seleccionadas para ser usadas en una pila para la gestión de resistencias en los insectos (GRI) deben ser activas, de tal modo que la resistencia desarrollada a una proteína no confiera resistencia a la segunda proteína (a saber, no hay resistencia cruzada a las proteínas). Si, por ejemplo, una población de plagas seleccionada por la resistencia a la «proteína A» es sensible a la «proteína B», se concluiría que no hay resistencia cruzada y que una combinación de la proteína A y de la proteína B sería eficaz para retrasar la resistencia únicamente a la proteína A.

En ausencia de poblaciones de insectos resistentes, las valoraciones se pueden hacer basándose en otras características que se supone que están relacionadas con la posibilidad de resistencia cruzada. Se ha sugerido la utilidad de la fijación mediada por receptor a la hora de identificar proteínas insecticidas que probablemente no muestren resistencia cruzada (van Mellaert et al., 1999). El predictor clave de la ausencia de resistencia cruzada inherente en esta estrategia es que las proteínas insecticidas no compiten por los receptores en una especie de insectos sensible.

En el caso de que dos toxinas *Bt* compitan por el mismo receptor, entonces, si dicho receptor muta en este insecto de modo que una de las toxinas ya no se fija a dicho receptor y, así pues, ya no es insecticida contra el insecto, podría darse el caso de que el insecto también sea resistente a la segunda toxina (que se fija competitivamente al mismo receptor). En otras palabras, se dice que el insecto presenta resistencia cruzada a ambas toxinas *Bt*. Sin embargo, si dos toxinas se fijan a dos receptores diferentes, esto podría ser una indicación de que el insecto no sería simultáneamente resistente a estas dos toxinas.

En *Bacillus thuringiensis* se descubrió un sistema de proteínas insecticidas relativamente nuevo, tal y como se describe en la solicitud de patente internacional WO 97/40162. Este sistema comprende dos proteínas: una de aproximadamente 15 kDa y la otra de aproximadamente 45 kDa. Véanse también las patentes de los EE. UU. n.ºs 6.083.499 y 6.127.180. Estas proteínas se han asignado en la actualidad a sus propias clases, y, en consonancia, recibieron las designaciones Cry de Cry34 y Cry35, respectivamente. Véase Crickmore et al., sitio web biols.susx.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt. En la actualidad se han descrito la relación con otras muchas proteínas de este tipo de sistema. Véase, p. ej., la patente de los EE. UU. n.º 6.372.480; y las solicitudes de patente internacional WO 01/14417 y WO 00/66742. También se han descrito genes optimizados para plantas que codifican tales proteínas, en donde los genes se manipulan genéticamente para que usen los codones para la expresión optimizada en las plantas. Véase, p. ej., la patente de los EE. UU. n.º 6.218.188.

El modo exacto de acción del sistema Cry34/35 no se ha determinado aún, pero parece que forma poros en las membranas de las células del intestino del insecto. Véanse Molellenbeck et al., *Nature Biotechnology*, vol. 19, pág. 668 (julio de 2001); Masson et al., *Biochemistry*, 43 (12349-12357) (2004). El mecanismo exacto de acción permanece poco claro a pesar de que se conocen las coordenadas atómicas tridimensionales y las estructuras cristalinas para una proteína Cry34 y una proteína Cry35. Véanse las patentes de los EE. UU. n.ºs 7.524.810 y 7.309.785. Por ejemplo, está poco claro si una o ambas proteínas se fijan a un tipo típico de receptor, tal como una fosfatasa alcalina o una aminopeptidasa.

Además, ya que hay diferentes mecanismos mediante los cuales un insecto puede desarrollar resistencia a una proteína Cry (tal como mediante la alteración de la glucosilación del receptor [véase Jurat-Fuentes et al. (2002) 68 *AEM* 5711-5717], mediante la retirada de la proteína receptora [véase Lee et al., (1995) 61 *AEM* 3836-3842], mediante la mutación del receptor, o mediante otros mecanismos [véase Heckel et al., *J. Inv. Pathol.* 95 (2007) 192-197]), era imposible predecir *a priori* si habría resistencia cruzada entre las proteínas Cry34/35 y otras proteínas Cry. Predecir la fijación competitiva para el sistema Cry34/35 es también más complicado por el hecho de que están implicadas dos proteínas en el sistema binario Cry34/35. De nuevo, está poco claro si estas proteínas se fijan con eficacia, y cómo lo hacen, al intestino o a las células del intestino del insecto, y si interaccionan o se fijan unas a otras, y cómo lo hacen.

Otras opciones para controlar los coleópteros incluyen las siguientes proteínas: Cry3Bb, Cry3C, Cry6B, ET29, ET33 con ET34, TIC407, TIC435, TIC417, TIC901, TIC1201, ET29 con TIC810, ET70, ET76 con ET80, TIC851 y otros. También se han propuesto estrategias de iARN. Véase, p. ej., Baum et al., *Nature Biotechnology*, vol 25, n.º 11 (noviembre de 2007), págs. 1322-1326.

55 Breve compendio

La presente invención hace referencia en parte a Cry34Ab/35Ab en combinación con Cry3Ba. La presente invención hace referencia en parte al descubrimiento sorprendente de que Cry34Ab/Cry35Ab y Cry3Ba son útiles para impedir el desarrollo de resistencia (a cualquiera de los sistemas de proteínas insecticidas por separado) en

una población de diabroticas de la raíz del maíz (*Diabrotica* spp.). Tal y como el experto en la técnica reconocerá al sacar provecho de esta descripción, las plantas que producen estas proteínas Cry insecticidas serán útiles para mitigar el problema de que una población de diabroticas de la raíz del maíz pudiera desarrollar lo que sería una resistencia a alguno de estos sistemas de proteínas insecticidas por separado.

- 5 La presente invención está respaldada en parte por el descubrimiento de que los componentes de estos sistemas de proteínas Cry no compiten entre sí por la fijación a los receptores intestinales de la diabrotica de la raíz del maíz.

La presente invención también hace referencia en parte a pilas triples o «pirámides» de tres (o más) sistemas de toxinas, en donde Cry34Ab/Cry35Ab y Cry3Ba son la pareja de base. Así pues, las plantas (y el número de acres plantados con tales plantas) que producen estos dos sistemas de proteínas insecticidas están incluidas dentro el alcance de la presente invención.

10 Breve descripción de las figuras

La descripción detallada de las figuras hace referencia en particular a las figuras acompañantes en las que:

15 Figura 1A. Fijación de la ¹²⁵I-Cry35Ab1 en función de las toxinas Cry radiomarcadas de entrada sobre las VMMV preparadas a partir de larvas de la diabrotica de la raíz del maíz occidental. Fijación específica = fijación total – fijación inespecífica, barra de error = EEM (error estándar de la media).

Figura 1B. Fijación de la ¹²⁵I-Cry3BAa1 en función de las toxinas Cry radiomarcadas de entrada sobre las VMMV preparadas a partir de las larvas de la diabrotica de la raíz del maíz occidental. Fijación específica = fijación total – fijación inespecífica, barra de error = EEM (error estándar de la media).

20 Figura 2. Fijación de la ¹²⁵I-Cry35Ab1 sobre las VMMV preparadas a partir de las larvas de la diabrotica de la raíz del maíz occidental a diferentes concentraciones del competidor sin marcar (log 0,1 = -1,0, log 10 = 1,0, log 100 = 2,0, log 1000 = 3,0).

Figura 3A. Porcentaje de fijación de la ¹²⁵I-Cry35Ab1 sobre las VMMV preparadas a partir de las larvas de la diabrotica de la raíz del maíz occidental en ausencia de Cry34Ab1.

25 Figura 3B. Porcentaje de fijación de la ¹²⁵I-Cry35Ab1 sobre las VMMV preparadas a partir de las larvas de la diabrotica de la raíz del maíz occidental en presencia de Cry34Ab1.

Figura 4. Porcentaje de fijación de la ¹²⁵I-Cry3Ba1 sobre las VMMV preparadas a partir de las larvas de la diabrotica de la raíz del maíz occidental en presencia de diferentes concentraciones de diferentes competidores sin marcar.

30 Breve descripción de las secuencias

SEQ ID n.º 1: Secuencia de la proteína Cry35Ab1 nativa completa.

SEQ ID n.º 2: Secuencia del corazón de la proteína Cry35Ab1 truncada con quimotripsina.

SEQ ID n.º 3: Secuencia de la proteína Cry3Ba1 nativa completa.

SEQ ID n.º 4: Secuencia del corazón de la proteína Cry3Ba1 tras tripsina.

35 SEQ ID n.º 5: Secuencia de la proteína Cry34Ab1 nativa completa.

Descripción detallada

La secuencia de las proteínas Cry34Ab/35Ab se puede obtener del aislado de *Bacillus thuringiensis* PS149B1, por ejemplo. Para otros genes, secuencias de las proteínas y aislados originales para ser usados de acuerdo con la presente invención, véase Crickmore et al., sitio web lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/intro.html,
40 por ejemplo.

La presente invención incluye el uso de proteínas insecticidas Cry34Ab/35Ab en combinación con una toxina Cry3Ba para proteger el maíz del daño y la pérdida de rendimiento ocasionados por servir de alimento para la diabrotica de la raíz del maíz a las poblaciones de diabroticas de la raíz del maíz que podrían desarrollar resistencia a cualquiera de estos sistemas de proteínas Cry por separado (sin los otros).

45 La presente invención da a conocer, así pues, pilas para la gestión de resistencias en los insectos (GRI) para impedir que la diabrotica de la raíz del maíz desarrolle resistencia contra Cry3Ba y/o Cry34Ab/35Ab.

La presente descripción da a conocer composiciones para controlar las plagas de la diabrotica de la raíz que comprenden células que producen una proteína de tipo toxina Cry3Ba y un sistema de toxinas Cry34Ab/35Ab.

La invención comprende además un hospedador transformado que produce tanto una proteína Cry3Ba como una toxina binaria Cry34Ab/35Ab, en donde dicho hospedador es un microorganismo o una célula vegetal.

Además, se pretende que la invención dé a conocer un método para controlar las plagas de diabroticas de la raíz que comprenden poner en contacto dichas plagas o el entorno de dichas plagas con una cantidad eficaz de una composición que contiene una proteína Cry3Ba y además contiene una toxina binaria Cry34Ab/35Ab.

Una realización de la invención comprende una planta de maíz que comprende un gen que se puede expresar en las plantas que codifica una toxina binaria Cry34Ab/35Ab y un gen que se puede expresar en las plantas que codifica una proteína Cry3Ba, y semillas de tal planta.

Otra realización más de la invención comprende una planta del maíz en donde un gen que se puede expresar en las plantas que codifica una toxina binaria Cry34AB/35Ab y un gen que se puede expresar en las plantas que codifica una proteína Cry3Ba se han transferido por introgresión en dicha planta de maíz, y semillas de tal planta.

Tal y como se describe en los ejemplos, los estudios de fijación competitiva al receptor con el uso del corazón de la proteína de la toxina Cry35Ab radiomarcada muestran que el corazón de la proteína de la toxina Cry3Ba no compete por la fijación en las muestras de tejido de insecto DRM al cual se fija la Cry35Ab. Véase la figura 2. Estos resultados indican que la combinación de las proteínas Cry3Ba y Cry34Ab/35Ab es un medio eficaz para mitigar el desarrollo de la resistencia en poblaciones de DRM a cualquier sistema de proteínas por separado.

Así pues, basándose en parte en los datos descritos más arriba y en otra parte de la presente memoria, las proteínas Cry34Ab/35Ab y Cry3Ba se pueden utilizar para producir combinaciones de GRI para la prevención o mitigación del desarrollo de resistencia por la DRM. Se pueden añadir otras proteínas a esta combinación para expandir el espectro insecto-control, por ejemplo. La combinación en cuestión (de las proteínas Cry34Ab/35Ab y Cry3Ba) también se puede utilizar en algunas «pilas triples» o «pirámides» preferidas en combinación con aún otra proteína para controlar las diabroticas de la raíz, tales como Cry3Aa y/o Cry6Aa; así pues, tales combinaciones adicionales darían a conocer muchos modos de acción contra una diabrotica de la raíz. La iARN contra las diabroticas de la raíz es otra opción más. Véase, p. ej., Baum et al., *Nature Biotechnology*, vol. 25, n.º 11 (noviembre de 2007), págs. 1322-1326.

