

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 682 351**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/82** (2006.01)

**C07K 14/325** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.02.2014 PCT/US2014/015997**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.08.2014 WO14126986**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.02.2014 E 14707888 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.05.2018 EP 2956547**

54 Título: **Uso de AXMI184 para el control de los insectos del gusano de la raíz**

30 Prioridad:

**13.02.2013 US 201361764246 P**

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

**20.09.2018**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**MCNULTY, BRIAN y  
STAUFFER, MARIA**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 682 351 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Uso de AXMI184 para el control de los insectos del gusano de la raíz

### Referencia al listado de secuencias presentado en formato electrónico

5 La copia oficial del listado de secuencias se presenta en formato electrónico a través de EFS-Web como un listado de secuencias en formato ASCII con un archivo con el nombre "APA136001SEQLIST.txt", creado el 16 de enero de 2013, y con un tamaño de 14 kilobytes, el cual se presenta conjuntamente con la memoria descriptiva. El listado de secuencias que aparece en este documento en formato ASCII es parte de la memoria descriptiva y se incorpora a la presente a modo de referencia en su totalidad.

### Campo de la invención

10 La presente invención se relaciona con el campo de la biología molecular. Se desvelan genes que codifican proteínas plaguicidas. Estas proteínas, y las secuencias de ácidos nucleicos que las codifican, son útiles para preparar formulaciones plaguicidas y en la producción de plantas transgénicas resistentes a plagas.

### Antecedentes de la invención

15 El gusano de la raíz del maíz es una plaga agrícola importante. El gusano de la raíz del maíz occidental, *Diabrotica virgifera virgifera*, es una de las especies de gusano de la raíz del maíz más devastadoras en América del Norte, especialmente en las áreas de cultivo de maíz de la región central, como Iowa. Tanto las larvas del gusano de la raíz del maíz como los adultos pueden dañar las plantas de maíz. Las larvas recién nacidas se alimentan principalmente de las cabelleras de la raíz y del tejido externo de la raíz. A medida que las larvas crecen y aumenta su necesidad de alimentarse, barrenan las raíces para alimentarse. El daño de las larvas normalmente es más grave después de que el segundo sistema de raíces está bien establecido y se desarrollan raíces de sostén. Las puntas de las raíces se verán marrones y a menudo les hacen túneles y las mastican hacia la base de la planta. Las larvas pueden encontrarse haciendo túneles en raíces más grandes y ocasionalmente en la copa de la planta. Se ha recurrido a la rotación de los cultivos, estrategias de plantación temprana, insecticidas y plantas transgénicas que expresan toxinas contra los gusanos de la raíz en un intento por controlar sus poblaciones.

25 Se plantaron cultivos transgénicos diseñados para producir toxinas insecticidas derivadas de la bacteria *Bacillus thuringiensis* (Bt) en más de 58 millones de hectáreas alrededor del mundo en 2010 (James C (2010) Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2010. ISAAA Brief No. 42. Ithaca, Nueva York: ISAAA). Los beneficios de los cultivos de Bt incluyen un menor uso de insecticidas dañinos y la supresión regional de algunas plagas agrícolas clave (Carrière et al. (2003) Proc Natl Acad Sci U S A 100: 1519–1523; Cattaneo et al. (2006) Proc Natl Acad Sci U S A 103: 7571–7576; Huang et al. (2005) Science 308: 688–690; Wu (2008) Science 321: 1676–1678; y Hutchison et al. (2010) Science 330: 222–225). El gusano de la raíz del maíz occidental *Diabrotica virgifera* LeConte (Coleoptera: Chrysomelidae) se encuentra entre las plagas más graves del maíz en los Estados Unidos, cuyas larvas que se alimentan de las raíces del maíz son la causa de la mayoría de las pérdidas de cultivos por esta plaga. En 2003 se comenzó a comercializar el maíz Bt para el control de las larvas del gusano de la raíz del maíz occidental y fue rápidamente adoptado por los granjeros, constituyendo más del 45% del cultivo del maíz en los Estados Unidos durante 2009 (James C (2009) Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2009. ISAAA Brief No. 41. Ithaca, Nueva York: ISAAA; Environmental Protection Agency (2003) Biopesticides registration action document: event MON863 Bacillus thuringiensis Cry3Bb1 Corn).

40 La estrategia de refugio se utiliza en los Estados Unidos y en otras partes para retrasar la resistencia de las plagas a los cultivos Bt (Gould F (1998) Annu Rev Entomol 43: 701–72). Esta estrategia utiliza plantas huéspedes que no son Bt como refugio para genotipos susceptibles a Bt. Sin embargo, el gusano de la raíz del maíz occidental ha demostrado repetidamente su capacidad de adaptarse a las estrategias de manejo de plagas (Gray et al. (2009) Annu Rev Entomol 54: 303–321). Ejemplos incluyen la evolución de la resistencia a los insecticidas convencionales y la práctica de cultivo de rotación de los cultivos (Meinke et al. (1998) J Econ Entomol 91: 594–600; Parimi et al. (2006) J Econ Entomol 25: 269–274; Levine et al. (2002) Am Entomol 48: 94–107). Asimismo, Gassmann et al. (2011, PLoS ONE 6(7): e22629) recientemente reportaron que los campos identificados por los granjeros que tenían un daño grave al maíz Bt por la alimentación del gusano de la raíz contenían poblaciones de gusano de la raíz del maíz occidental que exhibieron una supervivencia considerablemente más alta en el maíz Cry3Bb1 en bioensayos de laboratorio que el gusano de la raíz del maíz occidental de campos no asociados con dicho daño por alimentación.

### Sumario de la invención

55 Se proveen composiciones y procedimientos para conferir actividad plaguicida a bacterias, plantas, células vegetales, tejidos y semillas. En particular, se proveen procedimientos para matar o controlar a una población de la plaga del gusano de la raíz del maíz. En particular, la presente invención proporciona un procedimiento para matar o controlar a una población de la plaga del gusano de la raíz del maíz que comprende poner en contacto dicha población con una cantidad plaguicidamente eficaz de un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, en el que

el polipéptido tiene actividad plaguicida contra la plaga del gusano de la raíz del maíz. La toxina coleóptera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:3, o variantes o fragmentos efectivos como plaguicidas de la misma que tienen al menos un 95 % de identidad de secuencia a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3. En algunas realizaciones, el procedimiento para proteger una planta o célula de la misma contra una población de una plaga del gusano de la raíz del maíz comprende expresar en una planta o célula de la misma un ácido nucleico que codifica la SEQ ID NO:3, o una variante o fragmento de la misma, en donde el ácido nucleico está operativamente ligado a un promotor capaz de dirigir la expresión del ácido nucleico en una célula vegetal.

La presente invención por lo tanto también proporciona un procedimiento para proteger una planta de maíz de una plaga del gusano de la raíz del maíz, que comprende expresar en una planta de maíz o en una célula de la misma una secuencia de nucleótidos unida operativamente a un promotor capaz de dirigir la expresión de la secuencia de nucleótidos en una célula vegetal, en el que dicha secuencia de nucleótidos se selecciona del grupo que consiste en:

- a) la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 1 o 2; y
- b) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:3,

en el que dicho polipéptido tiene una actividad plaguicida contra una plaga del gusano de la raíz del maíz.

La presente invención también proporciona un procedimiento para aumentar el rendimiento en una planta de maíz que comprende el cultivo en un campo una planta de maíz o semilla de la misma que ha incorporado de forma estable en su genoma un constructo de ADN que comprende una secuencia de nucleótido operativamente ligado a un promotor capaz de dirigir la expresión de la secuencia de nucleótido en una célula vegetal, en donde dicha secuencia de nucleótido se selecciona del grupo que consiste en:

- a) la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 1 o 2; y
- b) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:3, en el que dicho polipéptido tiene una actividad plaguicida contra una plaga del gusano de la raíz del maíz;

en el que dicho campo está infestado con una plaga del gusano de la raíz del maíz.

Las composiciones y los procedimientos descritos son de utilidad para la producción de organismos con una mayor resistencia o tolerancia a plagas. Estos organismos, y las composiciones que comprenden los organismos son deseables para su uso en la agricultura.

### **Breve descripción de la figura**

La Figura 1 demuestra la eficacia de Axmi184 en la reducción del daño a las raíces por el gusano de la raíz del maíz occidental.

### **Descripción detallada**

Se describen procedimientos para regular la resistencia o tolerancia a plagas en organismos, particularmente en plantas o células vegetales. El término "resistencia" significa que la plaga (por ejemplo, insectos) muere con la ingesta u otro contacto con los polipéptidos descritos. El término "tolerancia" se refiere al deterioro o la reducción en el movimiento, la alimentación, reproducción u otras funciones de la plaga. Los procedimientos comprenden transformar organismos con una secuencia de nucleótidos que codifican una proteína plaguicida de la invención. En particular, las secuencias de nucleótidos de la invención son de utilidad para preparar plantas y microorganismos que poseen actividad plaguicida. Los procedimientos descritos en la presente son útiles para controlar o matar poblaciones de plagas del gusano de la raíz del maíz y para producir composiciones con actividad plaguicida contra plagas del gusano de la raíz del maíz.

"Toxina plaguicida" o "proteína plaguicida" significa una toxina que tiene actividad tóxica contra una o más plagas del gusano de la raíz del maíz, incluidas, a modo no taxativo, las plagas del gusano de la raíz del maíz occidental (por ejemplo, *Diabrotica virgifera virgifera*), el gusano de la raíz del maíz del norte (por ejemplo, *Diabrotica barberi*) y el gusano de la raíz del maíz del sur (por ejemplo, *Diabrotica undecimpunctata howardi*) o una proteína que tiene homología con dicha proteína. Las proteínas plaguicidas incluyen las secuencias de aminoácidos deducidas a partir de las secuencias de nucleótidos completas descritas en la presente, y secuencias de aminoácidos que son más cortas que las secuencias completas, ya sea debido al uso de un sitio de inicio alternativo corriente abajo, o debido a un procesamiento que da como resultado una proteína más corta con actividad plaguicida. El procesamiento puede tener lugar en el organismo en el que se expresa la proteína, o en la plaga, una vez ingerida la proteína.

En realizaciones específicas, la proteína plaguicida comprende una proteína Axmi184 que se indica en la SEQ ID NO:3, así como variantes y fragmentos de la misma que tienen al menos un 95 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 y actividad plaguicida contra una plaga del gusano de la raíz del maíz.

Moléculas de ácidos nucleicos aisladas, y variantes y fragmentos de las mismas

Se desvelan moléculas de ácidos nucleicos aisladas o recombinantes que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican proteínas y polipéptidos de plaguicidas, o porciones biológicamente activas de las mismas, así como moléculas de ácidos nucleicos que son suficientes para su uso como sondas de hibridación para identificar moléculas de ácidos nucleicos que codifican proteínas con regiones de homología de secuencia. También se desvelan en el presente documento secuencias de nucleótidos capaces de hibridarse con las secuencias de nucleótidos de la invención bajo condiciones rigurosas definidas en otra parte en la presente. Tal como se utiliza en la presente, la expresión “molécula de ácido nucleico” incluye moléculas de ADN (por ejemplo, ADN recombinante, ADNc o ADN genómico) y moléculas de ARN (por ejemplo, ARNm), y análogos del ADN o ARN generados usando nucleótidos análogos. La molécula de ácido nucleico puede ser de cadena simple o de cadena doble, pero preferiblemente es ADN de cadena doble.

La secuencia de nucleótidos empleada en los procedimientos de la invención es una seleccionada del grupo que consiste en:

- a) la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 1 o 2; y
- b) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:3,

en el que dicho polipéptido tiene una actividad plaguicida contra una plaga del gusano de la raíz del maíz.

Una secuencia de ácido nucleico “aislada” o “recombinante” (o ADN) se usa en la presente para hacer referencia a una secuencia de ácido nucleico (o ADN) que ya no se encuentra en su entorno natural, por ejemplo *in vitro* o en una bacteria recombinante o en una célula huésped vegetal. En algunos casos, un ácido nucleico aislado o recombinante está libre de las secuencias (preferiblemente, las secuencias que codifican proteínas) que lo rodean en su ambiente natural (es decir, las secuencias localizadas en los extremos 5' y 3' del ácido nucleico) en el ADN genómico del organismo del que deriva el ácido nucleico. A los efectos de la invención, el término “aislado”, con referencia a moléculas de ácidos nucleicos, excluye cromosomas aislados. Por ejemplo, en varios casos, la molécula de ácido nucleico aislada de resistencia a glifosato puede contener menos que aproximadamente 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2 kb, 1 kb, 0.5 kb o 0.1 kb de secuencias de nucleótidos que rodean naturalmente a la molécula de ácido nucleico en el ADN genómico de la célula de la que deriva el ácido nucleico. En varios casos, una proteína delta-endotoxina que está sustancialmente libre de material celular incluye preparaciones de proteínas que tienen menos que aproximadamente 30%, 20%, 10% o 5% (respecto del peso seco) de proteínas distintas de la delta-endotoxina (también conocidas en la presente como “proteínas contaminantes”).

Las secuencias de nucleótidos que codifican las proteínas incluyen la secuencia detallada en las SEQ ID NO: 1-2, y variantes, fragmentos y complementos de la misma. Un “complemento” significa una secuencia de nucleótidos que es suficientemente complementaria de una secuencia de nucleótidos dada, de modo que se hibrida con esta secuencia de nucleótidos para formar una dupla estable. Las correspondientes secuencias de aminoácidos de la proteína plaguicida codificada por esta secuencia de nucleótidos se detallan en la SEQ ID NO:3 y polipéptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:3 y que tienen una actividad plaguicida contra una plaga del gusano de la raíz del maíz.

Las moléculas de ácido nucleico que son fragmentos de estas secuencias de nucleótidos que codifican proteínas plaguicidas también se desvelan. Un “fragmento” se refiere a una porción de la secuencia de nucleótidos que codifica una proteína plaguicida. Un fragmento de una secuencia de nucleótidos puede codificar una porción con actividad biológica de una proteína plaguicida, o puede ser un fragmento que se puede usar como sonda de hibridación o como un cebador de PCR, usando los procedimientos divulgados más adelante. Las moléculas de ácidos nucleicos que son fragmentos de una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína plaguicida comprenden por lo menos aproximadamente 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1350, 1400 nucleótidos contiguos, o hasta el número de nucleótidos presente en una secuencia de nucleótidos de longitud completa que codifica una proteína plaguicida divulgada en la presente, dependiendo del uso pretendido. Los nucleótidos “contiguos” son los residuos de nucleótidos inmediatamente adyacentes entre sí. Los fragmentos de las secuencias de nucleótidos codificarán fragmentos de proteínas que retendrán la actividad biológica de la proteína plaguicida, por lo que retendrán la actividad plaguicida. Los fragmentos de secuencias de nucleótidos que pueden emplearse en la invención son unos que comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:3, en los que dicho polipéptido tiene una actividad plaguicida contra una plaga del gusano de la raíz del maíz.

Por consiguiente, los fragmentos biológicamente activos de los polipéptidos divulgados aquí también están desvelados puede emplearse cualquiera con la condición de que comprendan una secuencia de aminoácidos que tenga al menos el 95 % de identidad de secuencia con aquella de SEQ ID NO: 3 y tengan actividad plaguicida contra una plaga del gusano de la raíz del maíz.