A la luz de la descripción del documento USSN 61/327.240 (registrado el 23 de abril de 2010) en relación con las combinaciones de las proteínas Cry34Ab/35Ab y Cry3Aa, la USSN 61/388.273 (registrada el 30 de septiembre de 2010) en relación con las combinaciones de las proteínas Cry34Ab/35Ab y Cry6Aa, y la USSN 61/477.447 (registrada el 20 de septiembre de 2011) en relación con las combinaciones de las proteínas Cry3Aa y Cry6Aa, algunas «pilas triples» o «muchos modos de pilas de acción» preferidos de la presente invención incluyen una proteína Cry3Ba combinada con las proteínas Cry34Ab/35Ab, junto con una proteína Cry6Aa y/o una proteína Cry3Aa. Las plantas transgénicas, entre ellas el maíz, que comprenden un gen de cry3Ba, genes de Cry34Ab/35Ab y un tercer o cuarto sistema de toxinas (p. ej., uno o varios genes de Cry3Aa y/o Cry6Aa) quedan incluidos dentro del alcance de la presente invención. Así pues, tales realizaciones actúan selectivamente sobre el insecto mediante al menos tres modos de acción.

Las opciones de implantación de la presente invención incluyen el uso de las proteínas Cry3Ba y Cry34Ab/35Ab en las regiones de cultivo de maíz donde *Diabrotica* spp. causa problemas. Otra opción de implantación sería utilizar uno o ambas proteínas Cry3Ba y Cry34Ab/35Ab en combinación con otros rasgos.

El experto en la técnica apreciará que las toxinas *Bt*, incluso dentro de determinadas clases, tales como Cry3Ba y Cry34Ab/35Ab, pueden variar en cierto grado.

Genes y toxinas. El término «aislado» hace referencia a un polinucleótido en una construcción que se produce por medios no naturales, o a una proteína en un estado purificado o, si no, producida por medios no naturales. Los genes y toxinas útiles de acuerdo con la presente invención incluyen no solo las secuencias completas descritas, sino también fragmentos de estas secuencias, variantes, mutantes y proteínas de fusión que conservan la actividad plaguicida característica de las toxinas que se muestran de ejemplo concreto en la presente memoria. Tal y como se utiliza en la presente memoria, los términos «variantes» y «variaciones» de genes hacen referencia a secuencias de nucleótidos que codifican las mismas toxinas, o que codifican toxinas equivalentes, que tienen actividad plaguicida. Tal y como se utiliza en la presente memoria, el término «toxinas equivalentes» hace referencia a las toxinas que tienen la misma, o esencialmente la misma, actividad biológica que las toxinas reivindicadas contra las plagas deseadas. Esto se aplica a las Cry3 y a las Cry34/35, así como a las Cry6 (si se utilizan en pilas triples/múltiples), de acuerdo con la presente invención. Los dominios o subdominios de estas proteínas se pueden intercambiar para hacer proteínas químicas. Véanse, p. ej., las patentes de los EE. UU. n.ºs 7.309.785 y 7.524.810 con respecto a las proteínas Cry34/35. La patente '785 también da a conocer proteínas Cry35 truncadas. Las toxinas truncadas también se muestran de ejemplo en la presente memoria.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, los bordes representan aproximadamente el 95% (las Cry3Ba, y las Cry34Ab y Cry35Ab), el 78% (las Cry3B, y las Cry34A y Cry35A) y el 45% (las Cry6, y las Cry34 y Cry35) de identidad de secuencia, según «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. Lo mismo se aplica a las Cry3A y/o Cry6 si se utilizan en pilas triples/múltiples, por ejemplo, de acuerdo con la presente invención.

5 Será evidente para el experto en esta técnica que los genes que codifican las toxinas activas se pueden identificar y obtener mediante varios métodos. Los genes, o porciones de genes, específicos que se muestran de ejemplo en la presente memoria se podrían obtener de los aislados depositados en un depósito de cultivos. Estos genes, o porciones, o variantes de los mismos, también se podrían construir por medios sintéticos, por ejemplo, mediante el uso de un sintetizador de genes. Las variaciones de los genes se podrían construir con facilidad mediante técnicas estándares para realizar mutaciones puntuales. De igual forma, se pueden fabricar
 10 fragmentos de estos genes mediante las exonucleasas o endonucleasas disponibles en el mercado de acuerdo con los procedimientos estándares. Por ejemplo, las enzimas, tales como Bal31, o la mutagénesis específica de sitio se pueden utilizar para retirar sistemáticamente nucleótidos desde los extremos de estos genes. Los genes que codifican fragmentos activos también se podrían obtener mediante una serie de enzimas de restricción. Las proteasas se podrían utilizar para obtener directamente fragmentos activos de estas toxinas proteicas.

15 Los fragmentos que conservan la actividad plaguicida de las toxinas de ejemplo estarían dentro del alcance de la presente invención. De igual forma, debido a la redundancia del código genético, una serie de secuencias de ADN diferentes pueden codificar las secuencias de aminoácidos descritas en la presente memoria. Se encuentra también dentro de los conocimientos del experto en la técnica el crear estas secuencias de ADN alternativas que codifican las mismas, o esencialmente las mismas, toxinas. Estas secuencias de ADN variantes se encuentran
 20 dentro del alcance de la presente invención. Tal y como se utiliza en la presente memoria, la referencia a secuencia «esencialmente la misma» hace referencia a las secuencias que tienen sustituciones, deleciones, adiciones o inserciones de aminoácidos que no alteran materialmente la actividad plaguicida. Los fragmentos de genes que codifican proteínas que conservan la actividad plaguicida también quedan incluidas en esta definición.

Otro método para identificar los genes que codifican las toxinas y las porciones de genes útiles de acuerdo con la
 25 invención en cuestión es a través del uso de sondas oligonucleotídicas. Estas sondas son secuencias nucleotídicas detectables. Estas secuencias podrían ser detectables en virtud de una marcación idónea o podrían hacerse fluorescentes inherentemente, tal y como se describe en la solicitud de patente internacional n.º WO 93/16094. Tal y como se conoce bien en la técnica, si la molécula de sonda y la muestra de ácido nucleico se hibridan formando una unión fuerte entre las dos moléculas, se puede suponer razonablemente que la sonda y la muestra tienen una homología sustancial. Preferiblemente, la hibridación se realiza en condiciones rigurosas mediante las técnicas bien conocidas en el campo, tal y como se describe, por ejemplo, en Keller, G. H., M. M. Manak (1987) *DNA Probes*, Stockton Press, Nueva York, N. Y., págs. 169-170. Algunos ejemplos de concentraciones de sales y combinaciones de temperaturas son como las que siguen (en orden de rigor creciente): SSPE o SSC a 2× a temperatura ambiente; SSPE o SSC a 1× a 42 °C; SSPE o SSC a 0,1× a 42 °C;
 35 SSPE o SSC a 0,1× a 65 °C. La detección de la sonda da a conocer un medio para determinar de una manera conocida si se ha producido la hibridación. Tal análisis de sonda da a conocer un método rápido para identificar los genes que codifican las toxinas de la presente invención. Los segmentos de nucleótidos que se utilizan como sondas de acuerdo con la invención se pueden sintetizar con el uso de un sintetizador de ADN y procedimientos estándares. Estas secuencias de nucleótidos también se pueden utilizar como cebadores de PCR para amplificar
 40 genes de la presente invención.

Toxinas variantes. Determinadas toxinas de la presente invención se han mostrado de ejemplo específico en la presente memoria. Ya que estas toxinas son simplemente de ejemplo de las toxinas de la presente invención, resultará claramente evidente que la presente invención comprende toxinas variantes o equivalentes (y secuencias de nucleótidos que codifican toxinas equivalentes) que tienen la misma o parecida actividad
 45 plaguicida a la de la toxina de ejemplo. Las toxinas equivalentes tendrán una homología de aminoácidos con una toxina de ejemplo. Esta identidad de aminoácidos será típicamente mayor del 75%, o preferiblemente mayor del 85%, preferiblemente mayor del 90%, preferiblemente mayor del 95%, preferiblemente mayor del 96%, preferiblemente mayor del 97%, preferiblemente mayor del 98% o preferiblemente mayor del 99%, en algunas realizaciones. La identidad de aminoácidos será típicamente la más alta en las regiones críticas de la toxina que responden de la actividad biológica o que están implicadas en la determinación de la configuración tridimensional que a la postre es responsable de la actividad biológica. En este sentido, resultan aceptables determinadas sustituciones de aminoácidos y cabe esperar que estas sustituciones estén en regiones que no son críticas para la actividad, o que sean sustituciones conservativas de aminoácidos que no alteran la configuración tridimensional de la molécula. Por ejemplo, los aminoácidos se podrían colocar en las siguientes clases: no polar,
 50 polar sin carga, básico y ácido. Las sustituciones conservativas mediante las cuales un aminoácido de una clase es reemplazado 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 da a conocer una lista de ejemplos de aminoácidos que pertenecen a cada clase.

Tabla 1. Clases de aminoácidos con ejemplos de los aminoácidos que pertenecen a cada clase

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

En algunos casos, se pueden realizar también sustituciones no conservativas. El factor crítico es que estas sustituciones no deben retirar, de manera significativa, actividad biológica a la toxina.

- 5 Hospedadores recombinantes. Los genes que codifican las toxinas de la presente invención se pueden introducir en una amplia gama de hospedadores microbianos o vegetales. La expresión del gen de la toxina da lugar, directa o indirectamente, a la producción intracelular y al mantenimiento del plaguicida. Para crear una cepa *Bt* que expresa ambas toxinas de la presente invención se pueden utilizar la transferencia por conjugación y la transferencia por recombinación. Otros organismos hospedadores también se podrían transformar con uno o
- 10 ambos de los genes de las toxinas y utilizarse entonces para llevar a cabo el efecto sinérgico. Mediante los hospedadores microbianos idóneos, p. ej., *Pseudomonas*, los microorganismos se pueden aplicar al sitio de la plaga, donde proliferarán y serán ingeridos. El resultado es el control de la plaga. Como alternativa, el microorganismo que alberga el gen de la toxina se puede tratar en las condiciones que prolongan la actividad de la toxina y estabilizan la célula. La célula tratada, que conserva la actividad tóxica, se puede aplicar entonces al
- 15 entorno de la plaga que se desea tratar. Las células vegetales no regenerables/no totipotentes de una planta de la presente invención (que comprende al menos uno de los genes de GRI en cuestión) quedan incluidas dentro la presente invención.

Transformación de plantas. Una realización preferida de la presente invención es la transformación de plantas con genes que codifican la proteína insecticida en cuestión o sus variantes. Las plantas transformadas son

20 resistentes al ataque por una plaga de insectos a combatir en virtud de la presencia de cantidades controladoras de la proteína insecticida en cuestión o sus variantes en las células de la planta transformada. Al incorporar el material genético que codifica las propiedades insecticidas de las toxinas insecticidas B.t. en el genoma de una planta que será comida por una plaga de insectos concreta, el adulto o las larvas morirían después de consumir la planta alimenticia. Se han transformado numerosos miembros de taxones de monocotiledóneas y

25 dicotiledóneas. Los cultivos agronómicos transgénicos, así como frutas y verduras, son de interés comercial. Tales cultivos incluyen, pero sin limitarse a ellos, maíz, arroz, sojas, colza, girasol, alfalfa, sorgo, trigo, algodón, cacahuetes, tomates, patatas y similares. Existen varias técnicas para introducir material genético foráneo en las células vegetales, y para obtener plantas que mantienen y expresan de manera estable el gen introducido. Tales técnicas incluyen la aceleración del material genético en forma de revestimiento de las micropartículas

30 directamente al interior de las células (patente de los EE. UU. n.º 4.945.050 y patente de los EE. UU. n.º 5.141.131). Las plantas se podrían transformar con tecnología de *Agrobacterium*, véanse la patente de los EE. UU. n.º 5.177.010, la patente de los EE. UU. n.º 5.104.310, la solicitud de patente europea n.º 0131624 B1, la solicitud de patente europea n.º 120516, la solicitud de patente europea n.º 159418 B1, la solicitud de patente europea n.º 176112, la patente de los EE. UU. n.º 5.149.645, la patente de los EE. UU. n.º 5.469.976, la patente de los EE. UU. n.º 5.464.763, la patente de los EE. UU. n.º 4.940.838, la patente de los EE. UU. n.º 4.693.976, la

35 solicitud de patente europea n.º 116718, la solicitud de patente europea n.º 290799, la solicitud de patente europea n.º 320500, la solicitud de patente europea n.º 604662, la solicitud de patente europea n.º 627752, la solicitud de patente europea n.º 0267159, la solicitud de patente europea n.º 0292435, la patente de los EE. UU. n.º 5.231.019, la patente de los EE. UU. n.º 5.463.174, la patente de los EE. UU. n.º 4.762.785, la patente de los

40 EE. UU. n.º 5.004.863 y la patente de los EE. UU. n.º 5.159.135. Otra tecnología de transformación incluye la tecnología WHISKERS™, véase la patente de los EE. UU. n.º 5.302.523 y la patente de los EE. UU. n.º 5.464.765. También se ha utilizado la tecnología de electroporación para transformar las plantas, véanse la solicitud de patente internacional WO 87/06614, la patente de los EE. UU. n.º 5.472.869, la patente de los EE. UU. n.º 5.384.253, la solicitud de patente internacional WO 9209696 y la solicitud de patente internacional WO

45 9321335. Además de las numerosas tecnologías para transformar las plantas, podría variar también el tipo de tejido que se pone en contacto con los genes foráneos. Tal tejido incluiría, pero sin limitación, tejido embriogénico, tejido de callo de tipos I y II, hipocótilo, meristemo y similares. Casi todos los tejidos vegetales se podrían transformar durante la desdiferenciación con las técnicas apropiadas dentro de los conocimientos del experto.

Los genes que codifican cualquiera de las toxinas en cuestión se pueden insertar en las células vegetales con

50 una serie de técnicas que se conocen bien en el campo, tal y como está descrito más arriba. Por ejemplo, un

gran número de vectores de clonación que comprenden un marcador que permite la selección de las células microbianas transformadas y un sistema de replicación que funciona en *Escherichia coli* están disponibles para preparar y modificar genes foráneos para la introducción en las plantas superiores. Tales manipulaciones podrían incluir, por ejemplo, la inserción de mutaciones, truncamientos, adiciones o sustituciones que se deseen para el uso al que están destinadas. Los vectores comprenden, por ejemplo, pBR322, la serie pUC, la serie M13mp, pACYC184, etc. En consecuencia, la secuencia que codifica la proteína Cry o sus variantes se puede insertar en el vector en un sitio de restricción idóneo. El plásmido resultante se utiliza para la transformación de células de *E. coli*, en donde dichas células se cultivan en un medio de nutrientes idóneo, y a continuación se recogen y se lisan para que se recuperen cantidades manejables del plásmido. El análisis de secuencias, el análisis de fragmentos de restricción, la electroforesis y otros métodos bioquímicos o de biología molecular se llevan a cabo por lo general como métodos de análisis. Después de cada manipulación, se puede escindir la secuencia de ADN utilizada y luego se une a la siguiente secuencia de ADN. Cada secuencia de ADN manipulada se puede clonar en el mismo plásmido u otros distintos.

Se ha investigado en profundidad el uso de vectores que contienen ADN-T para transformar las células vegetales y está lo suficientemente descrito en la patente europea EP 120516; en Lee y Gelvin (2008), en Fraley et al. (1986) y en An et al. (1985), y ya está bien consolidado en el campo de la técnica.

Una vez que el ADN insertado se ha integrado en el genoma de la planta, es relativamente estable a lo largo de las generaciones venideras. El vector utilizado para transformar la célula vegetal suele contener un gen marcador de selección que codifica una proteína que confiere a las células vegetales transformadas resistencia a un plaguicida o a un antibiótico, tal como bialafos, kanamicina, G418, bleomicina o higromicina, entre otros. El marcador de selección empleado individualmente debe permitir en consecuencia la selección de las células transformadas, mientras que el crecimiento de las células que no contienen el ADN insertado queda suprimido por el compuesto selectivo.

Están disponibles un gran número de técnicas para introducir el ADN en una célula vegetal hospedadora. Estas técnicas incluyen la transformación con ADN-T introducido por *Agrobacterium tumefaciens* o *Agrobacterium rhizogenes* como el agente de transformación. Además, se puede utilizar la fusión de los protoplastos vegetales con liposomas que contienen el ADN a introducir, la inyección directa del ADN, la transformación de la biolística (bombardeo de micropartículas) o la electroporación, así como otros métodos posibles.

En una realización preferida de la presente invención, las plantas se transformarán con genes en los que el uso de codones de la región codificante de la proteína ha sido optimizado para las plantas. Véase, por ejemplo, la patente de los EE. UU. n.º 5.380.831. De igual forma, ventajosamente, se utilizarán plantas que codifican una toxina truncada. La toxina truncada típicamente codificará aproximadamente del 55% a aproximadamente el 80% de la toxina completa. Se conocen en la técnica los métodos para crear los genes *B.t.* sintéticos para ser usados en las plantas (Stewart, 2007).

Independientemente de la técnica de transformación, el gen se incorpora preferiblemente en un vector de transferencia de genes adaptado para expresar los genes *B.t.* de las toxinas insecticidas y sus variantes en la célula vegetal al incluir en el vector un promotor de plantas. Además de los promotores de plantas, se pueden utilizar con eficacia los promotores de muchas procedencias para expresar los genes foráneos en las células vegetales. Por ejemplo, se podrían utilizar promotores de origen bacteriano, tal como el promotor de la octopina sintasa, el promotor de la nopalina sintasa y el promotor de la manopina sintasa. Los promotores que no son de *Bacillus thuringiensis* se pueden utilizar en algunas realizaciones preferidas. Se podrían utilizar promotores procedentes de virus de plantas, por ejemplo, los promotores 35S y 19S del virus del mosaico de la coliflor, un promotor del virus del mosaico de la vena de la yuca, y similares. Los promotores vegetales incluyen, pero sin limitarse a ellos, la subunidad pequeña de la ribulosa-1,6-bisfosfato (RUBP) carboxilasa, el promotor de la β -conglucininina, el promotor de la faseolina, el promotor de la ADH (alcohol deshidrogenasa), los promotores de choque térmico, el promotor del ADF (factor de despolimerización de la actina), el promotor de la ubicuitina, el promotor de la actina y promotores específicos de tejido. Los promotores también podrían contener determinadas secuencias de elementos potenciadores que podrían mejorar la eficacia de la transcripción. Los potenciadores típicos incluyen, pero sin limitarse a ellos, ADH1-intron 1 y ADH1-intron 6. Se podrían utilizar promotores constitutivos. Los promotores constitutivos dirigen la expresión génica continua en casi todos los tipos de células y en casi cualquier momento (p. ej., actina, ubicuitina, CaMV 35S). Los promotores específicos de tejido son responsables de la expresión génica en determinados tipos de células o tejidos, tales como las hojas o las semillas (p. ej., promotores de zeína, oleosina, napina, ACP [proteína transportadora de acilos]) y se podrían utilizar estos promotores. También se podrían utilizar promotores que son activos durante una determinada etapa del desarrollo de las plantas, así como activos en tejidos y órganos específicos de la planta. Ejemplos de tales promotores incluyen, pero sin limitarse a ellos, los promotores que son específicos de la raíz, específicos del polen, específicos del embrión, específicos de la barba del maíz, específicos de la fibra del algodón, específicos del endospermo de las semillas, específicos del floema, y similares.

En determinadas circunstancias, podría ser deseable la utilización de un promotor inducible. Un promotor inducible es responsable de la expresión de genes en respuesta a una señal específica, tal como: estímulo físico (p. ej., genes de choque térmico); luz (p. ej., RUBP carboxilasa); hormona (p. ej., glucocorticoide); antibiótico (p.

ej., tetraciclina); metabolitos; y estrés (p. ej., sequía). Se podrían utilizar otros elementos de transcripción y traducción deseables que funcionan en las plantas, tal como secuencias líder sin traducir en 5', secuencias de terminación de la transcripción del ARN y secuencias señal de adición de poliadenilato. Se conocen bien en la técnica numerosos vectores de transferencia de genes específicos de plantas.

- 5 Los cultivos transgénicos que contienen rasgos de resistencia a insectos (RI) son prevalentes en las plantas de maíz y algodón por toda América del Norte, y el uso de estos rasgos se está expandiendo globalmente. Los cultivos transgénicos comerciales que combinan rasgos de RI y tolerancia a herbicidas (TH) han sido desarrollados por muchas empresas de semillas. Estos incluyen combinaciones de rasgos de RI conferidos por las proteínas insecticidas de *B.t.* y rasgos de TH, tales como la tolerancia a inhibidores de la acetolactato sintasa (ALS), tales como sulfonilureas, imidazolinonas, triazolopirimidina, sulfonanilidas y similares, inhibidores de la glutamina sintetasa (GS), tales como bialafos, glufosinato y similares, inhibidores de la 4-hidroxifenilpiruvato dioxigenasa (HPPD), tales como mesotriona, isoxaflutol y similares, inhibidores de la 5-enopiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS), tales como el glifosato y similares, e inhibidores de la acetilcoenzima A carboxilasa (AACasa), tales como haloxifop, quizalofop, diclofop y similares. Se conocen otros ejemplos en los que las proteínas proporcionadas de manera transgénica proporcionan a la planta tolerancia a clases químicas de herbicidas, tales como los herbicidas fenoxiacidos y herbicidas de piridiloxiacetatos de auxina (véase la solicitud de patente internacional WO 2007/053482 A2), o herbicidas fenoxiacidos y herbicidas de ariloxifenoxipropionatos (véase la solicitud de patente internacional WO 2005/107437 A2, A3). La capacidad para controlar varios problemas de plagas a través de los rasgos de RI es un valioso concepto de producto comercial y se resalta la comodidad de este concepto de producto si los rasgos de control de los insectos y los rasgos de control de malas hierbas están reunidos en la misma planta. Además, se podría mejorar su valor a través de combinaciones en una sola planta de rasgos de RI conferidos por una proteína insecticida de *B.t.*, tal como la que es objeto de la presente invención, con uno o varios rasgos de TH adicionales, tales como los mencionados más arriba, más uno o varios rasgos de entrada adicionales (p. ej., otra resistencia a insectos conferida por derivados de *B.t.* u otras proteínas insecticidas, resistencia a insectos conferida por mecanismos tales como la iARN y similares, resistencia a los nematodos, resistencia a enfermedades, tolerancia al estrés, mejora de la utilización del nitrógeno, y similares) o rasgos de salida (p. ej., alto contenido de aceites, composición saludable del aceite, mejora nutricional, y similares). Tales combinaciones se podrían obtener bien a través de la mejora genética convencional (pila para mejora) o junto a una nueva transformación que implicaría la introducción simultánea de varios genes (pila molecular). Los beneficios incluyen la capacidad de gestionar las plagas de insectos y mejorar el control de las malas hierbas en una planta de cultivo que proporciona beneficios secundarios al productor y/o al consumidor. Así pues, la presente invención se puede utilizar en combinación con otros rasgos para proporcionar un paquete agronómico completo de mejora de la calidad del cultivo con la capacidad para controlar de manera flexible y rentable cualquier cantidad de problemas agronómicos.
- 35 Las células transformadas crecen dentro de las plantas de la manera usual. Pueden formar células germinales y transmitir el rasgo o rasgos transformados a las plantas de la progenie.