La expresión “retendrá la actividad” significa que el fragmento tendrá por lo menos aproximadamente 30%, por lo

menos aproximadamente 50%, por lo menos aproximadamente 70%, 80%, 90%, 95% o más de la actividad plaguicida de la proteína plaguicida. La actividad plaguicida es una actividad contra una plaga del gusano de la raíz del maíz. Los procedimientos para medir la actividad plaguicida son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Czaplá y Lang (1990) *J. Econ. Entomol.*, 83: 2480-2485; Andrews et al., (1988) *Biochem. J.*, 252: 199-206; Marrone et al., (1985) *J. of Economic Entomology*, 78: 290-293; y la Patente de los EE.UU. N°: 5,743,477.

Un fragmento de una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína plaguicida que codifica una porción biológicamente activa de una proteína desvelada codificará por lo menos aproximadamente 15, 25, 30, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 400, 450 aminoácidos contiguos, o hasta la cantidad total de aminoácidos presentes en una proteína plaguicida de longitud completa de la invención. En algunas realizaciones, el fragmento es un fragmento de clivaje proteolítico. Por ejemplo, el fragmento de clivaje proteolítico puede tener un truncamiento N-terminal o C-terminal de por lo menos aproximadamente 100 aminoácidos, aproximadamente 120, aproximadamente 130, aproximadamente 140, aproximadamente 150 o aproximadamente 160 aminoácidos con relación a las SEQ ID NO:3. En algunas realizaciones, los fragmentos abarcados en la presente son el resultado de la eliminación del dominio de cristalización C-terminal, por ejemplo, por proteólisis o por inserción de un codón de terminación en la secuencia de codificación. Un fragmento empleado en los procedimientos de la invención es uno que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, en el que el polipéptido tiene actividad plaguicida contra una plaga del gusano de la raíz del maíz.

Las proteínas plaguicidas preferidas son codificadas por una secuencia de nucleótidos suficientemente idéntica a la secuencia de nucleótidos de las SEQ ID NO: 1-2, o las proteínas plaguicidas son suficientemente idénticas a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:3. La expresión "suficientemente idénticas" se refiere a una secuencia de aminoácidos o de nucleótidos que tiene por lo menos un 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad de secuencia en comparación con una secuencia de referencia usando uno de los programas de alineación usando uno de los programas que se describen en la presente con los parámetros estándar. Un experto en la técnica comprenderá que es posible ajustar apropiadamente estos valores para determinar la identidad correspondiente de las proteínas codificadas por dos secuencias de nucleótidos teniendo en cuenta la degeneración de los codones, la similitud de los aminoácidos, la localización del marco de lectura y semejantes.

Para determinar el porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos o de dos ácidos nucleicos, se alinean las secuencias con el fin de realizar una comparación óptima. El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función de la cantidad de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, identidad porcentual = cantidad de posiciones idénticas/cantidad total de posiciones (por ejemplo, posiciones superpuestas) x 100). En una realización, las dos secuencias tienen la misma longitud. En otra realización, el porcentaje de identidad se calcula para la totalidad de la secuencia de referencia (es decir, la secuencia divulgada en la presente como cualquiera de las SEQ ID NO:1-3). Es posible determinar el porcentaje de identidad entre las dos secuencias usando procedimientos similares a aquellos que se describirán más adelante, permitiendo o no las faltas de coincidencia. Típicamente se cuentan las coincidencias exactas para calcular el porcentaje de identidad. Una falta de coincidencia o hueco, es decir, una posición en la alineación en la que hay un residuo en una secuencia, pero no en la otra, se considera como una posición con residuos no idénticos.

La determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias se puede realizar usando un algoritmo matemático. Un ejemplo no taxativo de un algoritmo matemático utilizado para comparar dos secuencias es el algoritmo de Karlin y Altschul (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 2264, modificado como se indica en Karlin y Altschul (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: Este algoritmo está incorporado en los programas BLASTN y BLASTX de Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403. Se pueden realizar búsquedas de nucleótidos por BLAST con el programa BLASTN, calificación = 100, longitud de palabra = 12, para obtener secuencias de nucleótidos homólogas a las moléculas de ácidos nucleicos plaguicidas de la invención. Se pueden realizar búsquedas de proteínas por BLAST con el programa BLASTX, calificación = 50, longitud de palabra = 3, para obtener secuencias de aminoácidos homólogas de las moléculas de proteínas plaguicidas de la invención. Para obtener alineaciones con faltas de coincidencia para fines comparativos, se puede utilizar Gapped BLAST (en BLAST 2.0) como se describe en Altschul et al., (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389. Como alternativa, se puede utilizar PSI-BLAST para realizar una búsqueda repetida que permita detectar interrelaciones distantes entre moléculas. Véase, Altschul et al., (1997) *supra*. Cuando se emplea BLAST, Gapped BLAST, PSI-BLAST, se pueden usar los parámetros predeterminados de los programas respectivos (por ejemplo, BLASTN para secuencias de nucleótidos, BLASTX para proteínas). Las alineaciones también se pueden realizar en forma manual por inspección.

Otro ejemplo no taxativo de un algoritmo matemático utilizado para comparar secuencias es el algoritmo ClustalW (Higgins et al., (1994) *Nucleic Acids Res.* 22:4673-4680). ClustalW compara secuencias y alinea por completo la secuencia de aminoácidos o ADN completa, por lo que puede proporcionar datos sobre la conservación de secuencia de la secuencia de aminoácidos completa. El algoritmo ClustalW se usa en diversos conjuntos de programas para computadora para el análisis de ADN/aminoácidos disponibles comercialmente, tales como el módulo ALIGNX del conjunto de programas Vector NTI (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA). Después de alinear las secuencias de aminoácidos con ClustalW, se puede evaluar el porcentaje de identidad entre los aminoácidos. Un ejemplo no taxativo de un programa de computación útil para analizar alineaciones de ClustalW es GENEDOC™. GENEDOC™ (Karl Nicholas) permite evaluar la similitud y la identidad de aminoácidos (o ADN) entre múltiples

5 proteínas. Otro ejemplo no taxativo de un algoritmo matemático utilizado para comparar secuencias es el algoritmo de Myers y Miller (1988) *CABIOS* 4: Este algoritmo está incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0), que forma parte del conjunto de software de análisis de secuencias GCG de Wisconsin Genetics [GCG Wisconsin Genetics Software Package], versión 10 (disponible de Accelrys, Inc., 9865 Scranton Rd., San Diego, CA, EE.UU.). Cuando se utiliza el programa ALIGN para comparar secuencias de aminoácidos, se puede usar una tabla de ponderación de residuos PAM120, una penalidad de longitud de falta de coincidencia de 12 y una penalidad de falta de coincidencia de 4.

10 A menos que se indique lo contrario, se usará GAP Versión 10, que usa el algoritmo de Needleman y Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.*, 48(3): 443-453, para determinar la identidad o la similitud de secuencia, con los siguientes parámetros: % de identidad y % de similitud para una secuencia de nucleótidos usando una ponderación de falta de coincidencia de 50 y una ponderación de longitud de 3, y la matriz de calificación nws gapdna.cmp; % de identidad o % de similitud para secuencias de aminoácidos usando una ponderación de falta de coincidencia de 8 y una ponderación de longitud de 2, y la matriz de puntuación BLOSUM62. También se pueden usar programas equivalentes. La expresión “programa equivalente” se refiere a cualquier programa para comparación de secuencias que, para cualesquiera dos secuencias en cuestión, genera una alineación con coincidencias de nucleótidos idénticos y una identidad porcentual de secuencia idéntica cuando se compara con la correspondiente alineación generada con GAP Versión 10.

20 La invención también abarca variantes de moléculas de ácidos nucleicos. Las “variantes” de las secuencias de nucleótidos que codifican proteínas plaguicidas incluyen aquellas secuencias que codifican las proteínas plaguicidas descritas en la presente, pero que difieren de manera conservadora debido a la degeneración del código genético, así como aquellas que son suficientemente idénticas, como se describió previamente. Se pueden identificar variantes alélicas naturales mediante el uso de procedimientos conocidos de biología molecular, tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y las técnicas de hibridación que se detallan más adelante. Las variantes de las secuencias de nucleótidos también incluyen las secuencias de nucleótidos derivadas mediante síntesis, tales como aquellas generadas, por ejemplo, usando mutagénesis dirigida a sitios específicos, pero que aún codifican las proteínas plaguicidas que se describen en la presente invención, como se describirá más adelante. Las variantes de las proteínas abarcadas por la presente invención tienen actividad biológica, es decir, actividad plaguicida. La expresión “retiene la actividad” indica que la variante tendrá por lo menos aproximadamente 30%, por lo menos aproximadamente 50%, por lo menos aproximadamente 70% o por lo menos aproximadamente 80% de la actividad plaguicida de la proteína nativa. Los procedimientos para medir la actividad plaguicida son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Czaplá y Lang (1990) *J. Econ. Entomol.*, 83: 2480-2485; Andrews et al., (1988) *Biochem. J.*, 252: 199-206; Marrone et al., (1985) *J. of Economic Entomology*, 78: 290-293; y la Patente de los EE.UU. N°: 5,743,477.

35 Además, los expertos en la técnica apreciarán que se pueden introducir cambios por mutación en las secuencias de nucleótidos de la invención, lo que conduce a cambios en las secuencias de aminoácidos de las proteínas plaguicidas codificadas, sin que se altere la actividad biológica de las proteínas. Por consiguiente, se pueden crear variantes de las moléculas de ácidos nucleicos aisladas introduciendo una o más sustituciones, adiciones o supresiones de nucleótidos en la secuencia de nucleótidos correspondiente descrita en la presente, con el fin de introducir una o más sustituciones, adiciones o supresiones de nucleótidos en la proteína codificada. Las mutaciones se pueden introducir empleando técnicas convencionales, tales como mutagénesis dirigida a sitios específicos y mutagénesis mediada por PCR. Estas variantes de las secuencias de nucleótidos también están incluidas en la presente invención.

45 Por ejemplo, se pueden realizar sustituciones de aminoácidos conservadoras en uno o más residuos de aminoácidos no esenciales predichos. Un residuo de aminoácido “no esencial” es un residuo que se puede alterar respecto de la secuencia de tipo salvaje de una proteína plaguicida, sin alterar la actividad biológica, mientras que un residuo de aminoácido “esencial” es necesario para la actividad biológica. Una “sustitución de aminoácidos conservadora” es una en la que se reemplaza un residuo de aminoácido por un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Se han definido en la técnica familias de residuos de aminoácidos con cadenas laterales similares. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptofano), cadenas laterales con ramificaciones beta (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptofano, histidina).

55 Las sustituciones de aminoácidos se pueden realizar en regiones no conservadas que retienen esta función relacionada. En general, estas sustituciones no se realizarán en residuos de aminoácidos conservados, o en residuos de aminoácidos que residan en un motivo conservado, donde estos residuos podrían ser esenciales para la actividad de la proteína. Los ejemplos de residuos que están conservados y que pueden ser esenciales para la actividad de las proteínas incluyen, por ejemplo, residuos que son idénticos entre todas las proteínas contenidas en una alineación de toxinas similares o relacionadas con las secuencias de la invención (por ejemplo, los residuos que son idénticos en una alineación de proteínas homólogas). Los ejemplos de residuos que están conservados pero que pueden permitir sustituciones de aminoácidos conservadoras y aún retener la actividad incluyen, por ejemplo,

los residuos que solamente tienen sustituciones conservadoras entre todas las proteínas contenidas en una alineación de toxinas similares o relacionadas con las secuencias de la invención (por ejemplo, los residuos que solamente tienen sustituciones conservadoras entre todas las proteínas contenidas en la alineación de proteínas homólogas). Sin embargo, un experto en la técnica podrá comprender que las variantes funcionales pueden tener alteraciones conservadas menores o no conservadas en los residuos conservados.

Como alternativa, se pueden preparar variantes de las secuencias de nucleótidos introduciendo mutaciones al azar, en la totalidad o en una parte de la secuencia codificante, tal como por mutagénesis de saturación, y se puede analizar la capacidad de conferir actividad plaguicida en los mutantes resultantes para identificar los mutantes que retienen la actividad. Después de la mutagénesis, la proteína codificada se puede expresar por medios recombinantes y se puede determinar la actividad de la proteína usando técnicas de ensayo estándar.

Usando procedimientos tales como PCR, hibridación y semejantes se podrán identificar secuencias de plaguicidas correspondientes, donde estas secuencias tendrán una identidad sustancial con las secuencias de la invención. Véase, por ejemplo, Sambrook y Russell (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY) e Innis, et al., (1990) *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (Academic Press, NY).

En un procedimiento de hibridación, se puede usar la totalidad o parte de la secuencia de nucleótidos plaguicidas para analizar bibliotecas de ADNc o genómicas. Los procedimientos para construir estas bibliotecas de ADNc o genómicas generalmente se conocen en la técnica, y se describen en Sambrook y Russell, 2001, *supra*. Las sondas de hibridación pueden ser fragmentos de ADN genómico, fragmentos de ADNc, fragmentos de ARN u otros oligonucleótidos, y pueden estar marcadas con un grupo detectable, tal como  $^{32}\text{P}$ , o con cualquier otro marcador de detección, tal como otros radioisótopos, un compuesto fluorescente, una enzima o un cofactor enzimático. Se pueden preparar sondas de hibridación marcando oligonucleótidos sintéticos basados en las secuencias de nucleótidos que codifican proteínas plaguicidas conocidas divulgadas en la presente. Además, se pueden usar cebadores degenerados, diseñados sobre la base de nucleótidos o residuos de aminoácidos conservados en la secuencia de nucleótidos o la secuencia de aminoácidos codificada. La sonda comprende típicamente una región de la secuencia de nucleótidos que se hibrida bajo condiciones rigurosas con por lo menos aproximadamente 12, por lo menos aproximadamente 25, por lo menos aproximadamente 50, 75, 100, 125, 150, 175 o 200 nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos que codifica una proteína plaguicida desvelada en el presente documento o un fragmento o variante de la misma. Los procedimientos para preparar sondas para la hibridación son conocidos en general en la técnica, y se describen en Sambrook y Russell, 2001, *supra*.

Por ejemplo, es posible usar una secuencia plaguicida descrita en la presente ya sea completa o una o más porciones de la misma, como una sonda capaz de hibridarse específicamente con las secuencias similares a proteína plaguicida y los ARN mensajeros correspondientes. Para obtener una hibridación específica bajo una variedad de condiciones, estas sondas incluyen secuencias que son únicas y tienen por lo menos entre aproximadamente 10 nucleótidos de longitud y por lo menos aproximadamente 20 nucleótidos de longitud. Estas sondas se pueden usar para amplificar las secuencias de plaguicidas correspondientes a partir de un organismo seleccionado por PCR. Se puede usar esta técnica para aislar secuencias codificantes adicionales a partir de un organismo deseado, o como un ensayo diagnóstico para determinar la presencia de secuencias codificantes en un organismo. Las técnicas de hibridación incluyen examen por hibridación de bibliotecas de ADN colocadas en placas (ya sea como placas o como colonias, véase por ejemplo, Sambrook *et al.*, (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York).

Por lo tanto, también se desvelan sondas para hibridación, así como secuencias de nucleótidos capaces de hibridarse con toda o una porción de una secuencia de nucleótidos desvelada en el presente documento (por ejemplo, por lo menos aproximadamente 300 nucleótidos, por lo menos aproximadamente 400, por lo menos aproximadamente 500, 1000, 1200, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500 o hasta la secuencia de nucleótidos de longitud completa divulgada en la presente). La hibridación de dichas secuencias se puede llevar a cabo bajo condiciones rigurosas. Las "condiciones rigurosas" o "condiciones de hibridación rigurosas" comprenden condiciones bajo las cuales una sonda se hibrida con su secuencia blanco, con un grado detectablemente mayor que con otras secuencias (por ejemplo, por lo menos 2 veces respecto del fondo). Las condiciones rigurosas dependen de la secuencia y difieren bajo distintas circunstancias. El control de la rigurosidad de la hibridación y/o de las condiciones de lavado, permite identificar secuencias blanco que son 100% complementarias con la sonda (análisis de homólogos). Como alternativa, es posible ajustar las condiciones de rigurosidad para permitir un cierto grado de falta de coincidencia entre las secuencias, con el fin de detectar grados de similitud menores (análisis de heterólogos). En general, una sonda tiene menos que aproximadamente 1000 nucleótidos de longitud, preferiblemente menos que 500 nucleótidos de longitud.

Típicamente, las condiciones rigurosas son aquellas en las que la concentración de sales es menor que aproximadamente 1.5 M de iones de Na, típicamente una concentración de entre aproximadamente 0.01 y 1.0 M de iones de Na (o de otras sales), a un pH de entre 7.0 y 8.3, donde la temperatura es de por lo menos aproximadamente 30°C para sondas cortas (por ejemplo, de entre 10 y 50 nucleótidos) y por lo menos aproximadamente 60°C para sondas largas (por ejemplo, de más de 50 nucleótidos). También se pueden obtener condiciones rigurosas agregando agentes desestabilizadores, tal como formamida. Los ejemplos de condiciones de

rigurosidad baja incluyen una hibridación con una solución amortiguadora de 30% a 35% de formamida, NaCl 1 M, 1% de SDS (dodecilsulfato de sodio) a 37°C, y un lavado en SSC 1X a 2X (SSC 20X = NaCl 3.0 M/citrato trisódico 0.3 M) a una temperatura de entre 50°C y 55°C. Los ejemplos de condiciones de rigurosidad moderada incluyen una hibridación en 40 a 45% de formamida, NaCl 1.0 M, 1% de SDS a 37°C, y un lavado en SSC 0.5X a 1X a una temperatura de entre 55°C y 60°C. Los ejemplos de condiciones de rigurosidad elevada incluyen una hibridación en 50% de formamida, NaCl 1 M, 1% de SDS a 37°C, y un lavado en SSC 0.1X a una temperatura de entre 60°C y 65°C. En general, la duración de la hibridación es menor que aproximadamente 24 horas, comúnmente entre aproximadamente 4 y aproximadamente 12 horas.

La especificidad es típicamente una función de los lavados de posthibridación, donde los factores críticos son la fuerza iónica y la temperatura de la solución de lavado final. Para los híbridos de ADN-ADN, se puede estimar el valor de  $T_m$  a partir de la ecuación de Meinkoth y Wahl (1984) *Anal. Biochem.* 138:  $T_m = 81.5^\circ\text{C} + 16.6 (\log M) + 0.41 (\% \text{ de GC}) - 0.61 (\% \text{ de form.}) - 500/l$ ; donde M es la molaridad de cationes monovalentes, % de GC es el porcentaje de nucleótidos de guanosina y citosina en el ADN, % de form. es el porcentaje de formamida en la solución de hibridación y L es la longitud del híbrido en pares de bases.  $T_m$  es la temperatura (a una fuerza iónica y un pH específicos) a la que el 50% de una secuencia blanco complementaria se hibrida con una sonda que coincide perfectamente. El valor de  $T_m$  se reduce en aproximadamente 1°C por cada 1% de falta de coincidencia; por consiguiente, se pueden ajustar el valor de  $T_m$ , las condiciones de hibridación y/o de lavado para efectuar una hibridación con secuencias con una identidad deseada. Por ejemplo, si se buscan secuencias con  $\geq 90\%$  de identidad, se puede reducir el valor  $T_m$  en 10°C. Generalmente se seleccionan condiciones rigurosas con temperaturas aproximadamente 5°C menores que el punto de fusión térmico ( $T_m$ ) para la secuencia específica y su complemento, a una fuerza iónica y un pH específicos. Sin embargo, las condiciones muy rigurosas pueden emplear una hibridación y/o un lavado a 1, 2, 3 o 4°C menos que el punto de fusión térmica ( $T_m$ ); las condiciones moderadamente rigurosas pueden utilizar una hibridación y/o un lavado a 6, 7, 8, 9 o 10°C menos que el punto de fusión térmica ( $T_m$ ); las condiciones de baja rigurosidad pueden emplear una hibridación y/o un lavado a 11, 12, 13, 14, 15 o 20 °C menos que el punto de fusión térmica ( $T_m$ ). Los especialistas en la técnica comprenderán que se pueden efectuar variaciones en la rigurosidad de las soluciones de hibridación y/o de lavado usando la ecuación, las condiciones de hibridación y de lavado deseadas, y el  $T_m$  deseado. Si el grado de falta de coincidencia deseado da como resultado un valor de  $T_m$  menor que 45 °C (solución acuosa) o 32 °C (solución de formamida), se prefiere incrementar la concentración de SSC para que se pueda emplear una temperatura más alta. Se puede consultar una extensa guía para la hibridación de ácidos nucleicos en Tijssen (1993) *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology - Hybridization with Nucleic Acid Probes*, Parte 1, capítulo 2 (Elsevier, Nueva York); y Ausubel et al., editores (1995) *Current Protocols in Molecular Biology*, capítulo 2 (Greene Publishing y Wiley-Interscience, Nueva York). Véase Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York).

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

También se desvelan proteínas plaguicidas. Una "proteína plaguicida" se refiere a una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos detallada en las SEQ ID N°: 3. También se proveen fragmentos, porciones biológicamente activas y variantes de los mismos y se pueden usar en la práctica de los procedimientos de la presente invención con la condición de que comprendan una secuencia de aminoácidos que tenga al menos un 95 % de identidad de secuencia a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, en el que el polipéptido tiene una actividad plaguicida contra una plaga del gusano de la raíz del maíz. Una "proteína aislada" o una "proteína recombinante" se usa para hacer referencia a una proteína que ya no se encuentra en su entorno natural, por ejemplo *in vitro* o en una bacteria recombinante o célula huésped vegetal.

Los "fragmentos" o "porciones biológicamente activas" incluyen fragmentos de polipéptidos que comprenden secuencias de aminoácidos suficientemente idénticas a la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 3 y que exhiben actividad plaguicida contra una plaga del gusano de la raíz del maíz. Una porción biológicamente activa de una proteína plaguicida puede ser un polipéptido de, por ejemplo, 10, 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1050, 1100, 1150, 1200, 1250, 1300, 1350 o más aminoácidos de longitud. Estas porciones con actividad biológica se pueden preparar de acuerdo a técnicas recombinantes, y luego se puede evaluar su actividad plaguicida. Los procedimientos para medir la actividad plaguicida son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Czaplá y Lang (1990) *J. Econ. Entomol.*, 83: 2480-2485; Andrews et al., (1988) *Biochem. J.*, 252: 199-206; Marrone et al., (1985) *J. of Economic Entomology*, 78: 290-293; y la Patente de los EE.UU. N°: 5,743,477. Según se usa en la presente, un fragmento comprende por lo menos 8 aminoácidos contiguos de la SEQ ID NO: 3. Sin embargo, se desvelan otros fragmentos, tal como cualquier fragmento en la proteína mayor que aproximadamente 10, 20, 30, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750 o más aminoácidos de longitud.

Las "variantes" son proteínas o polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos que es por lo menos aproximadamente 60%, 65%, aproximadamente 70%, 75%, aproximadamente 80%, 85%, aproximadamente 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idénticas a la secuencia de aminoácidos de cualquiera de la SEQ ID NO: 3. Las variantes también incluyen polipéptidos codificados por una molécula de ácido nucleico que se hibrida con la molécula de ácido nucleico de las SEQ ID NO:1-2, o un complemento de la misma, bajo condiciones rigurosas. Las variantes incluyen polipéptidos cuyas secuencias de aminoácidos difieren debido a mutagénesis. Las



variantes de las proteínas empleadas por la presente invención tienen actividad biológica, es decir, aún presentan la actividad plaguicida. En particular, tienen al menos un 95 % de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 3 y actividad plaguicida contra una plaga del gusano de la raíz del maíz. En algunas realizaciones, las variantes presentan una mayor actividad con relación a la proteína nativa. Los procedimientos para medir la actividad plaguicida son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Czaplá y Lang (1990) *J. Econ. Entomol.*, 83: 2480-2485; Andrews et al., (1988) *Biochem. J.*, 252: 199-206; Marrone et al., (1985) *J. of Economic Entomology*, 78: 290-293; y la Patente de los EE.UU. N°: 5,743,477.

Los genes bacterianos, tales como el gen *axmi* desvelado en el presente documento, comúnmente poseen múltiples codones de inicio de metionina cerca del comienzo del marco abierto de lectura. Comúnmente, el inicio de la traducción en uno o más de estos codones iniciales conducirá a la generación de una proteína funcional. Estos codones iniciales pueden incluir codones ATG. Sin embargo, bacterias tales como *Bacillus sp.* también reconocen el codón GTG como codón inicial, y las proteínas que inician la traducción en los codones GTG contienen una metionina en el primer aminoácido. En raras ocasiones, la traducción en sistemas bacterianos puede comenzar en un codón TTG, aunque en este evento el TTG codifica una metionina. Además, comúnmente no se determina *a priori* cuál de estos codones son usados por la bacteria en su ambiente natural. Por lo tanto, se comprenderá que el uso de uno de los codones de metionina alternativos también puede conducir a la generación de proteínas plaguicidas. Estas proteínas plaguicidas se desvelan y se pueden usar en los procedimientos de la presente invención. Se comprenderá que, cuando se expresa en plantas, será necesario alterar el codón de inicio alternativo por un ATG para una traducción adecuada.

En diversos casos, las proteínas plaguicidas incluyen secuencias de aminoácidos deducidas a partir de las secuencias de nucleótidos de longitud completa divulgadas en la presente, y las secuencias de aminoácidos que son más cortas que las secuencias de longitud completa debido al uso de un sitio de inicio corriente abajo alternativo. Por lo tanto, la secuencia de nucleótidos y/o los vectores, las células huésped y las plantas que comprenden la secuencia de nucleótidos (y los procedimientos para elaborar y usar la secuencia de nucleótidos) pueden comprender una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos correspondiente a los residuos 3-790 de la SEQ ID NO: 3, los residuos 36-790 de la SEQ ID NO: 3 o los residuos 38-790 de la SEQ ID NO: 3.

Los anticuerpos contra los polipéptidos desvelados, o contra variantes o fragmentos de los mismos, también se desvelan. Los procedimientos para producir anticuerpos son bien conocidos en la técnica (véanse, por ejemplo, Harlow y Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY); Patente de los EE.UU. N° 4,196,265).

Por consiguiente, también se desvelan anticuerpos, moléculas de unión a antígenos de cadena simple u otras proteínas que se unen específicamente a una o más de las moléculas de proteínas o péptidos desvelados y homólogos, fusiones o fragmentos de las mismas. En un caso particularmente preferido, el anticuerpo se une específicamente a una proteína que presenta la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO:3, o un fragmento de la misma. En otro caso, el anticuerpo se une específicamente a una proteína de fusión que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3 o un fragmento de la misma.

Los anticuerpos se pueden usar para detectar cuantitativamente o cualitativamente las moléculas de proteínas o péptidos de la invención o para detectar modificaciones de postraducción de las proteínas. Tal como se usa en la presente, se dice que un anticuerpo o péptido se "une específicamente" a una molécula de proteína o de péptidos si dicha unión no es inhibida competitivamente por la presencia de moléculas no relacionadas.

#### Variantes alteradas o mejoradas:

Se reconoce que las secuencias de ADN de una proteína pesticida se pueden alterar de acuerdo con diversos procedimientos, y que estas alteraciones pueden resultar en secuencias de ADN que codifican proteínas con secuencias de aminoácidos diferentes de aquellas codificadas por una proteína pesticida desvelada en el presente documento. Esta proteína puede ser alterada de diversas maneras, incluyendo sustituciones, supresiones, truncamientos e inserciones de aminoácidos de uno o más aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, inclusive hasta aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7, aproximadamente 8, aproximadamente 9, aproximadamente 10, aproximadamente 15, aproximadamente 20, aproximadamente 25, aproximadamente 30, aproximadamente 35, aproximadamente 40, aproximadamente 45, aproximadamente 50, aproximadamente 55, aproximadamente 60, aproximadamente 65, aproximadamente 70, aproximadamente 75, aproximadamente 80, aproximadamente 85, aproximadamente 90, aproximadamente 100, aproximadamente 105, aproximadamente 110, aproximadamente 115, aproximadamente 120, aproximadamente 125, aproximadamente 130, aproximadamente 135, aproximadamente 140, aproximadamente 145, aproximadamente 150, aproximadamente 155, o más sustituciones, supresiones o inserciones de aminoácidos. Los procedimientos para dichas manipulaciones son conocidos en general en la técnica. Por ejemplo, se pueden preparar variantes de la secuencia de aminoácidos de una proteína plaguicida realizando mutaciones en el ADN. También es posible prepararlas utilizando una de las distintas formas de mutagénesis, y/o por evolución dirigida. En algunos aspectos, los cambios codificados en la

secuencia de aminoácidos no afectarán sustancialmente la función de la proteína. Estas variantes tendrán la actividad plaguicida deseada. Sin embargo, se comprenderá que la capacidad de una proteína plaguicida de conferir actividad plaguicida se puede mejorar usando técnicas similares en las composiciones de esta invención. Por ejemplo, es posible expresar una proteína plaguicida en células huésped que presentan índices elevados de incorporación de bases incorrectas durante la replicación del ADN, tales como XL1 Red (Stratagene, La Jolla, CA). Después de la propagación en dichas cepas, se puede aislar el ADN (por ejemplo por preparación de ADN de plásmidos o mediante amplificación por PCR y clonación del fragmento resultante de la PCR en un vector), cultivar las mutaciones de proteínas plaguicidas en una cepa no mutagénica e identificar los genes mutados con la actividad plaguicida, por ejemplo conduciendo un ensayo para evaluar la actividad plaguicida. En general, la proteína se mezcla y se usa en ensayos de alimentación. Véase, por ejemplo, Marrone *et al.*, (1985) *J. of Economic Entomology* 78: Estos ensayos pueden incluir el contacto de las plantas con una o más plagas, y la determinación de la capacidad de la planta para sobrevivir y/o para causar la muerte de las plagas. Se pueden consultar ejemplos de mutaciones que resultan en una toxicidad incrementada en Schnepf *et al.* (1998) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:775-806.

Como alternativa, se pueden efectuar alteraciones a la secuencia proteica de muchas proteínas en el extremo amino o carboxilo, sin afectar sustancialmente la actividad. Esto puede incluir inserciones, eliminaciones o alteraciones introducidas con procedimientos moleculares modernos, tales como PCR, incluyendo amplificaciones por PCR que alteran o extienden la secuencia codificante de la proteína en virtud de la inclusión de secuencias que codifican aminoácidos en los oligonucleótidos utilizados en la amplificación por PCR. Como alternativa, las secuencias proteicas agregadas pueden incluir secuencias codificantes de proteínas, tales como aquellas usadas comúnmente en la técnica para generar fusiones de proteínas. Estas proteínas de fusión se usan comúnmente para (1) incrementar la expresión de una proteína de interés; (2) introducir un dominio de unión, actividad enzimática o un epítipo para facilitar la purificación de la proteína, la detección de la proteína u otros usos experimentales conocidos en la técnica, (3) dirigir la secreción o la traducción de una proteína hacia un organelo subcelular, tal como el espacio periplásmico de bacterias Gram negativas, o el retículo endoplasmático de las células eucariotas, donde esto último comúnmente resulta en la glicosilación de la proteína.