Tales plantas se pueden hacer crecer de la manera normal y se pueden cruzar con plantas que tienen los mismos factores hereditarios transformados u otros factores hereditarios. Los individuos híbridos resultantes tienen las correspondientes propiedades fenotípicas.

- 40 En una realización preferida de la presente invención, las plantas se transformarán con genes en los que el uso de codones está optimizado para las plantas. Véase, por ejemplo, la patente de los EE. UU. n.º 5.380.831. Además, los métodos para crear genes de *Bt* sintéticos para ser usados en las plantas se conocen bien en la técnica (Stewart y Burgin, 2007). Un ejemplo no limitante de una planta transformada preferida es una planta de maíz fértil que comprende un gen que se puede expresar en una planta que codifica una proteína Cry3Ba, y además comprende un segundo conjunto de genes que se pueden expresar en una planta que codifican las proteínas Cry34Ab/35Ab.

- La transferencia (o introgresión) del rasgo o de los rasgos determinados por Cry3Ba y Cry34Ab/35Ab a las líneas de maíz endogámicas se puede conseguir mediante la selección recurrente tras mejora genética, por ejemplo, mediante el retrocruzamiento. En este caso, un progenitor recurrente deseado se cruza primero con un donante endogámico (el progenitor no recurrente) que lleva uno o varios genes apropiados para los rasgos determinados por Cry. A continuación, la progenie de este cruzamiento se retrocruza con el progenitor recurrente, a lo que sigue la selección de la progenie resultante en función del uno o varios rasgos que se desea que se transfieran desde el progenitor no recurrente. Después de tres, preferiblemente cuatro, más preferiblemente cinco o más generaciones de retrocruzamientos con el progenitor recurrente con selección por el uno o varios rasgos deseados, la progenie será heterocigota para los locus que controlan el uno o varios rasgos que se han de transferir, pero será como el progenitor recurrente para la mayoría o casi todos los otros genes (véase, por ejemplo, Poehlman & Sleper (1995) *Breeding Field Crops*, 4.ª edición, 172-175; Fehr (1987) *Principles of Cultivar Development*, vol 1: «Theory and Technique», 360-376).

- Estrategias de gestión de la resistencia en los insectos (GRI). Roush et al., por ejemplo, resumen estrategias de dos toxinas, también denominadas «piramidación» o «apilamiento», para la gestión de cultivos transgénicos insecticidas (The Royal Society. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* (1998) 353, 1777-1786).

En su sitio web, la Agencia de Protección del Medio Ambiente de los Estados Unidos (epa.gov/oppbpd1/biopesticides/pips/bt_corn_refuge_2006.htm) publica las siguientes exigencias para dar a conocer refugios no transgénicos (a saber, que no sean *B.t.*) (un bloque de cultivos que no son *Bt*/maíz) para ser usados con cultivos transgénicos que producen una sola proteína Bt activa contra las plagas a combatir.

- 5 «Los requisitos estructurados específicos para productos de maíz protegidos con Bt (Cry1Ab o Cry1F) contra el taladro del maíz son los siguientes:

Refugios estructurados: 20% de refugio de maíz Bt no resistente a lepidóptero en la Zona del Maíz estadounidense;

50% de refugio de Bt no resistente lepidóptero en la Zona del Maíz estadounidense;

- 10 Bloques:

Interno (a saber, en el campo de Bt)

Externo (a saber, campos separados por menos de 0,5 millas (0,25 millas, si es posible) del campo de Bt para elevar al máximo el cruzamiento al azar)

Franjas dentro del campo

- 15 Las franjas deben ser de al menos 4 filas de ancho (preferiblemente 6 filas) para reducir los efectos del movimiento de las larvas».

Además, la Asociación Estadounidense de Agricultores del Maíz, en su sitio web (ncga.com/insect-resistance-management-fact-sheet-bt-corn) también da a conocer unas directrices similares en cuanto a las exigencias de los refugios. Por ejemplo:

- 20 «Requisitos de GRI del taladro del maíz:

- Plantar al menos el 20% de los acres de maíz con híbridos de refugio

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

- Se deben plantar a menos de 0,5 millas de los híbridos de refugio

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

- El refugio se podría tratar con plaguicidas convencionales solo si los umbrales económicos se alcanzan para el insecto a combatir

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

- El refugio adecuado se debe plantar en cada finca con el maíz Bt».

- 30 Tal y como declaran Roush et al. (en las páginas 1780 y 1784, columna derecha, por ejemplo), el apilamiento o piramidación de dos proteínas diferentes, cada una eficaz contra las plagas a combatir y con poca o ninguna resistencia cruzada, puede permitir el uso de un refugio más pequeño. Roush sugiere que para una pila satisfactoria, un tamaño del refugio de menos del 10% puede proporcionar una gestión de la resistencia comparable a aproximadamente un refugio del 50% para un solo rasgo (no piramidado). Para los productos de maíz Bt piramidados disponibles en la actualidad, la Agencia de Protección del Medio Ambiente de los EE. UU. exige que se plante un refugio significativamente menos estructurado (por lo general, del 5%) de maíz no Bt que para los productos de un solo rasgo (por lo general, del 20%).

- 40 Hay muchas maneras de dar a conocer los efectos de la GRI de un refugio, que incluye diferentes patrones de plantación geométrica en los campos (tal y como se mencionó más arriba) o en mezclas de semillas dentro de bolsas, tal y como se explica con más detalle en Roush et al. (véase más arriba) y en la patente de los EE. UU. n.º 6.551.962.

- 45 Los porcentajes de más arriba, o relaciones de refugios parecidas, se pueden utilizar para las pilas o pirámides dobles o triples en cuestión. Ya que la presente invención da a conocer muchos modos de acción no competitivos contra un insecto a combatir de la diabrotica de la raíz del maíz, la presente invención podría dar a conocer un «refugio cero», es decir, un campo que carece de plantas refugio (porque no son necesarias). Típicamente, se exige un permiso para los campos transgénicos de *B.t.* típicos de más de aproximadamente 10 acres. Así pues, la presente invención incluye un campo de 10 acres o más con un «refugio cero» o plantas no Bt; a los campos de este tamaño se les exigía anteriormente que tuvieran un refugio no Bt significativo.

A continuación, vienen unos ejemplos que ilustran los procedimientos para llevar a la práctica la invención. No se

debe considerar que estos ejemplos sean limitantes. Todos los porcentajes son en peso y todas las proporciones de mezclas de solventes son en volumen, a menos que se indique otra cosa. Todas las temperaturas son en grados Celsius.

A menos que se indique específicamente o esté implícito, los términos «un», «una» y «el» significan «al menos uno», tal y como se utilizan en la presente memoria.

Ejemplos

Ejemplo 1: Construcción de los plásmidos de expresión que codifican las toxinas Cry34Ab1, Cry35Ab1 y Cry3Ba1 completas

Se utilizaron métodos de clonación estándares para la construcción de los plásmidos de expresión de *Pseudomonas fluorescens* (*Pf*) manipulados genéticamente para que produzcan las proteínas Cry completas Cry34Ab1, Cry35Ab1 y Cry3bA1, respectivamente. Se utilizaron las endonucleasas de restricción de New England Biolabs (NEB; Ipswich, MA) para la digestión del ADN y se utilizó la ADN—ligasa de T4 de Invitrogen para la ligación del ADN. Se realizaron preparaciones plasmídicas con el kit Midi para plásmidos (Qiagen), siguiendo las instrucciones del proveedor. Los fragmentos de ADN se purificaron con el cartucho Ultrafree®-DA de Millipore (Billerica, MA) después de la electroforesis en gel de agarosa en Tris-acetato. La estrategia básica de clonación supuso la subclonación de las secuencias codificantes (CDS, por su nombre en inglés) de las proteínas completas Cry34Ab1 y Cry35Ab1 en el pMYC1803 entre los sitios de restricción *SpeI* y *XhoI* (o *XbaI*), y la CDS de una proteína completa Cry3Ba1 en el pMYC1050 entre los sitios de restricción *KpnI* y *XbaI*, respectivamente, mediante lo cual se coloca su expresión bajo el control del promotor *Ptac* y del terminador *rrnBT1T2* del plásmido pKK223-3 (PL Pharmacia, Milwaukee, WI), respectivamente. El pMYC1803 es un plásmido de número medio de copias con el origen de replicación RSF1010, un gen de resistencia a la tetraciclina, y un sitio de fijación del ribosoma delante del sitio de reconocimiento de las enzimas de restricción entre los que se pueden introducir los fragmentos de ADN que contienen la región codificante de las proteínas (solicitud de patente de los EE. UU. n.º 2008/0193974). El plásmido de expresión se transformó mediante electroporación en la cepa MB214 de *P. fluorescens*, se recuperó en el medio SOC con hidrolizado de soja, y se sembró en placas con el medio LB (caldo de lisogenia) que contenía tetraciclina a 20 µg/ml. Los detalles de las manipulaciones microbiológicas están disponibles en la solicitud de patente de los EE. UU. n.º 2006/0008877, la solicitud de patente de los EE. UU. n.º 2008/0193974, y la solicitud de patente de los EE. UU. n.º 2008/0058262. La detección selectiva de las colonias se realizó por la digestión del ADN plasmídico obtenido por minipreparación con enzimas de restricción. El ADN plasmídico de los clones seleccionados que contenían los insertos se secuenció mediante el contrato con un proveedor comercial de secuenciación, tal como MWG Biotech (Huntsville, AL). Los datos de las secuencias se ensamblaron y se analizaron con el programa informático Sequencher™ (Gene Codes Corp., Ann Arbor, MI).

Ejemplo 2: Crecimiento y expresión

El análisis del crecimiento y de la expresión en matraces en agitación para la producción de las toxinas Cry34Ab1, Cry35Ab1 y Cry3Ba1 para la caracterización, que incluye la fijación al receptor de Bt y el bioensayo con insectos, se llevó a cabo mediante el crecimiento de las cepas de *P. fluorescens* que albergan las construcciones de expresión (p. ej., el clon pMYC2593 para Cry34Ab1, el pMYC3122 para Cry35Ab1 y pMYC1177 para Cry3Ba1) en matraces con agitación. Los cultivos seminales que se hicieron crecer en el medio LB complementado con tetraciclina a 20 µg/ml se utilizaron para inocular 200 ml del mismo medio con tetraciclina a 20 µg/ml. La expresión de las toxinas Cry34Ab1, Cry35Ab1 y Cry3Ba1 impulsadas por el promotor *Ptac* se indujo mediante la adición del isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) después de la incubación inicial de 24 horas a 30 °C con agitación. Se tomaron muestras de los cultivos en el momento de la inducción y en diferentes momentos después de la inducción. La densidad celular se midió mediante la densidad óptica a 600 nm (DO₆₀₀).

Ejemplo 3: Fraccionamiento celular y análisis por SDS-PAGE de muestras de matraces en agitación

En cada momento de toma de muestra, la densidad celular de las muestras se ajustó a la DO₆₀₀ = 20, y las alícuotas de 1 ml se centrifugaron a 14000 × g durante cinco minutos. Los sedimentos celulares se congelaron a -80 °C. Se generaron fracciones solubles e insolubles de las muestras congeladas de sedimentos de células del matraz en agitación con la solución para extracción de proteínas bacterianas EasyLyse™ (EPICENTRE® Biotechnologies, Madison, WI). Cada sedimento celular se resuspendió en 1 ml de la solución de EasyLyse™ y se diluyó adicionalmente a 1:4 en el 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 a continuación en un volumen igual de solución salina tamponada con fosfato (PBS; Na₂HPO₄ a 11,9 mM; NaCl a 137 mM, KCl a 2,7 mM, pH 7,4). Las muestras se mezclaron 1:1 con el tampón de muestras de Laemmli a 2× que contenía β-mercaptoetanol y se hirvió durante 5 minutos antes de la carga en geles NuPAGE® Novex® al 4-20% en Bis-Tris (Invitrogen®, Carlsbad, CA). La electroforesis se realizó en el tampón XT MOPS recomendado. Los geles se tiñeron con la tinción segura SimplyBlue™ según el protocolo del fabricante (Invitrogen®) y se tomaron imágenes con el sistema de toma de imágenes Typhoon (GE Healthcare Life Sciences, Pittsburgh, PA).