Las variantes de las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la presente invención también incluyen secuencias derivadas de procedimientos de mutagénesis y recombinación, tales como el entremezclado de ADN. Con este procedimiento, se puede usar una o más regiones codificantes que codifican proteínas plaguicidas diferentes para crear una nueva proteína plaguicida que posee las propiedades deseadas. De este modo, se generan bibliotecas de polinucleótidos recombinantes a partir de una población de secuencias de polinucleótidos relacionadas, que comprenden regiones de secuencias que tienen una identidad de secuencia sustancial, y éstas se pueden recombinar en forma homóloga *in vitro* o *in vivo*. Por ejemplo, usando este abordaje, se pueden entremezclar motivos de secuencia que codifican un dominio de interés entre el gen plaguicida de la invención y otros genes plaguicidas conocidos, con el fin de obtener un nuevo gen que codifica una proteína con una propiedad mejorada de interés, tal como una mayor actividad insecticida. Las estrategias para dicho entremezclado de ADN son conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, Stemmer (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 10747-10751; Stemmer (1994) *Nature* 370: 389-391; Cramer *et al.* (1997) *Nature Biotech.*, 436-438; Moore *et al.* (1997) *J. Mol. Biol.*, 272: 336-347; Zhang *et al.* (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 4504-4509; Cramer *et al.*, (1998) *Nature* 391: 288-291; y las Patentes de los EE.UU. N°: 5,605,793 y 5,837,458.

El intercambio o el entremezclado de dominios constituye otro mecanismo para generar proteínas plaguicidas alteradas. Se pueden intercambiar dominios entre proteínas plaguicidas, lo que da como resultado toxinas híbridas o quiméricas con una mayor actividad plaguicida o espectro de blancos. Los procedimientos para generar proteínas recombinantes y evaluar su actividad plaguicida son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Naimov *et al.* (2001) *Appl. Environ. Microbiol.* 67:5328-5330; de Maagd *et al.* (1996) *Appl. Environ. Microbiol.* 62:1537-1543; Ge *et al.* (1991) *J. Biol. Chem.* 266:17954-17958; Schnepf *et al.* (1990) *J. Biol. Chem.* 265:20923-20930; Rang *et al.* 91999) *Appl. Environ. Microbiol.* 65:2918-2925).

#### Vectores

Se puede introducir una secuencia plaguicida de la invención en un cassette de expresión para su expresión en una planta de interés. Un "cassette de expresión vegetal" incluye construcciones de ADN que pueden dar como resultado la expresión de una proteína a partir de un marco abierto de lectura en una célula vegetal. Típicamente, dichas construcciones contienen un promotor y una secuencia codificante. Comúnmente, estas construcciones también incluyen una región 3' no traducida. Estas construcciones pueden contener una "secuencia señal" o una "secuencia directriz" para facilitar el transporte de cotraducción o de postraducción del péptido de interés a determinadas estructuras intracelulares, tales como el cloroplasto (u otro plástido), el retículo endoplasmático o el aparato de Golgi.

Una "secuencia señal" se refiere a una secuencia de la que se sabe que permite el transporte de cotraducción o de postraducción del péptido a través de la membrana celular. En eucariotas, esto típicamente comprende la secreción hacia el aparato de Golgi, lo cual en algunos casos incluye glicosilación. Las toxinas insecticidas de bacterias a menudo se sintetizan como protoxinas, que son activadas proteolíticamente en el intestino de la plaga de interés (Chang (1987) *Methods Enzymol.* 153:507-516). En algunas realizaciones de la presente invención, la secuencia

señal se ubica en la secuencia nativa o puede derivar de una secuencia de la invención. Una "secuencia directriz" se refiere a cualquier secuencia que, cuando se traduce, da como resultado una secuencia de aminoácidos suficiente como para desencadenar el transporte de cotraducción de la cadena peptídica hacia un organelo subcelular. Por consiguiente, esto incluye secuencias directrices para dirigir el transporte y/o la glicosilación mediante el pasaje por el retículo endoplasmático, las vacuolas, los plástidos, incluyendo los cloroplastos, las mitocondrias y semejantes.

Un "vector de transformación" se refiere a una molécula de ADN que es necesaria para efectuar la transformación eficiente de una célula. Esta molécula puede consistir en uno o más cassettes de expresión vegetales, y puede estar organizada en más de una molécula de ADN "vector". Por ejemplo, los vectores binarios son vectores de transformación vegetales que utilizan dos vectores de ADN no contiguos que codifican las funciones que actúan en cis y trans necesarias para transformar las células vegetales (Hellens and Mullineaux (2000) *Trends in Plant Science* 5:446-451). Un "vector" hace referencia a una construcción de ácidos nucleicos diseñada para efectuar una transferencia entre células huésped diferentes. Un "vector de expresión" hace referencia a un vector que tiene la capacidad para incorporar, integrar y expresar secuencias o fragmentos de ADN heterólogos en una célula extraña. El cassette incluirá secuencias reguladoras 5' y/o 3' ligadas operativamente a una secuencia de la invención. La expresión "ligados operativamente" indica una unión funcional entre un promotor y una segunda secuencia, donde la secuencia promotora inicia y media la transcripción de la secuencia de ADN que corresponde a la segunda secuencia. En general, la expresión "ligado operativamente" significa que las secuencias de ácidos nucleicos conectadas son contiguas y, cuando fuera necesario unir dos regiones codificantes de proteínas, son contiguas y están en el mismo marco de lectura. El cassette puede contener además por lo menos un gen adicional que es cotransformado dentro del organismo. Como alternativa, el o los genes adicionales se pueden introducir en múltiples cassettes de expresión.

En diversas realizaciones, la secuencia de nucleótidos de la invención está ligada operativamente a un promotor, por ejemplo, un promotor vegetal. Un "promotor" se refiere a una secuencia de ácido nucleico que dirige la transcripción de una secuencia codificante. El promotor, en combinación con otras secuencias de ácidos nucleicos reguladoras de la transcripción y la traducción (también denominadas "secuencias control"), es necesario para la expresión de una secuencia de ADN de interés.

Este cassette de expresión contiene una pluralidad de sitios de restricción para insertar la secuencia plaguicida bajo la regulación transcripcional de las regiones reguladoras.

El cassette incluirá, en la dirección de transcripción 5' a 3': una región de inicio de la transcripción y traducción (es decir, un promotor), una secuencia de ADN de la invención y una región de finalización de la traducción y la transcripción (es decir, una región de terminación) funcional en plantas. El promotor puede ser nativo o análogo, o extraño o heterólogo, respecto de la planta huésped y/o la secuencia de ADN de la invención. Adicionalmente, el promotor puede ser una secuencia natural, o como alternativa puede ser una secuencia sintética. Cuando el promotor es "nativo" u "homólogo" respecto de la planta huésped, se interpreta que el promotor se halla en la planta nativa en la que se introduce el promotor. Cuando el promotor es "extraño" o "heterólogo" respecto de la secuencia de ADN de la invención, se interpreta que el promotor no es un promotor nativo o natural de la secuencia de ADN ligada operativamente de la invención.

La región de terminación puede ser nativa respecto de la región de inicio de la transcripción, puede ser nativa respecto de la secuencia de ADN de interés ligada operativamente, puede ser nativa respecto de la planta huésped o puede derivar de otra fuente (es decir, puede ser extraña o heteróloga) respecto del promotor, la secuencia de ADN de interés, el huésped vegetal o cualquier combinación de los mismos. Las regiones de terminación adecuadas se pueden obtener del plásmido Ti de *A. tumefaciens*, tales como las regiones de terminación de la octopina sintetasa y de la nopalina sintetasa. Véase también Guerineau *et al.* (1991) *Mol. Gen. Genet.* 262:141-144; Proudfoot (1991) *Cell* 64:671-674; Sanfacon *et al.* (1991) *Genes Dev.* 5:141-149; Mogen *et al.* (1990) *Plant Cell* 2:1261-1272; Munroe *et al.* (1990) *Gene* 91:151-158; Ballas *et al.* (1989) *Nucleic Acids Res.* 17:7891-7903; and Joshi *et al.* (1987) *Nucleic Acid Res.* 15:9627-9639.

Cuando fuera apropiado, se podrán optimizar los genes para incrementar la expresión en la planta transformada. Es decir, se pueden sintetizar los genes usando codones preferidos por las células huésped para obtener una expresión mejorada, o se pueden sintetizar utilizando los codones que presentan una frecuencia de uso de codones preferida por el huésped. En general, se incrementará el contenido de GC del gen. Véase, por ejemplo, Campbell y Gowri (1990) *Plant Physiol.*, 92: 1-11, por una descripción del uso de codones preferidos por el huésped. En la técnica existen procedimientos disponibles para sintetizar genes con preferencia por plantas. Véase, por ejemplo, las Patentes de los EE.UU. N°: 5,380,831 y 5,436,391, la publicación de Patente de los EE.UU. N°: 20090137409 y Murray *et al.* (1989) *Nucleic Acids Res.*, 17:477-498, incorporadas en la presente a modo de referencia.

En una realización, la proteína plaguicida es dirigida hacia los cloroplastos para su expresión en los mismos. De este modo, cuando la proteína plaguicida no se inserte directamente en el cloroplasto, el cassette de expresión incluirá adicionalmente un ácido nucleico que codificará un péptido de tránsito para dirigir la proteína plaguicida hacia los cloroplastos. Dichos péptidos de tránsito se conocen en la técnica. Véase, por ejemplo, Von Heijne *et al.*, (1991) *Plant Mol. Biol. Rep.*, 9: 104-126; Clark *et al.*, (1989) *J. Biol. Chem.*, 264: 17544-17550; Della-Cioppa *et al.*, (1987) *Plant Physiol.*, 84: 965-968; Romer *et al.*, (1993) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 196: 1414-1421; y Shah *et al.*,

(1986) *Science* 233: 478-481.

Se podrá optimizar la expresión en el cloroplasto del gen plaguicida que se desee dirigir, teniendo en cuenta las diferencias en el uso de codones entre el núcleo de la planta y este organelo. De este modo, los ácidos nucleicos de interés se pueden sintetizar usando los codones preferidos por el cloroplasto. Véase, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. N°: 5380831, incorporada en la presente a modo de referencia.

#### Transformación de plantas

Los procedimientos de la invención comprenden la introducción de una construcción de nucleótidos en una planta. El término "introducción" se refiere a la presentación de la construcción de nucleótidos a la planta de manera tal que la secuencia accede al interior de una célula de la planta. Los procedimientos de la invención no dependen de un procedimiento particular para introducir una construcción de nucleótidos en una planta, sino solamente de que la construcción de nucleótidos acceda al interior de por lo menos una célula de la planta. En la técnica se conocen procedimientos para introducir construcciones de nucleótidos en plantas, incluyendo, pero en un sentido no taxativo, procedimientos de transformación estable, procedimientos de transformación transitoria y procedimientos mediados por virus.

Una "planta" designa plantas completas, órganos de plantas (por ejemplo, hojas, tallos, raíces, etcétera), semillas, células vegetales, embriones y su progenie. Las células vegetales pueden estar diferenciadas o no diferenciadas (por ejemplo callos, cultivos de células en suspensión, protoplastos, células foliares, células de raíces, células de floema, polen).

Las "plantas transgénicas", las "plantas transformadas" o las plantas, las células o los tejidos "transformados en forma estable" hacen referencia a plantas que tienen secuencias de ácidos nucleicos o fragmentos de ADN exógenos incorporados o integrados en sus células. Estas secuencias de ácidos nucleicos incluyen aquellas que son exógenas o no están presentes en la célula vegetal no transformada, y también aquellas que pueden ser endógenas o que están presentes en la célula vegetal no transformada. El término "heterólogo" hace referencia, en general, a las secuencias de ácidos nucleicos que no son endógenas de la célula o que no forman parte del genoma nativo en el que están presentes y que han sido introducidas en la célula por infección, transfección, microinyección, electroporación, microproyección o semejantes.

Las plantas transgénicas de la invención expresan una o más de las nuevas secuencias de toxinas divulgadas en la presente. En diversas realizaciones, la planta transgénica comprende además uno o más genes adicionales para la resistencia a insectos (por ejemplo, Cry1, tales como los miembros de las familias Cry1A, Cry1B, Cry1C, Cry1D, Cry1E y Cry1F; Cry2, tales como los miembros de la familia Cry2A; Cry9, tales como los miembros de las familias Cry9A, Cry9B, Cry9C, Cry9D, Cry9E y Cry9F; etc.). El experto en la técnica comprenderá que la planta transgénica puede comprender cualquier gen que confiera el rasgo agronómico de interés.

La transformación de las células vegetales se puede efectuar de acuerdo con uno de varios procedimientos conocidos en la técnica. El gen plaguicida de la invención se puede modificar para obtener o mejorar la expresión en células vegetales. Típicamente, una construcción que exprese esta proteína incluirá un promotor para dirigir la transcripción del gen, y también una región 3' no traducida para permitir la terminación de la transcripción y la poliadenilación. La organización de dichas construcciones se conoce bien en la técnica. En algunas instancias, puede ser útil diseñar el gen de modo que el péptido resultante sea secretado o dirigido de otro modo hacia el interior de la célula vegetal. Por ejemplo, el gen puede ser manipulado para contener un péptido señal, con el fin de facilitar la transferencia del péptido hacia el retículo endoplasmático. También puede ser preferible tratar mediante ingeniería al cassette de expresión vegetal para que incluya un intrón, de tal modo que el procesamiento de ese ARNm del intrón sea requerido para la expresión.

Típicamente, este "cassette de expresión vegetal" se insertará en un "vector de transformación vegetal". Este vector de transformación vegetal puede estar compuesto por uno o más vectores de ADN necesarios para efectuar la transformación de la planta. Por ejemplo, en la técnica es común utilizar vectores de transformación vegetales compuestos por más de un segmento de ADN contiguo. Estos vectores comúnmente se conocen en la técnica como "vectores binarios". Los vectores binarios, así como los vectores con plásmidos asistentes, se usan comúnmente para efectuar transformaciones mediadas por *Agrobacterium*, donde el tamaño y la complejidad de los segmentos de ADN necesarios para completar una transformación eficiente es considerable, y resulta ventajoso separar las funciones en moléculas de ADN separadas. Los vectores binarios típicamente contienen un plásmido vector que contiene las secuencias que actúan en cis necesarias para realizar la transferencia del ADN-T (tal como el borde izquierdo y el borde derecho), un marcador de selección diseñado de modo que posibilita la expresión en una célula vegetal y un "gen de interés" (un gen diseñado para posibilitar la expresión en una célula vegetal, a partir de la cual se desea regenerar plantas transgénicas). Este vector plasmídico también contiene las secuencias necesarias para la replicación de la bacteria. Las secuencias que actúan en cis están dispuestas de modo que permiten una transferencia y una expresión eficiente en las células vegetales. Por ejemplo, el gen marcador de selección y el gen plaguicida están localizados entre los bordes izquierdo y derecho. Comúnmente, un segundo plásmido contiene los factores que actúan en trans que intervienen en la transferencia de ADN-T desde *Agrobacterium* hacia las células vegetales. Este plásmido comúnmente contiene las funciones de virulencia (genes Vir), que permiten la infección de

las células vegetales por *Agrobacterium*, la transferencia del ADN por medio del corte de las secuencias borde y la transferencia del ADN mediada por *vir*, tal como se conoce en la técnica (Hellens y Mullineaux (2000) *Trends in Plant Science*, 5:446-451). Se pueden usar varios tipos de cepas de *Agrobacterium* (por ejemplo, LBA4404, GV3101, EHA101, EHA105, etcétera) para transformar plantas. El segundo plásmido vector no es necesario para transformar las plantas si se usan otros procedimientos, tales como microproyección, microinyección, electroporación, polietilenglicol, etc.