Ejemplo 4: Preparación de cuerpos de inclusión

Se realizaron preparaciones de cuerpos de inclusión (CI) de proteínas Cry en las células de fermentaciones de *P. fluorescens* que producían la proteína insecticida *B.t.* insoluble, tal y como se demuestra por SDS-PAGE y MALDI-MS (desorción e ionización por láser asistida por una matriz y espectrometría de masas). Los sedimentos de fermentación de *P. fluorescens* se descongelaron al baño María a 37 °C. Las células se resuspendieron al 25% p/v en el tampón de lisis [Tris a 50 mM, pH 7,5, NaCl a 200 mM, sal disódica de EDTA (ácido etilendiaminotetraacético), Triton X-100 al 1% y ditiotreitil (DTT) a 5 mM] y se le añadieron 5 ml/l del coctel inhibidor de proteasas bacterianas (P8465 Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) antes de su uso. Las células se suspendieron con un homogeneizador a la potencia más baja (Tissue Tearor, BioSpec Products, Inc., Bartlesville, OK). Se le añadió lisozima (25 mg de Sigma L7651, de la clara de huevo de pollo) a la suspensión celular y se mezcló con la ayuda de una espátula de metal, y la suspensión se incubó a temperatura ambiente durante una hora. La suspensión se enfrió en hielo durante 15 minutos, se expuso entonces a ultrasonidos en un Branson Sonifier 250 (dos sesiones de 1 min, al 50% del ciclo de trabajo, salida del 30%). La lisis celular se comprobó al microscopio. Se le añadieron 25 mg más de lisozima si era necesario, y se repitió la incubación y la exposición a ultrasonidos. Cuando la lisis celular se confirmó al microscopio, el lisado se centrifugó a 11.500 × *g* durante 25 minutos (4 °C) para formar el sedimento de CI, y se descartó el sobrenadante. El sedimento de CI se resuspendió con 100 ml de tampón de lisis, se homogeneizó con el mezclador manual y se centrifugó como más arriba. El sedimento de CI se lavó repetidamente mediante resuspensión (en 50 ml del tampón de lisis), homogeneización, exposición a ultrasonidos y centrifugación, hasta que el sobrenadante se volvió incoloro y el sedimento de CI adquirió firmeza y se volvió de un color blanquecino. Para el lavado final, el sedimento de CI se resuspendió en agua destilada esterilizada por filtración (0,22 µm) que contenía EDTA a 2 mM, y se centrifugó. El sedimento final se resuspendió en agua destilada esterilizada por filtración que contenía EDTA a 2 mM y se conservó en alícuotas de 1 ml a –80 °C.

Ejemplo 5: Análisis y cuantificación por SDS-PAGE

El análisis y la cuantificación por SDS-PAGE de las proteínas en las preparaciones de CI se realizaron mediante la descongelación de una alícuota de 1 ml del sedimento de CI y la dilución a 1:20 con agua destilada esterilizada por filtración. La muestra diluida se hirvió a continuación con el tampón de muestras reductor a 4× [Tris a 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 gel Novex® del 4 al 20% de 12+2 pocillos en Tris-glicina (Invitrogen®) migrado en el tampón Tris/glicina/SDS a 1× (Invitrogen®). El gel se migró durante aproximadamente 60 min a 200 V y, a continuación, se tiñó y se destiñó siguiendo los procedimientos de tinción segura SimplyBlue™ (Invitrogen®). La cuantificación de las bandas deseadas se realizó por comparación de los valores densitométricos de las bandas frente a las muestras de seroalbúmina bovina (SAB) migradas en el mismo gel para generar una curva estándar mediante el programa informático Quantity One® de Bio-Rad®.

Ejemplo 6: Solubilización de los cuerpos de inclusión

Se centrifugaron 10 ml de las suspensiones de cuerpos de inclusión de los clones de *P. fluorescens* MR1253, MR1636 y MR816 (que contienen de 50 a 70 mg/ml de las proteínas Cry34Ab1, Cry35Ab1 y Cry3Ba1, respectivamente) a la mayor velocidad de una microcentrífuga modelo 5415C de Eppendorf® (aproximadamente a 14.000 × *g*) para sedimentar las inclusiones. Se retiró el sobrenadante de tampón de conservación y se reemplazó por 25 ml de tampón de acetato de sodio a 100 mM, pH 3,0, tanto para Cry34Ab1 como para Cry35Ab1, y por el tampón de carbonato de sodio a 100 mM, pH 11, para la Cry3Ba1, en un tubo cónico de 50 ml, respectivamente. Las inclusiones se resuspendieron con una pipeta y se sometieron a agitación vorticial para mezclarlas a fondo. Los tubos se colocaron en una plataforma de balanceo suave a 4 °C durante una noche para extraer las proteínas completas Cry34Ab1, Cry35Ab1 y Cry3Ba1. Los extractos se centrifugaron a 30.000 × *g* durante 30 min a 4 °C, y se guardaron los sobrenadantes resultantes (que contienen solubilizadas las proteínas Cry completas).

Ejemplo 7: Truncamiento de las protoxinas completas

La Cry35Ab1 y la Cry3Ba1 completas se truncaron o digirieron con quimotripsina o tripsina para producir fragmentos del corazón por quimotripsinación o por tripsinación, que son una forma activa de las proteínas. En especial, la Cry35Ab1 completa solubilizada se incubó con quimotripsina (de páncreas bovino) (Sigma, St. MO) (a 50:1 de proteína Cry:enzima, p/p) en el tampón de acetato de sodio a 100 mM, pH 3,0 (ejemplo 6), a 4 °C con agitación suave durante 2 o 3 días, mientras que la Cry3Ba1 completa se incubó con tripsina (de páncreas bovino) (Sigma, St. MO) (a 20:1 de proteína Cry:enzima, p/p) en el tampón de carbonato de sodio a 100 mM, pH 11 (ejemplo 6), a temperatura ambiente durante 1 a 3 horas. El procesamiento proteolítico completo se confirmó con el análisis por SDS-PAGE. La masa molecular de la Cry35Ab1 completa era aproximadamente igual a 44 kDa y la de la Cry3Ba1 era aproximadamente igual a 73 kDa, y su corazón por quimotripsinación o tripsinación era aproximadamente igual a 40 kDa y aproximadamente igual a 55 kDa, respectivamente. La secuencia de aminoácidos completa y del corazón por quimotripsinación de la Cry35Ab1 se da a conocer como la SEQ ID n.º 1 y la SEQ ID n.º 2, y la secuencia de aminoácidos completa y del corazón por tripsinación de la Cry3Ba1 se da a conocer como la SEQ ID n.º 3 y la SEQ ID n.º 4. No está disponible el corazón por quimotripsinación ni por

tripsinación de la Cry34Ab1 y, así pues, se utilizó la Cry34Ab1 completa para los ensayos de fijación. La secuencia de aminoácidos de la Cry34Ab1 completa se da a conocer como la SEQ ID n.º 5.

Ejemplo 8: Purificación de las toxinas truncadas

Se purificaron los fragmentos del corazón de la Cry35Ab1 quimotripsinizada y de la Cry3Ba1 tripsinizada. En concreto, las reacciones de digestión se centrifugaron a $30000 \times g$ durante 30 min a 4°C para retirar los lípidos, y el sobrenadante resultante se concentró 5 veces con un dispositivo de filtración por centrifugación con celulosa regenerada Ultra-15 de Amicon (el umbral de masa molecular es de 10.000 Da; Millipore). A continuación, el tampón de muestra se les cambió a tampón de acetato de sodio a 20 mM, pH 3,5, tanto para la Cry34Ab1 como para la Cry35Ab1, y a CAPS [ácido 3-(ciclohexamino)-1-propanosulfónico] a 10 mM, pH 10,5, para la Cry3Ba1, mediante columnas PD-10 desechables (GE Healthcare, Piscataway, NJ) o diálisis. El volumen final se les ajustó a 15 ml con el tampón correspondiente para la purificación con el sistema de cromatografía líquida ATKA Explorer (Amersham Biosciences). Para la Cry35Ab1, el tampón A era el tampón de acetato de sodio a 20 mM, pH 3,5, y el tampón B era el tampón A más NaCl a 1 M, pH 3,5. Se utilizó una columna HiTrap SP (5 ml) (GE). Después de que la columna se equilibrase completamente con el tampón A, la solución de la Cry35Ab1 se inyectó en la columna a una velocidad de flujo de 5 ml/min. Se realizó la elución en gradiente del 0 al 100% del tampón B a 5 ml/min con 1 ml/fracción. Para la Cry3Ba1, el tampón A era el tampón de CAPS a 10 mM, pH 10,5, y el tampón B era el tampón de CAPS a 10 mM, pH 10,5, más NaCl a 1 M. Se utilizó una columna Capto Q, 5 ml (5 ml) (GE) y todos los demás procedimientos fueron similares a los de la Cry35Ab1. Después del análisis por SDS-PAGE de las fracciones seleccionadas para elegir las fracciones que contenían la proteína deseada de la mejor calidad, se agruparon estas fracciones. El tampón se le cambió al corazón por quimotripsinación purificado de la Cry35Ab1 con Bis-Tris a 20 mM, pH 6,0, tal y como está descrito más arriba. Para el corazón por tripsinación purificado de la Cry3Ba1, se retiró la sal con columnas PD-10 desechables (GE Healthcare, Piscataway, NJ) o diálisis. Las muestras se guardaron a 4°C para los posteriores ensayos de fijación después de cuantificarlas por SDS-PAGE y el análisis del sistema de toma de imágenes Typhoon (GE) con SAB como patrón estándar.

25 Ejemplo 9: Preparación de las VMMV

Las preparaciones de las vesículas membranosas de microvellosidades (VMMV) de insectos se han utilizado ampliamente para los ensayos de fijación al receptor de la toxina Cry. Las preparaciones de las VMMV utilizadas en esta invención se prepararon a partir del intestino medio aislado del tercer estadio larval de la diabrótica de la raíz del maíz occidental (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte) mediante el método descrito por Wolferberger et al. (1987). La leucina aminopeptidasa se utilizó como marcador de las proteínas de la membrana en la preparación, y la actividad de las leucina aminopeptidasas del homogeneizado bruto y de las preparaciones de las VMMV se determinaron tal y como está descrito antes (Li et al., 2004a). La concentración de proteínas de las preparaciones de las VMMV se midió con el método de Bradford (1976).

Ejemplo 10: Marcación con ^{125}I

La Cry34Ab1 completa, la Cry35Ab1 quimotripsinizada y la Cry3Ba1 tripsinizada, todas ellas purificadas, se marcaron con ^{125}I para los ensayos de fijación competitiva homóloga y a saturación. Para garantizar que la radiomarcación no destruye la actividad biológica de las toxinas Cry, se realizó la yodación fría con NaI siguiendo las instrucciones de Pierce® Iodination Beads (Pierce Biotechnology, Thermo Scientific, Rockford IL). Los resultados del bioensayo indicaban que el corazón quimotripsinado y yodado de la Cry35Ab1 permanecía activo contra las larvas de la diabrótica de la raíz del maíz occidental, pero la yodación inactivó la Cry34Ab1. No se pudo detectar la fijación específica de ^{125}I -Cry34Ab1 radiomarcada a las VMMV de insecto, y, así pues, fue necesario otro método de marcación para valorar la fijación de la Cry34Ab1 al receptor de la membrana. Dado que la Cry3Ba1 tripsinizada tenía poca actividad contra la diabrótica de la raíz del maíz occidental y, así pues, el bioensayo con la diabrótica de la raíz del maíz con el uso del corazón tripsinado y yodado de la Cry3Ba1 fría se pensó que era difícil que valorara el cambio de actividad. Además, la fijación específica de la ^{125}I -Cry3Ba1 a las VMMV se detectó incluso aunque el nivel fuera bajo. Se ignoraron la yodación fría de la Cry3Ba1 y su ensayo de toxicidad. La ^{125}I -Cry35Ab1 y la ^{125}I -Cry3Ba1 radiomarcadas se obtuvieron mediante la yodación con Pierce® Iodination Beads (Pierce) y Na^{125}I . Se utilizaron las columnas de desalación por centrifugación Zeba™ (Pierce) para retirar de la proteína yodada el Na^{125}I libre o que no se incorporó. La radioactividad específica de las proteínas Cry yodadas oscilaba de 1 a $5 \mu\text{Ci}/\mu\text{g}$. Se llevaron a cabo varios lotes de marcación y ensayos de fijación.

Ejemplo 11: Ensayos de fijación a saturación

Se realizaron los ensayos de fijación a saturación o específicos con las toxinas Cry marcadas con ^{125}I tal y como se describió con anterioridad (Li et al. 2004b). Para determinar la fijación específica y estimar la afinidad de fijación (constante de disociación, Kd) y la concentración del sitio de fijación (Bmax) de la Cry35Ab1 y de la Cry3Ba1 a las VMMV de insecto, se incubaron una serie de concentraciones crecientes de ^{125}I -Cry35Ab1 o bien ^{125}I -Cry3Ba1 con una concentración dada (0,1 mg/ml) de las VMMV de insecto, respectivamente, en 150 μl de Bis-Tris a 20 mM, pH 6,0, KCl a 150 mM, complementado con SAB al 0,1%, a temperatura ambiente durante 1 hora con agitación suave. La toxina fijada a las VMMV se separó de la toxina libre en la suspensión mediante

centrifugación a $20.000 \times g$ a temperatura ambiente durante 8 min. El sedimento se lavó dos veces con $900 \mu\text{l}$ (enfriados en hielo) del mismo tampón que contiene SAB al 0,1%. La radioactividad que queda en el sedimento se midió con un contador COBRAII Auto-Gamma (Packard, una compañía de Canberra) y se consideró la fijación total. Otra serie de reacciones de fijación se iniciaron a la vez y se incluyó un exceso de 500 a 1000 veces de la toxina correspondiente sin marcar en cada una de las reacciones de fijación para ocupar totalmente los sitios de fijación específicos de las VMMV, lo que se utilizó para determinar la fijación inespecífica. Se estimó la fijación específica mediante la sustracción de la fijación inespecífica de la fijación total. Se estimaron los valores de la Kd y la Bmax de estas toxinas mediante la fijación inespecífica frente a las concentraciones de la toxina marcada con el uso de GraphPad Prism 5.01 (GraphPad Software, San Diego, CA). Los gráficos se construyeron con los programas informáticos Microsoft Excel o bien GraphPad Prism. Se replicaron los experimentos al menos cuatro veces y el resultado se representó en los gráficos de la figura 1A (fijación de ^{125}I -Cry35Ab1 a las VMMV) y de la figura 1B (fijación de ^{125}I -Cry3Ba1 a las VMMV). Estos experimentos de fijación demostraron que tanto la ^{125}I -Cry35Ab1 como la ^{125}I -Cry3Ba1 eran capaces de fijarse específicamente a las VMMV (figuras 1A y 1B). La ^{125}I -Cry35Ab1 y la ^{125}I -Cry3Ba1 tenían una afinidad de fijación, Kd = $11,66 \pm 11,44$, $7,35 \pm 3,81$ (nM), respectivamente, y una concentración en el sitio de fijación Bmax = $0,78 \pm 0,46$, $0,55 \pm 0,13$ (VMMV a pmol/mg), respectivamente.

La fijación específica de la ^{125}I -Cry35Ab1 se llevó a cabo en presencia de la Cry34Ab1 sin marcar (1:50 = ^{125}I -Cry35Ab1:Cry34Ab1, relación molar). No se obtuvieron los parámetros de fijación (Kd y Bmax) porque la fijación específica de la ^{125}I -Cry35Ab1 no estaba saturada (figura 2). No obstante, la fijación específica de la ^{125}I -Cry35Ab1 era responsable de aproximadamente el 90% de la fijación total en presencia de la Cry34Ab1 sin marcar.

Ejemplo 12: Ensayos de fijación competitiva

Se realizaron ensayos de fijación competitiva para determinar si la Cry34Ab1 y la Cry35Ab1, por separado, más su mezcla como una toxina binaria, comparten un mismo conjunto de sitios de fijación con la Cry3Ba1. Para los ensayos de fijación competitiva homóloga de la Cry3Ba1, se mezclaron primero cantidades crecientes (de 0 a 2500 nM) de la Cry3Ba1 sin marcar con la ^{125}I -Cry3Ba1 a 5 mM, y a continuación se incubaron las VMMV del insecto a 0,1 mg/ml a temperatura ambiente durante 1 hora, respectivamente, para permitirles competir por el receptor o receptores posibles de las VMMV. De igual forma, la competición homóloga de la Cry35Ab1 se completó con la ^{125}I -Cry35Ab1 a 5 nM en ausencia o presencia de la Cry34Ab1 sin marcar (1:50 = ^{125}I -Cry35Ab1:Cry34Ab1, relación molar) y con las VMMV a 0,03 mg/ml, respectivamente. El porcentaje de la ^{125}I -Cry3Ba1 o la ^{125}I -Cry35Ab1 fijada a las VMMV se determinó para cada una de las reacciones por comparación con la fijación total (o específica) inicial en ausencia del competidor sin marcar.

Los ensayos de fijación competitiva heteróloga entre la ^{125}I -Cry35Ab1 y la Cry3Ba1 sin marcar se realizaron en ausencia o presencia de la Cry34Ab1 sin marcar para identificar si comparten un mismo conjunto de sitio o sitios de fijación. Esto se consiguió con el incremento de la cantidad de la Cry3Ba1 sin marcar como competidor para competir por la fijación con la ^{125}I -Cry35Ab1 sola o con la ^{125}I -Cry35Ab1 más la Cry34Ab1 (1:50 = ^{125}I -Cry35Ab1:Cry34Ab1, relación molar). De igual forma, también se realizaron ensayos de fijación competitiva heteróloga recíproca, lo que se consiguió mediante el incremento de la cantidad de la Cry35Ab1 y de la Cry34Ab1 por separado y sin marcar, o la mezcla de Cry35Ab1 más Cry34Ab1 (1:50 = Cry35Ab1:Cry34Ab1, razón molar), como uno o dos competidores incluidos en las reacciones para competir por la fijación con la Cry3Ba1 marcada, respectivamente. Los experimentos se replicaron al menos tres veces y el resultado se representó en los gráficos de la figura 3A (porcentaje de fijación de la ^{125}I -Cry35Ab sola) y de la figura 3B (porcentaje de fijación de la ^{125}I -Cry35Ab1 en presencia de la Cry34Ab1).

Los resultados experimentales demostraron que la Cry35Ab1 era capaz de desplazar por competición la fijación específica de la ^{125}I -Cry35Ab1 independientemente de la ausencia (figura 3A) o de la presencia (figura 3B) de la Cry34Ab1. Sin embargo, la Cry3Ba1 era incapaz de desplazar por competición la fijación específica de la ^{125}I -Cry35Ab1 ni en ausencia ni en presencia de la Cry34Ab1. En los ensayos de fijación competitiva recíproca, la Cry3Ba también fue capaz de desplazar por sí sola algo más del 20% de la fijación total, lo que refleja que desplazaba por competición completamente su fijación específica, ya que la fijación específica es responsable de solo una pequeña fracción (véase la figura 1B). Sin embargo, tanto la Cry34Ab1 como la Cry35Ab1 solas, o la mezcla de la Cry35Ab1 más la Cry34Ab1 (1:10) no eran capaces de desplazar a la ^{125}I -Cry3Ba1. Estos datos indicaban que la Cry35Ab1 sola o que la mezcla de la Cry35Ab1 más la Cry34Ab1 no comparten un sitio de fijación al receptor con la Cry3Ba1.

Referencias:

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding, *Anal. Biochem.* **72**, 248–254.

Li, H., Oppert, B., Higgins, R.A., Huang, F., Zhu, K.Y., Buschman, L.L., 2004a. Comparative analysis of proteinase activities of *Bacillus thuringiensis*-resistant and -susceptible *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae). *Insect Biochem. Mol. Biol.* **34**, 753–762.

Li, H., Oppert, B., Gonzalez–Cabrera, J., Ferré, J., Higgins, R.A., Buschman, L.L. and Zhu, K.Y. and Huang, F. 2004b. Binding analysis of Cry1Ab and Cry1Ac with membrane vesicles from *Bacillus thuringiensis*–resistant and –susceptible *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **323**, 52–57.

Wolfersberger, M.G., Luthy, P., Maurer, A., Parenti, P., Sacchi, F., Giordana, B., Hanozet, G.M., 1987. Preparation and partial characterization of amino acid transporting brush border membranevesicles from the larval midgut of the cabbage butterfly (*Pieris brassicae*). *Comp. Biochem. Physiol.* **86A**, 301–308.

Solicitud de patente de los EE. UU. n.º 20080193974. 2008. Bacterial leader sequences for increased expression.

Solicitud de patente de los EE. UU. n.º 20060008877, 2006. Expression systems with sec-system secretion.

5 Solicitud de patente de los EE. UU. n.º 20080058262. 2008. rPA optimization.

Lista de secuencias

<110> DOW AGROSCIENCES

<120> Combinaciones que incluyen las proteínas Cry34Ab/35Ab y Cry3BA para impedir el desarrollo de resistencia en las larvas de crisomélidos del maíz