En general, los procedimientos de transformación de plantas comprenden la transferencia de ADN heterólogo hacia células vegetales blanco (por ejemplo, embriones inmaduros o maduros, cultivos en suspensión, callos no diferenciados, protoplastos, etcétera), seguida por la aplicación de un nivel umbral máximo del agente de selección apropiado (que depende del gen marcador de selección) para recuperar las células vegetales transformadas a partir de una masa de células no transformadas. Posteriormente, las células transformadas se diferencian en brotes después de colocarlas sobre el medio de regeneración, suplementado con un nivel umbral máximo del agente de selección. Luego se transfieren los brotes a un medio inductor de raíces selectivo para recuperar los brotes o las plántulas con raíces. Posteriormente se cultivan las plántulas transgénicas hasta obtener plantas maduras productoras de semillas fértiles (por ejemplo, Hiei *et al.*, (1994) *The Plant Journal* 6: 271-282; Ishida *et al.*, (1996) *Nature Biotechnology* 14:745-750). Los explantes típicamente se transfieren a un suministro fresco del mismo medio y se cultivan de forma convencional. Se puede consultar una descripción general de las técnicas y los procedimientos para generar plantas transgénicas en Ayres y Park (1994) *Critical Reviews in Plant Science* 13: 219-239 y Bommineni y Jauhar (1997) *Maydica* 42: Dado que el material transformado contiene muchas células, hay células transformadas y no transformadas presentes en cualquier trozo de callo, de tejido o de grupo de células obtenido. La capacidad de matar las células no transformadas y permitir que las células transformadas proliferen da como resultado cultivos de plantas transformadas. Comúnmente, la capacidad de eliminar las células no transformadas es una limitación para la recuperación rápida de las células vegetales transformadas y la generación exitosa de plantas transgénicas.

Los protocolos de transformación y también los protocolos para introducir secuencias de nucleótidos dentro de las plantas pueden variar dependiendo del tipo de planta o de la célula vegetal, por ejemplo, monocotiledónea o dicotiledónea, que constituya el blanco para la transformación. La generación de plantas transgénicas se puede efectuar de acuerdo con uno de varios procedimientos, incluyendo, pero en un sentido no taxativo, microinyección, electroporación, transferencia directa de genes, introducción de ADN heterólogo en células vegetales por *Agrobacterium* (transformación mediada por *Agrobacterium*), bombardeo de células vegetales con ADN heterólogo extraño adherido a partículas, aceleración balística de partículas, transformación por irradiación con aerosol (publicación de la Solicitud de Patente de los EE.UU. N°: 20010026941; Patente de los EE.UU. N°: 4945050; publicación de Patente Internacional N° WO 91/00915; publicación de la Solicitud de Patente de los EE.UU. N°: 2002015066), transformación con *Lec1* y otros procedimientos diversos para transferir ADN no mediados directamente por partículas.

Los procedimientos para transformar cloroplastos se conocen en la técnica. Véase, por ejemplo, Svab *et al.*, (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 8526-8530; Svab y Maliga (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 913-917; Svab y Maliga (1993) *EMBO J.* 12:601-606. El procedimiento se basa en la administración con pistola de partículas de ADN que contiene un marcador de selección, y el direccionamiento del ADN al genoma del plástido por recombinación homóloga. Adicionalmente, la transformación del plástido se puede efectuar por transactivación de un transgén silencioso perteneciente al plásmido, por expresión con preferencia por tejidos de una ARN polimerasa codificada por el núcleo y dirigida hacia el plástido. Dicho sistema se describe en McBride *et al.* (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:7301-7305.

Una vez que el ADN heterólogo extraño está integrado en las células vegetales, se aplica un nivel máximo umbral de la selección apropiada en el medio para matar las células no transformadas y separar y hacer proliferar las células transformadas positivamente que sobreviven a este tratamiento de selección, realizando una transferencia a intervalos regulares a un medio fresco. Los pasajes y desafíos continuos con la selección apropiada, permiten identificar y hacer proliferar las células que fueron transformadas con el plásmido vector. Se pueden usar procedimientos moleculares y bioquímicos para confirmar la presencia del gen heterólogo de interés integrado en el genoma de la planta transgénica.

Las células que han sido transformadas se pueden cultivar para obtener plantas de acuerdo con medios convencionales. Véase, por ejemplo, McCormick *et al.*, (1986) *Plant Cell Reports*, 5:81-84. Luego se pueden cultivar estas plantas y se pueden polinizar con la misma cepa transformada o con cepas diferentes y después se puede identificar la progenie resultante con la característica fenotípica deseada. Se pueden cultivar dos o más generaciones para asegurar que la expresión de la característica fenotípica se mantenga y se herede en forma estable, y luego se pueden cosechar las semillas para asegurar que se haya obtenido la expresión de la característica fenotípica deseada. De este modo, en la presente invención se provee una semilla transformada (también conocida como una "semilla transgénica") que contiene una construcción de nucleótidos de la invención, por ejemplo, un cassette de expresión de la invención, incorporada de manera estable en su genoma.

Evaluación de la transformación de las plantas

Una vez introducido el ADN heterólogo extraño en las células vegetales, se confirma la transformación o la integración del gen heterólogo en el genoma de la planta de acuerdo con diversos procedimientos, tales como el análisis de los ácidos nucleicos, las proteínas y los metabolitos asociados con el gen integrado.

5 El análisis de PCR es un procedimiento rápido para analizar las células, el tejido o los brotes transformados, en busca de la presencia del gen incorporado, en la etapa temprana anterior al trasplante en tierra (Sambrook y Russell (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY). La PCR se conduce usando cebadores de oligonucleótidos específicos para el gen de interés o el antecedente del vector de *Agrobacterium*, etc.

10 La transformación de las plantas se puede confirmar mediante análisis de transferencia Southern del ADN genómico (Sambrook y Russell, 2001, *supra*). En general, se extrae ADN total de las transformantes, se lo digiere con enzimas de restricción apropiadas, se lo fracciona en un gel de agarosa y se lo transfiere a una membrana de nitrocelulosa o nylon. Luego se analiza la membrana o el "transferido", por ejemplo, con un fragmento de ADN radiomarcado con <sup>32</sup>P para confirmar la integración del gen introducido en el genoma de la planta, de acuerdo con procedimientos convencionales (Sambrook y Russell, 2001, *supra*).

15 En los análisis de transferencia Northern, se aísla ARN de tejidos específicos de los transformantes, se lo fracciona en un gel de agarosa con formaldehído y se lo transfiere a un filtro de nylon de acuerdo con procedimientos convencionales utilizados comúnmente en la técnica (Sambrook y Russell (2001) *supra*). Después se evalúa la expresión del ARN codificado por el gen plaguicida por hibridación del filtro con una sonda radiactiva derivada de un gen plaguicida, de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica (Sambrook y Russell, 2001, *supra*).

Es posible realizar una transferencia Western, análisis bioquímicos y semejantes en las plantas transgénicas para confirmar la presencia de la proteína codificada por el gen plaguicida, de acuerdo con procedimientos convencionales (Sambrook y Russell, 2001, *supra*), usando anticuerpos que se unen a uno o más epítomos presentes en la proteína plaguicida.

25 Actividad plaguicida en plantas

En otro aspecto de la invención, es posible generar plantas transgénicas que expresan una proteína plaguicida que tiene actividad plaguicida. A modo de ejemplo, se pueden utilizar los procedimientos descritos con anterioridad para generar las plantas transgénicas, pero la forma en la que se generan las células vegetales transgénicas no es crítica para esta invención. Se pueden usar procedimientos conocidos o descritos en la técnica, tales como la transformación mediada por *Agrobacterium*, la transformación biolística y procedimientos no mediados por partículas, de acuerdo con la discreción del experimentador. Las plantas que expresan una proteína plaguicida se pueden aislar de acuerdo con procedimientos comunes descritos en la técnica, por ejemplo, mediante la transformación de callos, la selección de los callos transformados y la regeneración de plantas fértiles a partir de dichos callos transgénicos. En este proceso se puede usar cualquier gen como marcador de selección, siempre que su expresión en las células vegetales confiera la capacidad de identificar o seleccionar las células transformadas.

30 Se han desarrollado varios marcadores para usar con células vegetales, tales como la resistencia a cloranfenicol, el aminoglicósido G418, la higromicina o semejantes. También se pueden usar otros genes que codifican un producto que participa en el metabolismo de los cloroplastos como marcadores de selección. Por ejemplo, son de particular utilidad los genes que confieren resistencia a herbicidas vegetales, tales como glifosato, bromoxinilo o imidazolinona. Dichos genes ya fueron descritos (Stalker et al., (1985) *J. Biol. Chem.*, 263: 6310-6314 (gen de nitrilasa de resistencia a bromoxinilo); y Sathasivan et al., *Nucl. Acids Res.*, 18: 2188 (gen de resistencia a imidazolinona AHAS). Adicionalmente, los genes descritos en la presente son útiles como marcadores para evaluar la transformación de células bacterianas o vegetales. Los procedimientos para detectar la presencia de un transgén en una planta, un órgano de una planta (por ejemplo, hojas, tallos, raíces, etcétera), una semilla, una célula vegetal, un propágulo, un embrión o su progenie son bien conocidos en la técnica. En una realización, la presencia del transgén se detecta determinando la actividad plaguicida.

45 Es posible determinar la actividad plaguicida en las plantas fértiles que expresan una proteína plaguicida, y las plantas que presentan una actividad óptima se pueden seleccionar para realizar cruzamientos adicionales. En la técnica hay procedimientos disponibles para evaluar la actividad plaguicida. En general, la proteína se mezcla y se usa en ensayos de alimentación. Véase, por ejemplo, Marrone et al., (1985) *J. of Economic Entomology* 78:290-293.

50 La presente invención se puede usar para transformar cualquier especie de planta, incluyendo, pero en un sentido no taxativo, monocotiledóneas y dicotiledóneas. Los ejemplos de especies de plantas de interés incluyen, pero en un sentido no taxativo, maíz, sorgo, trigo, girasol, tomate, crucíferas, pimienta, papa, algodón, arroz, soja, remolacha, caña de azúcar, tabaco, cebada y semilla de colza, *Brassica* sp., alfalfa, centeno, mijo, cártamo, maní, batata, mandioca, café, coco, ananá, árboles de cítricos, cacao, té, banana, avocado, higo, guayaba, mango, oliva, papaya, anacardio, macadamia, almendra, cebada, verduras, plantas ornamentales y coníferas.

Las verduras incluyen, pero en un sentido no taxativo, tomates, lechuga, judías verdes, judías lima, arvejas y

miembros del género *Curcumis*, tales como pepino, melón y melón musk. Las plantas ornamentales incluyen, pero en un sentido no taxativo, azalea, hidrangea, hibiscus, rosas, tulipanes, narcisos, petunias, clavel, pastora roja y crisantemo. Preferiblemente, las plantas de la presente invención son plantas de cultivo (por ejemplo, maíz, sorgo, trigo, girasol, tomate, crucíferas, pimienta, papa, algodón, arroz, soja, remolacha, caña de azúcar, tabaco, cebada, semilla de colza, etcétera).

#### Uso en el control con plaguicidas

Se conocen en la técnica procedimientos generales para emplear cepas que comprenden una secuencia de nucleótidos desvelada en el presente documento, o una variante de la misma, en el control de plagas, o para modificar otros organismos como agentes plaguicidas. Véase, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. N°: 5039523 y EP 0480762A2.

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

Como alternativa, el plaguicida se produce introduciendo un gen plaguicida en un huésped celular. La expresión del gen plaguicida resulta, directa o indirectamente, en la producción y el mantenimiento intracelular del plaguicida. En un aspecto de la presente invención, estas células son tratadas luego bajo condiciones que prolongan la actividad de la toxina producida en la célula cuando la célula es aplicada al ambiente en donde se encuentra la plaga blanco. Los productos resultantes retienen la toxicidad de la toxina. Estos plaguicidas naturalmente encapsulados pueden ser formulados luego de acuerdo con técnicas convencionales para la aplicación al ambiente que es huésped de la plaga blanco, por ejemplo, suelo, agua y follaje de las plantas. Véase, por ejemplo, EPA 0192319, y las referencias citadas en dicha publicación. Como alternativa, es posible formular las células que expresan un gen de esta invención para poder aplicar el material resultante como plaguicida.

Los ingredientes activos de la presente invención se aplican normalmente bajo la forma de composiciones, y se los puede aplicar sobre el área de cultivo, las plantas o las semillas a tratar, en forma simultánea o sucesiva, con otros compuestos. Estos compuestos pueden ser fertilizantes, exterminadores de malezas, crioprotectores, agentes tensioactivos, detergentes, jabones plaguicidas, aceites latentes, polímeros y/o formulaciones vehículo de liberación demorada o biodegradables, que permiten la dosificación a largo plazo de un área blanco después de una única aplicación de la formulación. También pueden ser herbicidas selectivos, insecticidas químicos, viricidas, microbicidas, amebicidas, plaguicidas, fungicidas, bactericidas, nematocidas, molusquicidas o mezclas de varias de estas preparaciones, si se lo desea, junto con otros vehículos aceptables para el uso agrícola, agentes tensioactivos o coadyuvantes que promueven la absorción de uso común en la técnica de la formulación. Los vehículos y los coadyuvantes adecuados pueden ser sólidos o líquidos, y pueden corresponder a sustancias comúnmente empleadas en la tecnología de las formulaciones, por ejemplo, sustancias minerales, naturales o regeneradas, solventes, dispersantes, agentes humectantes, agentes adhesivos, aglutinantes o fertilizantes. Del mismo modo, las formulaciones se pueden preparar como "cebos" comestibles, o se les puede dar la forma de "trampas", para permitir la alimentación o la ingesta de la formulación plaguicida por una plaga blanco.

Los procedimientos para aplicar un ingrediente activo de la presente invención, o una composición agroquímica de la presente invención que contiene por lo menos una de las proteínas plaguicidas producidas por las cepas de bacterias de la presente invención, incluyen la aplicación sobre las hojas, el recubrimiento de las semillas y la aplicación en la tierra. La cantidad de aplicaciones y la frecuencia de las aplicaciones dependen de la intensidad de la infestación con la plaga correspondiente.

La composición se puede formular como un polvo, un polvillo, una cápsula, un gránulo, un rocío, una emulsión, un coloide, una solución o semejantes, y puede prepararse con medios convencionales, tales como la desecación, la liofilización, la homogenización, la extracción, la filtración, la centrifugación, la sedimentación o la concentración de un cultivo de células que comprenden el polipéptido. En todas estas composiciones que contienen por lo menos uno de estos polipéptidos plaguicidas, el polipéptido puede estar presente a una concentración de entre aproximadamente 1% y aproximadamente 99% en peso.

Se puede matar, o reducir el número, de plagas de coleópteros en un área dada mediante los procedimientos de la invención, o se puede aplicar de manera profiláctica a un área del ambiente para prevenir la infestación por una plaga susceptible. Preferiblemente, la plaga ingiere o toma contacto con una cantidad eficaz como plaguicida del polipéptido. Una "cantidad eficaz como plaguicida" significa una cantidad de plaguicida que puede eliminar por lo menos una plaga, o reducir notablemente el crecimiento, la alimentación o el desarrollo normal de la plaga. Esta cantidad variará dependiendo de factores tales como, por ejemplo, las plagas blanco específicas a controlar, el ambiente específico, la localización, la planta, el cultivo o el sitio agrícola a tratar, las condiciones ambientales, y el procedimiento, la tasa, la concentración, la estabilidad, y la cantidad de aplicación de la composición del polipéptido efectivo como plaguicida. Las formulaciones también pueden variar respecto de las condiciones climáticas, las

consideraciones ambientales y/o la frecuencia de aplicación y/o la gravedad de la infestación de la plaga.

Las composiciones plaguicidas descritas se pueden preparar formulando la suspensión de células bacterianas, cristales y/o esporas, o el componente proteico aislado, con el vehículo agrónomicamente aceptable deseado. Antes de la administración, las composiciones se pueden formular en un medio apropiado, tal como un vehículo liofilizado, secado por congelamiento o desecado, o en un vehículo acuoso, un medio o un diluyente apropiado, tal como solución salina u otro amortiguador. Las composiciones formuladas pueden tomar la forma de un polvo o un material granular, o una suspensión en aceite (vegetal o mineral), o emulsiones de agua o aceite/agua, o como un polvo humectable, o en combinación con cualquier otro material vehículo apropiado para una aplicación agrícola. Los vehículos agrícolas apropiados pueden ser sólidos o líquidos, y se conocen bien en la técnica. La expresión "vehículo agrónomicamente aceptable" abarca todos los coadyuvantes, los componentes inertes, los dispersantes, los agentes tensioactivos, los espesantes, los aglutinantes, etcétera, que se usan comúnmente en la tecnología de formulación de plaguicidas; los cuales son bien conocidos por los expertos en la técnica de la formulación de plaguicidas. Las formulaciones pueden mezclarse con uno o más coadyuvantes sólidos o líquidos, y se pueden preparar con diversos medios, por ejemplo, mezclando de forma homogénea, combinando y/o triturando la composición plaguicida con coadyuvantes apropiados, usando técnicas de formulación convencionales. Las formulaciones y los procedimientos de aplicación apropiados se describen en la Patente de los EE.UU. N°: 6468523.

Los ejemplos de plagas del gusano de la raíz del maíz incluyen, por ejemplo, gusano de la raíz del maíz occidental (por ejemplo, *Diabrotica virgifera virgifera*), gusano de la raíz del maíz del norte (por ejemplo, *Diabrotica barberi*) y gusano de la raíz del maíz del sur (por ejemplo, *Diabrotica undecimpunctata howardi*).

#### 20 Procedimientos para incrementar el rendimiento de una planta

Se proveen procedimientos para incrementar el rendimiento de una planta. Los procedimientos comprenden proveer una planta o una célula vegetal que expresa un polinucleótido que codifica la secuencia de polipéptidos plaguicida divulgada en la presente y cultivar la planta o una semilla de la misma en un campo infestado con una plaga (o susceptible a una infección por la misma) contra la cual dicho polipéptido tiene actividad plaguicida. En particular, la presente invención proporciona un procedimiento para aumentar el rendimiento en una planta de maíz que comprende hacer crecer en un campo una planta de maíz de o una semilla de la misma que tiene incorporado establemente en su genoma un constructo de ADN que comprende una secuencia de nucleótidos unida operativamente a un promotor capaz de dirigir la expresión de la secuencia de nucleótidos en una célula vegetal, en el que dicha secuencia de nucleótidos se selecciona del grupo que consiste en:

- 30 a) la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 1 o 2; y
- b) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:3, en el que dicho polipéptido tiene una actividad plaguicida contra una plaga del gusano de la raíz del maíz.

en el que dicho campo está infestado con una plaga del gusano de la raíz del maíz. En algunas realizaciones, el polipéptido Axmi184 descrito en la presente tiene actividad plaguicida contra una plaga del gusano de la raíz del maíz, y dicho campo está infestado con dicha plaga del gusano de la raíz del maíz. En diversas realizaciones, la plaga del gusano de la raíz del maíz es el gusano de la raíz del maíz occidental. Tal como se define en la presente, el "rendimiento" de la planta hace referencia a la calidad y/o la cantidad de la biomasa producida por la planta. La "biomasa" hace referencia a cualquier producto vegetal medido. Un incremento en la producción de biomasa es cualquier mejora en el rendimiento del producto vegetal medido. El incremento del rendimiento de una planta tiene diversas aplicaciones comerciales. Por ejemplo, el incremento de la biomasa foliar de la planta puede incrementar el rendimiento de las verduras de hoja para consumo humano o por animales. Adicionalmente, el incremento de la biomasa de las hojas se puede usar para incrementar la producción de productos farmacéuticos o industriales derivados de plantas. Un incremento en el rendimiento puede comprender cualquier incremento de significación estadística, incluyendo, pero en un sentido no taxativo, un incremento de por lo menos 1%, un incremento de por lo menos 3%, un incremento de por lo menos 5%, un incremento de por lo menos 10%, un incremento de por lo menos 20%, por lo menos 30%, por lo menos 50%, por lo menos 70%, por lo menos 100%, o un incremento mayor en el rendimiento, en comparación con una planta que no expresa la secuencia plaguicida. En procedimientos específicos, el rendimiento de la planta se incrementa como resultado de la resistencia a plagas mejorada de una planta que expresa una proteína plaguicida descrita en la presente. La expresión de la proteína plaguicida da como resultado una capacidad reducida de la plaga para infestar o alimentarse.

Las plantas también se pueden tratar con una o más composiciones químicas, incluyendo uno o más herbicidas, insecticidas o fungicidas. Los ejemplos de composiciones químicas incluyen: Herbicidas para frutas/verduras: atrazina, bromacilo, diurón, glifosato, linurón, metribuzina, simazina, trifluralina, fluazifop, glufosinato, galosulfurón Gowan, paraquat, propizamidá, setoxidim, butafenacilo, halosulfurón, indaziflam; Insecticidas de frutas/verduras: aldicarb, *Bacillus thuriangiensis*, carbarilo, carbofurano, clorpirifos, cipermetrina, deltametrina, abamectina, ciflutrina/beta-ciflutrina, esfenvalerato, lambda-cihalotrina, acequinocilo, bifenazato, metoxifenozida, novalurón, cromafenozida, tiacloprida, dinotefurano, fluacripirim, espiroclorfenol, gamma-cihalotrina, espiromesifeno, espinosad, rinaxipir, ciazipir, triflumurón, espirotetramat, imidacloprida, flubendiamida, tiodicarb, metaflumizona, sulfoxaflor, ciflumetofeno, cianopirafeno, clotianidina, tiametoxam, espinotoram, tiodicarb, flonicamida, metiocarb,



emamectina-benzoato, indoxacarb, fenamifos, piriproxifeno, fenbutatina-óxido; Fungicidas para frutas/verduras: ametoctradina, azoxistrobina, bentiavalicarb, boscalid, captán, carbendazim, clorotalonilo, cobre, ciazofamid, ciflufenamid, cimoxanilo, ciproconazol, ciprodinilo, difenoconazol, dimetomorf, ditianón, fenamidona, fenhexamida, fluazinam, fludioxonilo, fluopicolida, fluopiram, fluoxastrobina, fluxapiroxad, folpet, fosetilo, iprodiona, iprovalicarb, isopirazam, kresoxim-metilo, mancozeb, mandipropamida, metalaxilo/mefenoxam, metiram, metrafenona, miclobutanilo, penconazol, pentiopirad, picoxistrobina, propamocarb, propiconazol, propineb, proquinazid, protioconazol, piraclostrobina, pirimetanilo, quinoxifeno, espiroxamina, azufre, tebuconazol, tiofanato-metilo, trifloxistrobina; Herbicidas para cereales: 2.4-D, amidosulfurón, bromoxinilo, carfentrazona-E, clorotolurón, clorsulfurón, clodinafop-p, clopiralida, dicamba, diclofop-m, diflufenicano, fenoxaprop, florasulam, flucarbazona-NA, flufenacet, flupirosulfurón-m, fluroxipir, flurtamona, glifosato, iodosulfurón, ioxinilo, isoproturón, mcpa, mesosulfurón, metsulfurón, pendimetalina, pinoxadeno, propoxicarbazona, prosulfocarb, piroxsulam, sulfosulfurón, tifensulfurón, tralcoxidim, triasulfurón, tribenurón, trifluralina, tritosulfurón; Fungicidas para cereales: azoxistrobina, bixafeno, boscalid, carbendazim, clorotalonilo, ciflufenamid, ciproconazol, ciprodinilo, dimoxistrobina, epoxiconazol, fenpropidina, fenpropimorf, fluopiram, fluoxastrobina, fluoquinconazol, fluxapiroxad, isopirazam, kresoxim-metilo, metconazol, metrafenona, pentiopirad, picoxistrobina, procloraz, propiconazol, proquinazid, protioconazol, piraclostrobina, quinoxifeno, espiroxamina, tebuconazol, tiofanato-metilo, trifloxistrobina; Insecticidas para cereales: dimetoato, lambda-cihaltrina, deltametrina, alfa-cipermetrina, [beta]-ciflutrina, bifentrina, imidacloprida, clotianidina, tiametoxam, tiacloprida, acetamiprida, dinetofurano, clorpirifos, pirimicarb, metiocarb, sulfoxaflor; Herbicidas para maíz: atrazina, alaclor, bromoxinilo, acetoclor, dicamba, clopiralid, (s)-dimetenamida, glufosinato, glifosato, isoxaflutol, (s)-metolaclo, mesotriona, nicosulfurón, primisulfurón, rimsulfurón, sulcotriona, foramsulfurón, topramezona, tembotriona, saflufenacilo, tiencarbazona, flufenacet, piroxasulfona; Insecticidas para maíz: carbofurano, clorpirifos, bifentrina, fipronilo, imidacloprida, lambda-cihalotrina, teflutrina, terbufos, tiametoxam, clotianidina, espiromesifeno, flubendiamida, triflumurón, rinaxipir, deltametrina, tiodicarb, beta-ciflutrina, cipermetrina, bifentrina, lufenurón, tebupirimfos, etiprol, ciazipir, tiacloprida, acetamiprida, dinetofurano, avermectina; Fungicidas para maíz: azoxistrobina, bixafeno, boscalid, ciproconazol, dimoxistrobina, epoxiconazol, fenitropan, fluopiram, fluoxastrobina, fluxapiroxad, isopirazam, metconazol, pentiopirad, picoxistrobina, propiconazol, protioconazol, piraclostrobina, tebuconazol, trifloxistrobina; Herbicidas para arroz: butaclor, propanilo, azimsulfurón, bensulfurón, cihalofop, daimurón, fentrazamida, imazosulfurón, mefenacet, oxaziclomefona, pirazosulfurón, piributicarb, quinclorac, tiobencarb, indanofano, flufenacet, fentrazamida, halosulfurón, oxaziclomefona, benzobiciclona, piritalida, penoxsulam, bispiribac, oxadiargilo, etoxisulfurón, pretilaclor, mesotriona, tefuriltriona, oxadiazona, fenoxaprop, pirimisulfán; Insecticidas para arroz: diazinona, fenobucarb, benfuracarb, buprofenzina, dinotefurano, fipronilo, imidacloprida, isoprocarb, tiacloprida, cromafenozida, clotianidina, etiprol, flubendiamida, rinaxipir, deltametrina, acetamiprida, tiametoxam, ciazipir, espinosad, espinotoram, emamectina-benzoato, cipermetrina, clorpirifos, etofenprox, carbofurano, benfuracarb, sulfoxaflor; Fungicidas para arroz: azoxistrobina, carbendazim, carpropamid, diclocimet, difenoconazol, edifenfos, ferimzona, gentamicina, hexaconazol, himexazol, iprobenfos (ibp), isoprotolano, isotianilo, kasugamicina, mancozeb, metominostrobina, orisastrobina, pencicurón, probenazol, propiconazol, propineb, piroquilón, tebuconazol, tiofanato-metilo, tiadinilo, triciclazol, trifloxistrobina, validamicina; Herbicidas para algodón: diurón, fluometurón, MSMA, oxifluorfenol, prometrina, trifluralina, carfentrazona, cletodim, fluazifop-butilo, glifosato, norflurazón, pendimetalina, piritiobac-sodio, trifloxisulfurón, tepraloxidim, glufosinato, flumioxazina, tidiazurón; Insecticidas para algodón: acefato, aldicarb, clorpirifos, cipermetrina, deltametrina, abamectina, acetamiprida, emamectina-benzoato, imidacloprida, indoxacarb, lambda-cihalotrina, espinosad, tiodicarb, gamma-cihalotrina, espiromesifeno, piridialilo, flonicamid flubendiamida, triflumurón, rinaxipir, beta-ciflutrina, espirotetramat, clotianidina, tiametoxam, tiacloprida, dinetofurano, flubendiamida, ciazipir, espinosad, espinotoram, gamma-cihalotrina, 4-[[[(6-clorpiridin-3-il)metil](2,2-difluoretil)amino]furan-2(5h)-ona, tiodicarb, avermectina, flonicamid, piridialilo, espiromesifeno, sulfoxaflor; Fungicidas para algodón: azoxistrobina, bixafeno, boscalid, carbendazim, clorotalonilo, cobre, ciproconazol, difenoconazol, dimoxistrobina, epoxiconazol, fenamidona, fluazinam, fluopiram, fluoxastrobina, fluxapiroxad, iprodiona, isopirazam, isotianilo, mancozeb, maneb, metominostrobina, pentiopirad, picoxistrobina, propineb, protioconazol, piraclostrobina, quintozeno, tebuconazol, tetraconazol, tiofanato-metilo, trifloxistrobina; Herbicidas para soja: alaclor, bentazona, trifluralina, clorimurón-etilo, cloransulam-metilo, fenoxaprop, fomesafeno, fluazifop, glifosato, imazamox, imazaquina, imazetapir, (S)-metolaclo, metribuzina, pendimetalina, tepraloxidim, glufosinato; Insecticidas para soja: lambda-cihalotrina, metomilo, imidacloprida, clotianidin, tiametoxam, tiacloprida, acetamiprida, dinetofurano, flubendiamida, rinaxipir, ciazipir, espinosad, espinotoram, emamectina-benzoato, fipronilo, etiprol, deltametrina, [beta]-ciflutrina, gamma y lambda-cihalotrina, 4-[[[(6-clorpiridin-3-il)metil](2,2-difluoretil)amino]furan-2(5h)-ona, espirotetramat, espinodiclofeno, triflumurón, flonicamida, tiodicarb, beta-ciflutrina; Fungicidas para soja: azoxistrobina, bixafeno, boscalid, carbendazim, clorotalonilo, cobre, ciproconazol, difenoconazol, dimoxistrobina, epoxiconazol, fluazinam, fluopiram, fluoxastrobina, flutriafol, fluxapiroxad, isopirazam, iprodiona, isotianilo, mancozeb, maneb, metconazol, metominostrobina, miclobutanilo, pentiopirad, picoxistrobina, propiconazol, propineb, protioconazol, piraclostrobina, tebuconazol, tetraconazol, tiofanato-metilo, trifloxistrobin; Herbicidas para remolacha: cloridazon, desmedifam, etofumesato, fenmedifam, trialato, clopiralid, fluazifop, lenacilo, metamitrón, quinmerac, cicloxidim, triflusulfurón, tepraloxidim, quizalofop; Insecticidas para remolacha: imidacloprida, clotianidina, tiametoxam, tiacloprida, acetamiprida, dinetofurano, deltametrina, [beta]-ciflutrina, gamma/lambda-cihalotrina, 4-[[[(6-clorpiridin-3-il)metil](2,2-difluoretil)amino]furan-2(5h)-ona, teflutrina, rinaxipir, ciazipir, fipronilo, carbofurano; Herbicidas para canola: clopiralid, diclofop, fluazifop, glufosinato, glifosato, metazaclo, etametsulfurón trifluralina, quinmerac, quizalofop, cletodim, tepraloxidim; Fungicida para canola: azoxistrobina, bixafeno, boscalid, carbendazim, ciproconazol, difenoconazol, dimoxistrobina, epoxiconazol, fluazinam, fluopiram, fluoxastrobina, flusilazol, fluxapiroxad, iprodiona, isopirazam,

cloruro de mepiquat, metconazol, metominostrobin, paclobutrazol, pentiopirad, picoxistrobina, procloraz, protioconazol, piraclostrobina, tebuconazol, tiofanato-metilo, trifloxistrobina, vinclozolina; Insecticidas para canola: carbofurano, tiacloprida, deltametrina, imidacloprida, clotianidina, tiametoxam, acetamiprida, dinetofurano,  $\beta$ -ciflutrina, gamma y lambda-cihalotrina, tau-fluvalerato, etiprol, espinosad, espinotoram, flubendiamida, rinaxipir, ciazipir, 4-[[[6-clorpiridin-3 -il)metil](2,2-difluoretil)amino]furan-2(5H)-ona.