10 <130> DAS-P0172-US-02

<160> 5

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 383

15 <212> PRT

<213> *Bacillus thuringiensis*

<400> 1

ES 2 665 514 T3

Met Leu Asp Thr Asn Lys Val Tyr Glu Ile Ser Asn His Ala Asn Gly
 1 5 10 15

Leu Tyr Ala Ala Thr Tyr Leu Ser Leu Asp Asp Ser Gly Val Ser Leu
 20 25 30

Met Asn Lys Asn Asp Asp Asp Ile Asp Asp Tyr Asn Leu Lys Trp Phe
 35 40 45

Leu Phe Pro Ile Asp Asp Asp Gln Tyr Ile Ile Thr Ser Tyr Ala Ala
 50 55 60

Asn Asn Cys Lys Val Trp Asn Val Asn Asn Asp Lys Ile Asn Val Ser
 65 70 75 80

Thr Tyr Ser Ser Thr Asn Ser Ile Gln Lys Trp Gln Ile Lys Ala Asn
 85 90 95

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

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

Asn Asn Pro Asn Gln Gln Trp Asn Leu Thr Ser Val Gln Thr Ile Gln
 130 135 140

Leu Pro Gln Lys Pro Ile Ile Asp Thr Lys Leu Lys Asp Tyr Pro Lys
 145 150 155 160

Tyr Ser Pro Thr Gly Asn Ile Asp Asn Gly Thr Ser Pro Gln Leu Met
 165 170 175

Gly Trp Thr Leu Val Pro Cys Ile Met Val Asn Asp Pro Asn Ile Asp

ES 2 665 514 T3

180 185 190

Lys Asn Thr Gln Ile Lys Thr Thr Pro Tyr Tyr Ile Leu Lys Lys Tyr
195 200 205

Gln Tyr Trp Gln Arg Ala Val Gly Ser Asn Val Ala Leu Arg Pro His
210 215 220

Glu Lys Lys Ser Tyr Thr Tyr Glu Trp Gly Thr Glu Ile Asp Gln Lys
225 230 235 240

Thr Thr Ile Ile Asn Thr Leu Gly Phe Gln Ile Asn Ile Asp Ser Gly
245 250 255

Met Lys Phe Asp Ile Pro Glu Val Gly Gly Gly Thr Asp Glu Ile Lys
260 265 270

Thr Gln Leu Asn Glu Glu Leu Lys Ile Glu Tyr Ser His Glu Thr Lys
275 280 285

Ile Met Glu Lys Tyr Gln Glu Gln Ser Glu Ile Asp Asn Pro Thr Asp
290 295 300

Gln Ser Met Asn Ser Ile Gly Phe Leu Thr Ile Thr Ser Leu Glu Leu
305 310 315 320

Tyr Arg Tyr Asn Gly Ser Glu Ile Arg Ile Met Gln Ile Gln Thr Ser
325 330 335

Asp Asn Asp Thr Tyr Asn Val Thr Ser Tyr Pro Asn His Gln Gln Ala
340 345 350

Leu Leu Leu Leu Thr Asn His Ser Tyr Glu Glu Val Glu Glu Ile Thr
355 360 365

Asn Ile Pro Lys Ser Thr Leu Lys Lys Leu Lys Lys Tyr Tyr Phe
370 375 380

<210> 2
 <211> 354
 5 <212> PRT
 <213> Bacillus thuringiensis
 <400> 2

Met Leu Asp Thr Asn Lys Val Tyr Glu Ile Ser Asn His Ala Asn Gly
1 5 10 15

Leu Tyr Ala Ala Thr Tyr Leu Ser Leu Asp Asp Ser Gly Val Ser Leu
20 25 30

10

ES 2 665 514 T3

Met Asn Lys Asn Asp Asp Asp Ile Asp Asp Tyr Asn Leu Lys Trp Phe
 35 40 45

Leu Phe Pro Ile Asp Asp Asp Gln Tyr Ile Ile Thr Ser Tyr Ala Ala
 50 55 60

Asn Asn Cys Lys Val Trp Asn Val Asn Asn Asp Lys Ile Asn Val Ser
 65 70 75 80

Thr Tyr Ser Ser Thr Asn Ser Ile Gln Lys Trp Gln Ile Lys Ala Asn
 85 90 95

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

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

Asn Asn Pro Asn Gln Gln Trp Asn Leu Thr Ser Val Gln Thr Ile Gln
 130 135 140

Leu Pro Gln Lys Pro Ile Ile Asp Thr Lys Leu Lys Asp Tyr Pro Lys
 145 150 155 160

Tyr Ser Pro Thr Gly Asn Ile Asp Asn Gly Thr Ser Pro Gln Leu Met
 165 170 175

Gly Trp Thr Leu Val Pro Cys Ile Met Val Asn Asp Pro Asn Ile Asp
 180 185 190

Lys Asn Thr Gln Ile Lys Thr Thr Pro Tyr Tyr Ile Leu Lys Lys Tyr
 195 200 205

Gln Tyr Trp Gln Arg Ala Val Gly Ser Asn Val Ala Leu Arg Pro His
 210 215 220

Glu Lys Lys Ser Tyr Thr Tyr Glu Trp Gly Thr Glu Ile Asp Gln Lys
 225 230 235 240

Thr Thr Ile Ile Asn Thr Leu Gly Phe Gln Ile Asn Ile Asp Ser Gly
 245 250 255

Met Lys Phe Asp Ile Pro Glu Val Gly Gly Gly Thr Asp Glu Ile Lys
 260 265 270

Thr Gln Leu Asn Glu Glu Leu Lys Ile Glu Tyr Ser His Glu Thr Lys
 275 280 285

ES 2 665 514 T3

Ile Met Glu Lys Tyr Gln Glu Gln Ser Glu Ile Asp Asn Pro Thr Asp
 290 295 300

Gln Ser Met Asn Ser Ile Gly Phe Leu Thr Ile Thr Ser Leu Glu Leu
 305 310 315 320

Tyr Arg Tyr Asn Gly Ser Glu Ile Arg Ile Met Gln Ile Gln Thr Ser
 325 330 335

Asp Asn Asp Thr Tyr Asn Val Thr Ser Tyr Pro Asn His Gln Gln Ala
 340 345 350

Leu Leu

- <210> 3
- <211> 659
- 5 <212> PRT
- <213> Bacillus thuringiensis
- <400> 3

Met Ile Arg Met Gly Gly Arg Lys Met Asn Pro Asn Asn Arg Ser Glu
 1 5 10 15

Tyr Asp Thr Ile Lys Val Thr Pro Asn Ser Glu Leu Pro Thr Asn His
 20 25 30

Asn Gln Tyr Pro Leu Ala Asp Asn Pro Asn Ser Thr Leu Glu Glu Leu
 35 40 45

Asn Tyr Lys Glu Phe Leu Arg Met Thr Ala Asp Asn Ser Thr Glu Val
 50 55 60

Leu Asp Ser Ser Thr Val Lys Asp Ala Val Gly Thr Gly Ile Ser Val
 65 70 75 80

Val Gly Gln Ile Leu Gly Val Val Gly Val Pro Phe Ala Gly Ala Leu
 85 90 95

Thr Ser Phe Tyr Gln Ser Phe Leu Asn Ala Ile Trp Pro Ser Asp Ala
 100 105 110

Asp Pro Trp Lys Ala Phe Met Ala Gln Val Glu Val Leu Ile Asp Lys
 115 120 125

Lys Ile Glu Glu Tyr Ala Lys Ser Lys Ala Leu Ala Glu Leu Gln Gly
 130 135 140

Leu Gln Asn Asn Phe Glu Asp Tyr Val Asn Ala Leu Asp Ser Trp Lys
 145 150 155 160

10

ES 2 665 514 T3

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

ES 2 665 514 T3

Ile Ala Ala Phe Pro Asp Gly Lys Ile Tyr Phe Gly Val Thr Lys Val
 420 425 430

Asp Phe Ser Gln Tyr Asp Asp Gln Lys Asn Glu Thr Ser Thr Gln Thr
 435 440 445

Tyr Asp Ser Lys Arg Tyr Asn Gly Tyr Leu Gly Ala Gln Asp Ser Ile
 450 455 460

Asp Gln Leu Pro Pro Glu Thr Thr Asp Glu Pro Leu Glu Lys Ala Tyr
 465 470 475 480

Ser His Gln Leu Asn Tyr Ala Glu Cys Phe Leu Met Gln Asp Arg Arg
 485 490 495

Gly Thr Ile Pro Phe Phe Thr Trp Thr His Arg Ser Val Asp Phe Phe
 500 505 510

Asn Thr Ile Asp Ala Glu Lys Ile Thr Gln Leu Pro Val Val Lys Ala
 515 520 525

Tyr Ala Leu Ser Ser Gly Ala Ser Ile Ile Glu Gly Pro Gly Phe Thr
 530 535 540

Gly Gly Asn Leu Leu Phe Leu Lys Glu Ser Ser Asn Ser Ile Ala Lys
 545 550 555 560

Phe Lys Val Thr Leu Asn Ser Ala Ala Leu Leu Gln Arg Tyr Arg Val
 565 570 575

Arg Ile Arg Tyr Ala Ser Thr Thr Asn Leu Arg Leu Phe Val Gln Asn
 580 585 590

Ser Asn Asn Asp Phe Leu Val Ile Tyr Ile Asn Lys Thr Met Asn Ile
 595 600 605

Asp Gly Asp Leu Thr Tyr Gln Thr Phe Asp Phe Ala Thr Ser Asn Ser
 610 615 620

Asn Met Gly Phe Ser Gly Asp Thr Asn Asp Phe Ile Ile Gly Ala Glu
 625 630 635 640

Ser Phe Val Ser Asn Glu Lys Ile Tyr Ile Asp Lys Ile Glu Phe Ile
 645 650 655

Pro Val Gln

<210> 4
 <211> 489

ES 2 665 514 T3

<212> PRT

<213> Bacillus thuringiensis

<400> 4

Ser Gln Asp Arg Ile Arg Glu Leu Phe Ser Gln Ala Glu Ser His Phe
 1 5 10 15

Arg Asn Ser Met Pro Ser Phe Ala Val Ser Lys Phe Glu Val Leu Phe
 20 25 30

Leu Pro Thr Tyr Ala Gln Ala Ala Asn Thr His Leu Leu Leu Leu Lys
 35 40 45

Asp Ala Gln Val Phe Gly Glu Glu Trp Gly Tyr Ser Ser Glu Asp Ile
 50 55 60

Ala Glu Phe Tyr Gln Arg Gln Leu Lys Leu Thr Gln Gln Tyr Thr Asp
 65 70 75 80

His Cys Val Asn Trp Tyr Asn Val Gly Leu Asn Ser Leu Arg Gly Ser
 85 90 95

Thr Tyr Asp Ala Trp Val Lys Phe Asn Arg Phe Arg Arg Glu Met Thr
 100 105 110

Leu Thr Val Leu Asp Leu Ile Val Leu Phe Pro Phe Tyr Asp Val Arg
 115 120 125

Leu Tyr Ser Lys Gly Val Lys Thr Glu Leu Thr Arg Asp Ile Phe Thr
 130 135 140

Asp Pro Ile Phe Thr Leu Asn Ala Leu Gln Glu Tyr Gly Pro Thr Phe
 145 150 155 160