Los siguientes ejemplos se ofrecen con fines ilustrativos y no en un sentido limitativo.

## EJEMPLOS EXPERIMENTALES

### Ejemplo 1. Expresión y actividad de Axmi184 en *Zea mays*

Se aisló el gen Axmi184 (SEQ ID NO:1) de la cepa ATX14775 de *Bacillus thuringiensis*, y se describe en la Publicación de Patente de los Estados Unidos 2010004176. La secuencia de aminoácidos de AXMI184 (SEQ ID NO:3) tiene 93% de identidad de secuencia con Vip3Af1 (No. de acceso GENBANK CAI43275). Se ha demostrado que las proteínas Vip3A son tóxicas contra un grupo taxonómicamente diverso de lepidópteros (Estruch et al. (1996) Proc Natl Acad Sci USA 93:5389-5394). No ha habido pruebas de que un gen que tenga homología con la clase VIP de toxinas sea activo contra plagas de coleópteros.

Las plantas de maíz transgénicas transformadas con una versión optimizada de Axmi184 (optAxmi184, descrita en la presente como SEQ ID NO:2) se obtuvieron mediante transformación mediada por *Agrobacterium*. Se seleccionaron las plantas que se demostró mediante el análisis por PCR que contenían el constructo Axmi184 apropiado y se transfirieron a recipientes contenedores de raíz.

Las plantas T<sub>0</sub> que contenían optAxmi184 fueron trasplantadas a recipientes contenedores de raíz y se propagaron durante aproximadamente tres semanas. Cada una de las plantas individuales fueron infestadas con ~125 huevos de gusano de la raíz del maíz occidental (*Diabrotica virgifera*) sin entrar en diapausa. Se analizó en las plantas la expresión de la proteína AXMI184 mediante análisis de transferencia Western usando un anticuerpo anti-AXMI184. Las plantas que expresaron cantidades detectables de AXMI184 fueron seleccionadas para análisis. Después de quince días, se evaluó la cantidad de daño a las raíces de cada planta usando la Escala de Daño a los Nódulos (CRWNIS) (Oleson et al. 2005. *J. Econ Entomol.* 98(1): 1-8), donde 0.00 significa que no hubo daño y 3.00 que todas las raíces se podaron hasta 1.5 pulgadas del tallo en tres nódulos completos. La Figura 1 muestra que AXMI184 resultó en menos daño a las raíces que las plantas testigo infestadas del mismo modo.

### Ejemplo 2. Resultados del ensayo de campo

Las plantas T1 que expresaron optAxmi184 se evaluaron en dos lugares en Iowa. Cada unidad experimental consistió en una parcela de raíz de una sola fila que medía aproximadamente 15 pies. Las macetas se dispusieron usando un diseño de bloque completo aleatorizado con cuatro repeticiones. La eficacia contra el gusano de la raíz del maíz occidental se determinó evaluando hasta ocho raíces de maíz por parcela. Las endógamas B110 y B116, un híbrido comercial susceptible al CRW y dos estándares de control del CRW: B110 con un insecticida granular estándar (FORCE® 3G) y B110 con un tratamiento de semillas insecticida (PONCHO® 1250) se utilizaron como testigos.

Los campos se prepararon para este estudio usando prácticas de cultivo similares a aquellas utilizadas en los campos de maíz comercial de Iowa. Se identificaron las plantas que no contenían eventos transgénicos para el control del CRW y se excluyeron del estudio usando una aplicación de 16 oz/A de glifosato cuando las plantas se encontraban en la etapa de las hojas V1. Cinco a diez días después, se registró el número de plantas positivas y negativas en cada parcela. Luego se quitaron las plantas negativas y las plantas positivas restantes se redujeron a 8 plantas por fila. Todas las plantas se infestaron manualmente con huevos del gusano de la raíz del maíz occidental sin entrar en diapausa. Los huevos se suspendieron en una solución de agar diluida y se calibraron para proporcionar 750 huevos por planta para todas las parcelas.

Las raíces se removieron, se lavaron y se evaluó el daño por CRW después de un período de alimentación de larvas. Las observaciones del desarrollo de larvas en maíz sin protección (B110) se utilizaron para determinar los tiempos óptimos para esta evaluación. El daño al gusano de la raíz del maíz se caracterizó usando el CRWNIS. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1

Planta	Número de plantas	CRWNIS Promedio	Error estándar
B110	58	1.53	0.075
B110 + Fuerza	30	0.30	0.105
B110 + Poncho	31	0.08	0.103
B116	56	1.52	0.077
Híbrido negativo	32	0.83	0.101
optAxmi184	175	0.12	0.043

**Ejemplo 3. Formación de vectores con los genes para su expresión en plantas**

Las regiones de codificación de la invención se unen con las secuencias promotoras y de terminación apropiadas para su expresión en plantas. Estas secuencias son bien conocidas en la técnica, y pueden incluir el promotor de actina de arroz o el promotor de ubiquitina de maíz para expresar en monocotiledóneas, o el promotor UBQ3 de *Arabidopsis* o el promotor CaMV 35S para expresar en dicotiledóneas y los terminadores nos o PinII. Los procedimientos para producir y confirmar construcciones de promotores-genes-terminadores también son bien conocidos en la técnica.

En un aspecto de la invención, se diseñan y generan secuencias de ADN sintéticas. Estas secuencias sintéticas tienen secuencias de nucleótidos alteradas con relación a la secuencia progenitora, pero codifican proteínas que son esencialmente idénticas a la secuencia progenitora.

En otro aspecto de la invención se generan versiones modificadas de genes sintéticos, de modo que el péptido resultante sea dirigido a un organelo de la planta, tal como el retículo endoplasmático o el apoplasto. Se conocen en la técnica secuencias de péptidos que resultan en el direccionamiento de proteínas de fusión a organelos vegetales. Por ejemplo, en la técnica se sabe que la región N-terminal del gen de fosfatasa ácida del lupino blanco *Lupinus albus* (ID Genebank GI: 14276838; Miller *et al.* (2001) *Plant Physiology* 127: 594-606) resulta en el direccionamiento de las proteínas heterólogas hacia el retículo endoplasmático. Si la proteína de fusión resultante también contiene una secuencia de retención en retículo endoplasmático que comprende al péptido N-terminal-lisina-ácido aspártico-ácido glutámico-leucina (es decir, el motivo "KDEL", SEQ ID NO: 4) por el extremo C-terminal, la proteína de fusión será dirigida hacia el retículo endoplasmático. Si la proteína de fusión carece de una secuencia de direccionamiento para el retículo endoplasmático en el extremo C, la proteína será dirigida al retículo endoplasmático, pero finalmente será capturada por el apoplasto.

Por consiguiente, este gen codifica una proteína de fusión que contiene a los 31 aminoácidos N-terminales del gen de la fosfatasa ácida de la lupina blanca *Lupinus albus* (GENBANK®, ID GI: 14276838, Miller *et al.*, 2001, *supra*) fusionados al extremo N-terminal de la secuencia de aminoácidos de la invención, así como la secuencia KDEL (SEQ ID NO:4) por el extremo C-terminal. Por consiguiente, se prevé que la proteína resultante pueda ser dirigida al retículo endoplasmático de plantas con su expresión en una célula vegetal.

Los cassettes de expresión para plantas descritos anteriormente se combinan con marcadores de selección apropiados para plantas para ayudar en la selección de células y tejidos transformados, y se unen con vectores de transformación vegetales. Estos pueden incluir vectores binarios para la transformación mediada por *Agrobacterium* o vectores de plásmidos simples para la transformación con aerosol o biolística.

**Ejemplo 4. Transformación de los genes de la invención en células vegetales por medio de una transformación mediada por *Agrobacterium***

El mejor momento para recolectar las mazorcas es 8-12 días después de la polinización. Se aíslan los embriones de las espigas, y se prefiere usar los embriones con un tamaño de 0.8-1.5 mm para la transformación. Los embriones se colocan en placas con el lado del escutelo hacia arriba en un medio de incubación apropiado, y se incuba durante la noche a 25°C en oscuridad. Sin embargo, no es necesario *per se* incubar los embriones durante la noche. Los embriones se ponen en contacto con una cepa de *Agrobacterium* que contiene los vectores apropiados para la transferencia mediada por el plásmido Ti por aproximadamente 5-10 minutos, y luego se los coloca en placas en medio de co-cultivo por aproximadamente 3 días (22°C en oscuridad). Después del cocultivo, se transfieren los explantes a un medio para el período de recuperación por 5-10 días (a 25°C en oscuridad). Se incuban los explantes en medio de selección por hasta ocho semanas, dependiendo de la naturaleza y las características de la selección particular utilizada. Después del período de selección, se transfiere el callo resultante a un medio de maduración de embriones hasta observar la formación de embriones somáticos maduros. Los embriones somáticos maduros resultantes se colocan luego bajo iluminación escasa y se inicia el proceso de regeneración conocido en la técnica.

Todas las publicaciones y las solicitudes de patentes que se mencionan en la memoria descriptiva son indicativas del nivel de conocimiento de los expertos en la técnica a la que se refiere esta invención.

Aunque la invención precedente ha sido descrita con algún detalle a modo de ilustración y ejemplo, con el fin de facilitar la comprensión, será evidente que se pueden efectuar determinados cambios y modificaciones dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

**LISTADO DE SECUENCIAS**

<110> McNulty, Brian Stauffer, Maria

<120> USO DE AXMI184 PARA EL CONTROL DE LOS INSECTOS DEL GUSANO DE LA RAÍZ

<130>APA136001

<150> 61/764.246

ES 2 682 351 T3

<151> 13-02-2013

<160> 4

5 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 2370

<212> ADN

10 <213> *Bacillus thuringiensis*

<400> 1

atgaacatga acaagaataa tactaaatta agcgcaagag ctttaccaag ttttattgat	60
tattttaatg gcatttatgg atttgccact ggcacaaag atattatgaa catgattttt	120
aaaacggata caggtggtga tctaacccta gacgaaattt taaagaatca gcagttacta	180
aatgatattt ctggtaaatt ggatgggggtg aatggaagct taaatgatct tatcgcacag	240
ggaaacttaa atacagaatt atctaaggaa atattaaaaa ttgcaaatga acaaaatcaa	300
gttttaaatg atgttaataa caaactcgat gcgataaata cgatgcttca tgtatatcta	360
cctaaaatta cctctatggt aagtgatgta atgaaaccaa attatgctgct aagtatgcaa	420
atagaatacc taagtagaca attacaagaa atttcagata agctagatat tatcaacgta	480
aatgtactta ttaactctac acttactgaa attacacctg cgtatcaatg gattaaatat	540
gtgaacgaaa aatttgaaga attaactttt gctacagaaa ctactttaaa agtaaaaaat	600
gatagcgctt ctgcagatat tcttgatgag ttaacggagt taactgaact tgcgaaaagt	660
gtaacaaaaa atgatgtgga tggttttgaa ttttacctta atacattcca cgatgtaatg	720
gtaggaaata atttattcgg gcgttcgact ttaaaaactg cttcggaatt aattgctaaa	780
gaaaatgtga aaacaagtgg cagtgaggta ggaaatgttt ataatttctt agttgtatta	840
acagctctac aagcaaaagc ttttcttact ttaacaacat gccgaaaatt attaggccta	900
gcagatattg attatacatc tattatgaat gaacatttaa ataaggaaaa agaggaattt	960
agagtaaaca tccttcctat acttttctaact acttttttcta atcctaatta tgcaaaagtt	1020
aaaggaagtg atgaagatgc aaagatgatt gtggaagcta aaccaggaca tgcattggtt	1080
gggtttgaaa ttagtaatga ttcaatgaca gtattaaaag tatatgaagc taagctaaaa	1140
caaaattacc aagttgataa ggattcctta tcggaagtca tttatggtga tatggataaa	1200
ttattgtgcc cagatcaatc tgaaaaaatt tattatacaa ataatatagt atttccaaat	1260
gaatatgtaa ttactaaaat tgattttact aagaaaatga aaactttaag atatgaggta	1320
acagctaatt cttatgattc ttctacagga gaaattgact taataaaaaa gaaagtagaa	1380

ES 2 682 351 T3

tcaagtaaag cggagtatag gacgttaagt gctaataatg atggagtata tatgccgtta 1440  
 ggtgtcatca gtgaaacatt tttgactcca attaatggat ttggcctcca agctgatgaa 1500  
 aattcaagat taattacttt aacgtgtaaa tcatatttaa gggactact actagcgaca 1560  
 gacttaagca ataaagaaac taaattgatt gtccccccaa atagttttat tagcaatatt 1620  
 gtagagaatg ggtccataga agagggccac ttagagcctt ggaaagcaaa taataagaac 1680  
 gcttatgtag atcatacagg cggagtgaat ggtactaaag ctctatatgt tcatgaggat 1740  
 gggggggttt cacaattttat gggagataaa ttaaaaccga aaactgagta tgtaattcaa 1800  
 tatactgta aaggaaaacc ttctattcat ttaaaagatg aaaatactgg atatattctt 1860  
 tatgaagata caaataatga tttagaagat ttccaaacta taactaaaag gttcacaaca 1920  
 ggaactgatt taatgagagt gtatttaatt ttaaaaagtc aaagtgggtca cgaagcttgg 1980  
 ggagataact ttacaatttt ggaaattaag cctgcggagg ctttagtaag cccagaattg 2040  
 attaatccga attcttggat tacaactcaa ggggctagca tttcaggaga taaacttttt 2100  
 attagcttgg ggacaaatgg gacctttaga caaaatcttt cattaaacag ttattcaact 2160  
 tatagtataa gctttactgc atcgggacca tttaatgtga cggtaagaaa ttctagggaa 2220  
 gtatttatatg aacgaaacaa ccttatgtct tcaactagtc atatttctgg ggaattcaaa 2280  
 actgaatcca ataataccgg atttatatgta gaactttccc gtcgttctgg tgggtctggt 2340  
 catatatcat ttgaaaacat ttctattaa 2370

<210> 2  
 <211> 2370  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> gen sintético que codifica AXMI184 (optAxmi184)

10

<400> 2

atgaacatga acaagaacaa caccaagctc tccgcgcgcg cgctgccctc cttcatcgac 60  
 tacttcaatg gcatctatgg cttegccacc ggcatcaagg acatcatgaa catgatcttc 120  
 aagacagaca ctggaggaga tctcaccttg gatgagatcc tcaagaacca gcagctgctg 180  
 aatgacatct caggaagct ggatggcgtc aatggaagcc tcaatgatct cattgctcaa 240  
 ggaaacctca acacagagct ctccaaggag atcctcaaga tcgccaatga gcagaaccag 300  
 gtgctgaatg atgtcaacaa caagctggat gccatcaaca ccatgctgca tgtttatctt 360  
 ccaaagatca cctcaatgct ctctgatgtg atgaagccaa actatgctct ctccatgcaa 420  
 attgagtacc tctcaaggca gctgcaagag atctccgaca agctggacat catcaatgtc 480  
 aatgtgctga tcaacagcac cttgacagag atcacgccgg cctaccaatg gatcaaatat 540  
 gtcaatgaga agtttgagga gctcaccttc gccacagaaa caaccttgaa ggtgaagaat 600  
 gattcagctt ctgctgacat cctggatgag ctgacagagc tgacagagct ggccaagagc 660

ES 2 682 351 T3

gtcaccaaga atgatgttga tggcttcgag ttctacctca acaccttcca tgatgtgatg 720  
 gtgggcaaca acctctttgg aagaagcacc ctcaagacag cttcagagct gatcgccaag 780  
 gagaatgtca agacatctgg atcagaagtt ggaaatgtct acaacttcct ggtgggtgctg 840  
 acggcgctgc aagcaaaggc cttcctcacc ctcaccacct gccggaagct gctgggcctc 900  
 gccgacatcg actacacctc catcatgaat gagcacctca acaaggagaa ggaggagttc 960  
 agagtgaaca tcctccccat cctctccaac accttcagca accccaacta cgccaagggtg 1020  
 aagggtcag atgaagatgc caagatgatt gtggaggcca agcctggcca tgctctgggtg 1080  
 ggcttcgaga tcagcaatga cagcatgacg gtgctgaagg tgtatgaagc aaagctgaag 1140  
 cagaactacc aggtggacaa ggacagcctc tccgagggtga tctatggaga catggacaag 1200  
 ctgctctgcc cagatcaatc agagaagatc tactacacca acaacatcgt ctttccaaat 1260  
 gaatatgtca tcaccaagat cgacttcacc aagaagatga aaaccttgag atatgaagtc 1320  
 accgccaaca gctatgattc ttcaactgga gagatcgacc tcaacaagaa gaagggtggag 1380  
 agcagcaagg cagagtacag gacgctctcc gccacaatg atggcgtcta catgccgctc 1440  
 ggcgatcatc cagaaacctt cttgacgccc atcaatggct tcggcctcca agctgatgag 1500  
 aacagcaggc tcatcacctc cacctgcaag agctacctca gggagctgct gctggcaaca 1560  
 gatctctcca acaaggaaac aaagctgatt gttcctcca acagcttcat cagcaacatc 1620  
 gtggagaatg gaagcattga agaaggccac ctagagccat ggaaggccaa caacaagaat 1680  
 gcatatgtgg accacaccgg cggcgtaaat ggcaccaagg cgctctatgt tcatgaagat 1740  
 ggaggagttt cacagttcat gggagacaag ctgaagccaa aaacagaata tgatcatccag 1800  
 tacaccgtca agggcaagcc aagcatccac ctcaaggatg agaacaccgg ctacatcctc 1860  
 tacgaggaca ccaacaatga tttagaagat ttccaaacca tcaccaagag gttcaccact 1920  
 ggaacagatc tgatgagggt gtacctcatc ctcaagagcc aaagtgggtca tgaagcatgg 1980  
 ggagacaact tcaccatcct ggagatcaag ccagcagaag ctctggtttc tccagagctc 2040  
 atcaaccca acagctggat aacaacacaa ggagcttcaa tttctgggtga caagctcttc 2100  
 atctcccttg gaacaaatgg cacctccgc cagaacctct ccctcaacag ctacagcacc 2160  
 tacagcatca gcttcaccgc ctcaggccc ttcaatgtca ccgtcaggaa cagcagggtg 2220  
 gtgctgtatg aaaggaacaa cttgatgagc agcaccagcc acatctctgg agagttcaag 2280  
 acagaaagca acaacaccgg cctctatgtg gagctctcaa gaagaagcgg cggcgccggc 2340  
 cacatcagct tcgagaacat ctccatcaag 2370

<210> 3  
 <211> 790  
 <212> PRT  
 <213> *Bacillus thuringiensis*  
  
 <400> 3

Met Asn Met Asn Lys Asn Asn Thr Lys Leu Ser Ala Arg Ala Leu Pro

5

10

ES 2 682 351 T3

1		5		10		15													
Ser	Phe	Ile	Asp	Tyr	Phe	Asn	Gly	Ile	Tyr	Gly	Phe	Ala	Thr	Gly	Ile				
			20					25					30						
Lys	Asp	Ile	Met	Asn	Met	Ile	Phe	Lys	Thr	Asp	Thr	Gly	Gly	Asp	Leu				
		35					40					45							
Thr	Leu	Asp	Glu	Ile	Leu	Lys	Asn	Gln	Gln	Leu	Leu	Asn	Asp	Ile	Ser				
	50					55					60								
Gly	Lys	Leu	Asp	Gly	Val	Asn	Gly	Ser	Leu	Asn	Asp	Leu	Ile	Ala	Gln				
	65				70					75					80				
Gly	Asn	Leu	Asn	Thr	Glu	Leu	Ser	Lys	Glu	Ile	Leu	Lys	Ile	Ala	Asn				
				85					90					95					
Glu	Gln	Asn	Gln	Val	Leu	Asn	Asp	Val	Asn	Asn	Lys	Leu	Asp	Ala	Ile				
			100					105					110						
Asn	Thr	Met	Leu	His	Val	Tyr	Leu	Pro	Lys	Ile	Thr	Ser	Met	Leu	Ser				
		115					120					125							
Asp	Val	Met	Lys	Pro	Asn	Tyr	Ala	Leu	Ser	Met	Gln	Ile	Glu	Tyr	Leu				
	130					135					140								
Ser	Arg	Gln	Leu	Gln	Glu	Ile	Ser	Asp	Lys	Leu	Asp	Ile	Ile	Asn	Val				
	145				150					155					160				
Asn	Val	Leu	Ile	Asn	Ser	Thr	Leu	Thr	Glu	Ile	Thr	Pro	Ala	Tyr	Gln				
				165					170					175					
Trp	Ile	Lys	Tyr	Val	Asn	Glu	Lys	Phe	Glu	Glu	Leu	Thr	Phe	Ala	Thr				
			180					185					190						
Glu	Thr	Thr	Leu	Lys	Val	Lys	Asn	Asp	Ser	Ala	Ser	Ala	Asp	Ile	Leu				
		195					200					205							
Asp	Glu	Leu	Thr	Glu	Leu	Thr	Glu	Leu	Ala	Lys	Ser	Val	Thr	Lys	Asn				
	210					215					220								
Asp	Val	Asp	Gly	Phe	Glu	Phe	Tyr	Leu	Asn	Thr	Phe	His	Asp	Val	Met				
	225				230					235					240				
Val	Gly	Asn	Asn	Leu	Phe	Gly	Arg	Ser	Thr	Leu	Lys	Thr	Ala	Ser	Glu				
				245					250					255					
Leu	Ile	Ala	Lys	Glu	Asn	Val	Lys	Thr	Ser	Gly	Ser	Glu	Val	Gly	Asn				
			260					265					270						

ES 2 682 351 T3

Val Tyr Asn Phe Leu Val Val Leu Thr Ala Leu Gln Ala Lys Ala Phe  
 275 280 285  
 Leu Thr Leu Thr Thr Cys Arg Lys Leu Leu Gly Leu Ala Asp Ile Asp  
 290 295 300  
 Tyr Thr Ser Ile Met Asn Glu His Leu Asn Lys Glu Lys Glu Glu Phe  
 305 310 315 320  
 Arg Val Asn Ile Leu Pro Ile Leu Ser Asn Thr Phe Ser Asn Pro Asn  
 325 330 335  
 Tyr Ala Lys Val Lys Gly Ser Asp Glu Asp Ala Lys Met Ile Val Glu  
 340 345 350  
 Ala Lys Pro Gly His Ala Leu Val Gly Phe Glu Ile Ser Asn Asp Ser  
 355 360 365  
 Met Thr Val Leu Lys Val Tyr Glu Ala Lys Leu Lys Gln Asn Tyr Gln  
 370 375 380  
 Val Asp Lys Asp Ser Leu Ser Glu Val Ile Tyr Gly Asp Met Asp Lys  
 385 390 395 400  
 Leu Leu Cys Pro Asp Gln Ser Glu Lys Ile Tyr Tyr Thr Asn Asn Ile  
 405 410 415  
 Val Phe Pro Asn Glu Tyr Val Ile Thr Lys Ile Asp Phe Thr Lys Lys  
 420 425 430  
 Met Lys Thr Leu Arg Tyr Glu Val Thr Ala Asn Ser Tyr Asp Ser Ser  
 435 440 445  
 Thr Gly Glu Ile Asp Leu Asn Lys Lys Lys Val Glu Ser Ser Lys Ala  
 450 455 460  
 Glu Tyr Arg Thr Leu Ser Ala Asn Asn Asp Gly Val Tyr Met Pro Leu  
 465 470 475 480  
 Gly Val Ile Ser Glu Thr Phe Leu Thr Pro Ile Asn Gly Phe Gly Leu  
 485 490 495  
 Gln Ala Asp Glu Asn Ser Arg Leu Ile Thr Leu Thr Cys Lys Ser Tyr  
 500 505 510  
 Leu Arg Glu Leu Leu Leu Ala Thr Asp Leu Ser Asn Lys Glu Thr Lys  
 515 520 525  
 Leu Ile Val Pro Pro Asn Ser Phe Ile Ser Asn Ile Val Glu Asn Gly  
 530 535 540



ES 2 682 351 T3

Ser Ile Glu Glu Gly His Leu Glu Pro Trp Lys Ala Asn Asn Lys Asn  
545 550 555 560

Ala Tyr Val Asp His Thr Gly Gly Val Asn Gly Thr Lys Ala Leu Tyr  
565 570 575

Val His Glu Asp Gly Gly Val Ser Gln Phe Met Gly Asp Lys Leu Lys  
580 585 590

Pro Lys Thr Glu Tyr Val Ile Gln Tyr Thr Val Lys Gly Lys Pro Ser  
595 600 605

Ile His Leu Lys Asp Glu Asn Thr Gly Tyr Ile Leu Tyr Glu Asp Thr  
610 615 620

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

Gly Thr Asp Leu Met Arg Val Tyr Leu Ile Leu Lys Ser Gln Ser Gly  
645 650 655

His Glu Ala Trp Gly Asp Asn Phe Thr Ile Leu Glu Ile Lys Pro Ala  
660 665 670

Glu Ala Leu Val Ser Pro Glu Leu Ile Asn Pro Asn Ser Trp Ile Thr  
675 680 685

Thr Gln Gly Ala Ser Ile Ser Gly Asp Lys Leu Phe Ile Ser Leu Gly  
690 695 700

Thr Asn Gly Thr Phe Arg Gln Asn Leu Ser Leu Asn Ser Tyr Ser Thr  
705 710 715 720

Tyr Ser Ile Ser Phe Thr Ala Ser Gly Pro Phe Asn Val Thr Val Arg  
725 730 735

Asn Ser Arg Glu Val Leu Tyr Glu Arg Asn Asn Leu Met Ser Ser Thr  
740 745 750

Ser His Ile Ser Gly Glu Phe Lys Thr Glu Ser Asn Asn Thr Gly Leu  
755 760 765

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

Glu Asn Ile Ser Ile Lys  
785 790

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

ES 2 682 351 T3

<220>

<223> Péptido directriz

<400> 4

5

Lys Asp Glu Leu  
1

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un procedimiento para matar o controlar una población de plagas del gusano de la raíz del maíz que comprende poner en contacto dicha población con una cantidad efectiva como plaguicida de un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:3, en el que el polipéptido tiene actividad plaguicida contra una plaga del gusano de la raíz del maíz.
- 10 2. Un procedimiento para proteger una planta de maíz de una plaga del gusano de la raíz del maíz que comprende expresar en una planta de maíz o célula de la misma una secuencia de nucleótidos operativamente ligada a un promotor capaz de dirigir la expresión de la secuencia de nucleótidos en una célula vegetal, en el que dicha secuencia de nucleótidos se selecciona del grupo que consiste en:
- 15 a) la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO:1 o 2; y  
b) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, en el que dicho polipéptido tiene actividad plaguicida contra una plaga del gusano de la raíz del maíz.
- 20 3. Un procedimiento para incrementar el rendimiento en una planta de maíz que comprende cultivar en un campo una planta de maíz o una semilla de la misma que ha incorporado de manera estable en su genoma un constructo de ADN que comprende una secuencia de nucleótidos operativamente ligada a un promotor capaz de dirigir la expresión de la secuencia de nucleótidos en una célula vegetal, en el que dicha secuencia de nucleótidos se selecciona del grupo que consiste en:
- 25 a) la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO:1 o 2; y  
b) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, en el que dicho polipéptido tiene actividad plaguicida contra una plaga del gusano de la raíz del maíz; en el que dicho campo está infestado con una plaga del gusano de la raíz del maíz.
- 30 4. El procedimiento de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicha plaga es una plaga del gusano de la raíz del maíz occidental.
5. El procedimiento de las reivindicaciones 2 o 3, en el que dicha planta comprende además una o más secuencias de nucleótidos que codifican una o más toxinas de insectos adicionales.
6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 98 % de identidad de secuencia a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3.
7. Uso de la planta de las reivindicaciones 2 o 3 para el control de una plaga del gusano de la raíz del maíz.

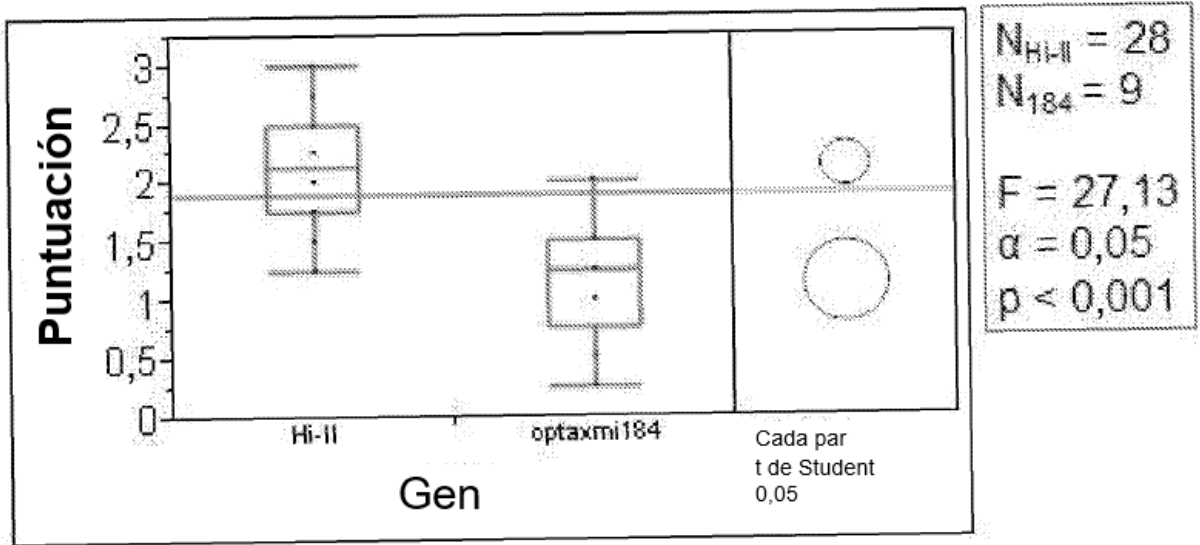


FIG. 1