Ser Ser Ile Glu Asn Ser Ile Arg Lys Pro His Leu Phe Asp Tyr Leu
 165 170 175

Arg Gly Ile Glu Phe His Thr Arg Leu Arg Pro Gly Tyr Ser Gly Lys
 180 185 190

Asp Ser Phe Asn Tyr Trp Ser Gly Asn Tyr Val Glu Thr Arg Pro Ser
 195 200 205

Ile Gly Ser Asn Asp Thr Ile Thr Ser Pro Phe Tyr Gly Asp Lys Ser
 210 215 220

Ile Glu Pro Ile Gln Lys Leu Ser Phe Asp Gly Gln Lys Val Tyr Arg
 225 230 235 240

ES 2 665 514 T3

Thr Ile Ala Asn Thr Asp Ile Ala Ala Phe Pro Asp Gly Lys Ile Tyr
 245 250 255

Phe Gly Val Thr Lys Val Asp Phe Ser Gln Tyr Asp Asp Gln Lys Asn
 260 265 270

Glu Thr Ser Thr Gln Thr Tyr Asp Ser Lys Arg Tyr Asn Gly Tyr Leu
 275 280 285

Gly Ala Gln Asp Ser Ile Asp Gln Leu Pro Pro Glu Thr Thr Asp Glu
 290 295 300

Pro Leu Glu Lys Ala Tyr Ser His Gln Leu Asn Tyr Ala Glu Cys Phe
 305 310 315 320

Leu Met Gln Asp Arg Arg Gly Thr Ile Pro Phe Phe Thr Trp Thr His
 325 330 335

Arg Ser Val Asp Phe Phe Asn Thr Ile Asp Ala Glu Lys Ile Thr Gln
 340 345 350

Leu Pro Val Val Lys Ala Tyr Ala Leu Ser Ser Gly Ala Ser Ile Ile
 355 360 365

Glu Gly Pro Gly Phe Thr Gly Gly Asn Leu Leu Phe Leu Lys Glu Ser
 370 375 380

Ser Asn Ser Ile Ala Lys Phe Lys Val Thr Leu Asn Ser Ala Ala Leu
 385 390 395 400

Leu Gln Arg Tyr Arg Val Arg Ile Arg Tyr Ala Ser Thr Thr Asn Leu
 405 410 415

Arg Leu Phe Val Gln Asn Ser Asn Asn Asp Phe Leu Val Ile Tyr Ile
 420 425 430

Asn Lys Thr Met Asn Ile Asp Gly Asp Leu Thr Tyr Gln Thr Phe Asp
 435 440 445

Phe Ala Thr Ser Asn Ser Asn Met Gly Phe Ser Gly Asp Thr Asn Asp
 450 455 460

Phe Ile Ile Gly Ala Glu Ser Phe Val Ser Asn Glu Lys Ile Tyr Ile
 465 470 475 480

Asp Lys Ile Glu Phe Ile Pro Val Gln
 485

<210> 5
 <211> 123
 <212> PRT
 5 <213> Bacillus thuringiensis

ES 2 665 514 T3

<400> 5

Met Ser Ala Arg Glu Val His Ile Asp Val Asn Asn Lys Thr Gly His
 1 5 10 15

Thr Leu Gln Leu Glu Asp Lys Thr Lys Leu Asp Gly Gly Arg Trp Arg
 20 25 30

Thr Ser Pro Thr Asn Val Ala Asn Asp Gln Ile Lys Thr Phe Val Ala
 35 40 45

Glu Ser Asn Gly Phe Met Thr Gly Thr Glu Gly Thr Ile Tyr Tyr Ser
 50 55 60

Ile Asn Gly Glu Ala Glu Ile Ser Leu Tyr Phe Asp Asn Pro Phe Ala
 65 70 75 80

Gly Ser Asn Lys Tyr Asp Gly His Ser Asn Lys Ser Gln Tyr Glu Ile
 85 90 95

Ile Thr Gln Gly Gly Ser Gly Asn Gln Ser His Val Thr Tyr Thr Ile
 100 105 110

Gln Thr Thr Ser Ser Arg Tyr Gly His Lys Ser
 115 120

REIVINDICACIONES

1. Una planta transgénica que expresa una proteína insecticida Cry34Ab, una proteína insecticida Cry35Ab y una proteína insecticida Cry3Ba.
2. La planta transgénica de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha planta expresa además una
5 cuarta proteína insecticida seleccionada del grupo que consiste en Cry3Aa y Cry6Aa.
3. Una semilla de la planta transgénica de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde dicha semilla comprende ADN que codifica la proteína insecticida Cry34Ab, la proteína insecticida Cry35Ab y la proteína insecticida Cry3Ba.
4. Numerosas plantas transgénicas de acuerdo con la reivindicación 1 o 2.
- 10 5. La planta de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde dicha planta es una planta de maíz.
6. Una célula vegetal de la planta de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde dicha proteína insecticida Cry35Ab es idéntica al menos al 95% a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID n.º 1 y la SEQ ID n.º 2, dicha proteína insecticida Cry3Ba es idéntica al menos al 95% a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID n.º 3 y la SEQ ID n.º 4, y dicha proteína insecticida Cry34Ab
15 es idéntica al menos al 95% a la SEQ ID n.º 5.
7. La planta transgénica de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde dicha proteína insecticida Cry35Ab comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID n.º 1 y la SEQ ID n.º 2, dicha proteína insecticida Cry3Ba comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID n.º 3 y la SEQ ID n.º 4, y dicha proteína insecticida Cry34Ab comprende la SEQ ID n.º 5.
- 20 8. Un método para producir la célula vegetal de acuerdo con la reivindicación 6, en donde dicho método comprende la transformación de una célula vegetal con ADN capaz de expresar las proteínas de acuerdo con la reivindicación 1 o 2.
9. Un método para controlar un insecto de tipo diabrotica de la raíz del maíz al poner en contacto dicho
25 insecto con una proteína insecticida Cry34Ab, una proteína insecticida Cry35Ab, y una proteína insecticida Cry3Ba.
10. La planta transgénica de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha proteína insecticida Cry34Ab es una proteína insecticida Cry34Ab1, dicha proteína insecticida Cry35Ab es una proteína insecticida Cry35Ab1, y dicha proteína insecticida Cry3Ba es una proteína insecticida Cry3Ba1.

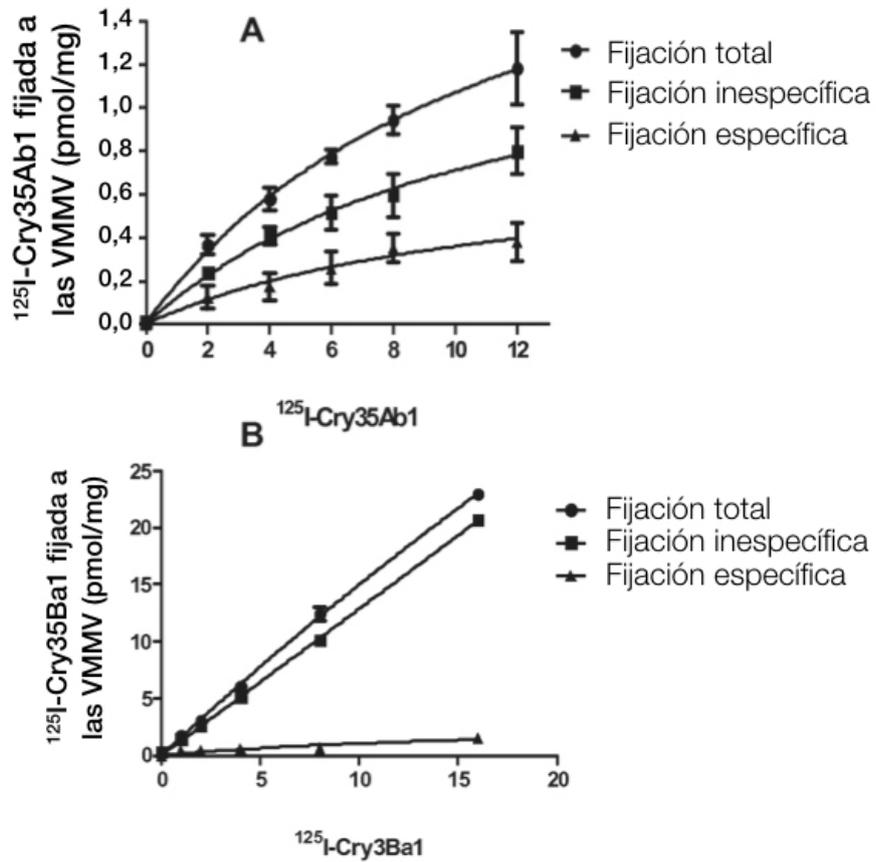


Figura 1: Fijación de ^{125}I -Cry35Ab1 (A) y ^{125}I -Cry3Ba1 (B) en función de la cantidad (nM) de toxinas Cry radiomarcadas añadidas a las VMMV a 0,1 mg/ml preparadas a partir de larvas de la diabrotica de la raíz del maíz occidental. Fijación específica = fijación total – fijación inespecífica, barra de error = EEM (error estándar de la media). Cry35Ab1: corazón quimotripsinado (40 kDa); y Cry3Ba1: corazón tripsinado (55 kDa).

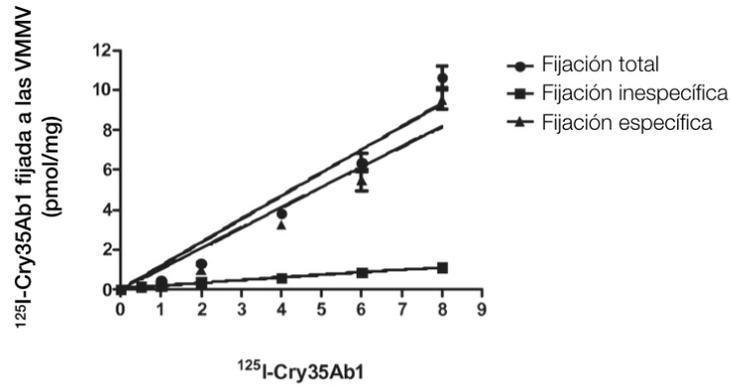


Figura 2: Fijación de $^{125}\text{I-Cry35Ab1}$ en presencia de Cry34Ab1 (proporción molar 1:50 de $^{125}\text{I-Cry35Ab1:Cry34Ab1}$) en función de la cantidad (nM) de Cry35Ab1 radiomarcada añadida a las VMNV a 0,03 mg/ml preparadas a partir de larvas de la diabrótica de la raíz del maíz occidental. Fijación específica = fijación total – fijación inespecífica, barra de error = EEM (error estándar de la media). Cry35Ab1: corazón quimotripsinado (40 kDa)

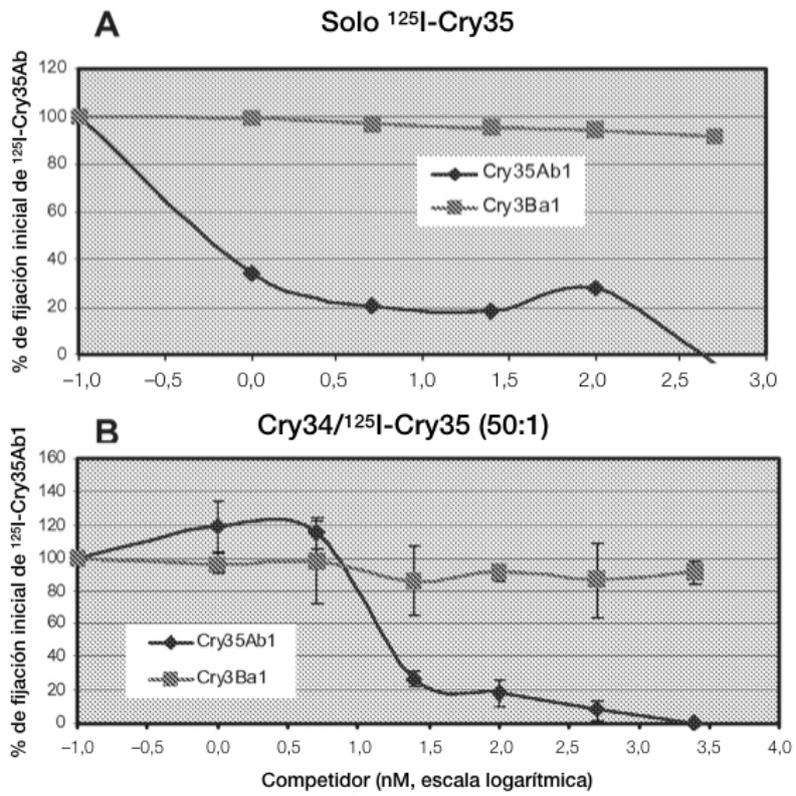


Figura 3: Porcentaje de fijación específica inicial de ^{125}I -Cry35Ab1 sobre las VMMV a 0,1 mg/ml (panel A) o a 0,03 mg/ml (panel B) preparadas a partir de larvas de la diabrótica de la raíz del maíz occidental a diferentes concentraciones de competidores sin marcar incubados con ^{125}I -Cry35Ab1 sola a 5 nM (panel A) o con ^{125}I -Cry34Ab1 a 250 nM más ^{125}I -Cry35Ab1 a 5 nM (panel B). Cry34Ab1: completa (14 kDa); Cry35Ab1: corazón quimotripsinado (40 kDa); y Cry3Ba1: corazón tripsinado (55 kDa): log 0,1 = -1,0, log 1 = 0, log 10 = 1,0, log 100 = 2,0, log 1000 = 3,0.

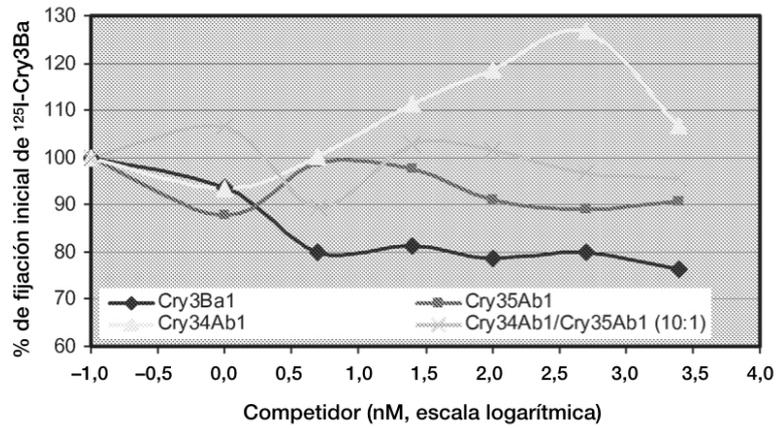


Figura 4: Porcentaje de fijación total inicial de ^{125}I -Cry3Ba1 sobre las VMMV a 0,1 mg/ml preparadas a partir de larvas de la diabrotica de la raíz del maíz occidental a diferentes concentraciones de competidores sin marcar incubados con ^{125}I -Cry3Ba1 a 5 nM. Cry34Ab1: completa (14 kDa); Cry35Ab1: corazón quimotripsinado (40 kDa); y Cry3Ba1: corazón tripsinado (55 kDa): $\log 0,1 = -1,0$, $\log 1 = 0$, $\log 10 = 1,0$, $\log 100 = 2,0$, $\log 1000 = 3,0$.