

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 700 458**

51 Int. Cl.:

A01H 5/00	(2008.01)
A01H 1/00	(2006.01)
A01P 7/00	(2006.01)
A01H 5/10	(2008.01)
C12N 15/82	(2006.01)
A01N 63/02	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.12.2010 PCT/US2010/060810**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.06.2011 WO11075585**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.12.2010 E 10838257 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.10.2018 EP 2512219**

54 Título: **Uso combinado de Vip3Ab con Cry1Ca para reprimir insectos resistentes**

30 Prioridad:

16.12.2009 US 284290 P
 16.12.2009 US 284252 P
 16.12.2009 US 284281 P
 16.12.2009 US 284278 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
15.02.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 700 458 T3

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

DESCRIPCIÓN

Uso combinado de Vip3Ab con Cry1Ca para reprimir insectos resistentes

Antecedentes de la invención

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

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

15 Los productos comerciales que expresan estas proteínas expresan una única proteína, excepto en los casos en que se desee el espectro insecticida combinado de 2 proteínas (por ejemplo, Cry1Ab y Cry3Bb en maíz combinado para proporcionar resistencia a plagas de lepidópteros y al gusano de la raíz, respectivamente) o cuando la acción independiente de las proteínas las hace útiles como una herramienta para retrasar el desarrollo de la resistencia en poblaciones de insectos susceptibles (por ejemplo, Cry1Ac y Cry2Ab en el algodón combinado para proporcionar el control de resistencia para el gusano cogollero del tabaco). Véase también el documento n° US 2009 0313717, que se refiere a una proteína Cry2 más un Vip3Aa, Cry1F o Cry1A para el control de *Helicoverpa zea* o armigerain. El documento WO 2009 132850 se refiere a Cry1F o Cry1A y Vip3Aa para controlar *Spodoptera frugiperda*. El documento U.S. 2008 0311096 se refiere en parte a Cry1Ab para controlar el ECB resistente a Cry1F.

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

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

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

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

40 La proteína Cry1Fa es útil en el control de muchas especies de plagas de lepidópteros, incluyendo la barrenadora europea del maíz (ECB, *Ostrinia nubilalis* (Hübner)) y el gusano de la caña (FAW, *Spodoptera frugiperda*), y es activa contra la barrena de la caña de azúcar (SCB, *Diatraea saccharalis*). La proteína Cry1Fa, tal como se produce en plantas de maíz transgénicas que contienen el evento TC1507, es responsable de un rasgo de resistencia a los insectos líder en la industria para el control de FAW. Cry1Fa se despliega adicionalmente en los productos Herculex®, SmartStax™, y WideStrike™.

45 La capacidad para llevar a cabo estudios de unión de receptores (competitivos u homólogos) utilizando la proteína Cry1Fa está limitada debido a que la técnica más común disponible para el marcaje de proteínas para la detección en ensayos de unión de receptores inactiva la actividad insecticida de la proteína Cry1Fa.

Otras toxinas Cry se enumeran en el sitio web del comité de nomenclatura oficial de B.t. (Crickmore et al., lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/). Actualmente hay cerca de 60 grupos principales de toxinas "Cry" (Cry1-Cry59), con toxinas Cyt adicionales y toxinas VIP y similares. Muchas de cada grupo numérico tienen subgrupos de letras mayúsculas, y los subgrupos de letras mayúsculas tienen sub-subgrupos de letras minúsculas. (Cry1 tiene A-L, y Cry1A tiene a-i, por ejemplo).

Breve exposición de la invención

La presente invención se refiere en parte al sorprendente descubrimiento de que una población del gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda*; FAW) resistente a la actividad insecticida de la proteína Cry1Fa no es resistente a la actividad insecticida de la proteína Vip3Ab. El par objeto de toxinas proporciona una acción de resistencia no cruzada contra FAW.

Como cualquier experto en la técnica reconocerá gracias a esta descripción, las plantas que expresan Vip3Ab y Cry1Fa, o sus partes insecticidas, serán útiles en el retraso o la prevención del desarrollo de la resistencia a cualquiera de estas proteínas insecticidas solas.

La invención objeto también se apoya en el descubrimiento de que Vip3Ab y Cry1Fa no compiten entre sí por los sitios de unión en el intestino de FAW.

Así, la presente invención se refiere, en parte, al uso de una proteína Vip3Ab en combinación con una proteína Cry1Fa. Las plantas (y la superficie plantada con tales plantas) que producen Vip3Ab más Cry1Fa están incluidas dentro del alcance de la presente invención.

La presente invención también se refiere en parte a las pilas triple o "pirámides" de tres toxinas, o más, siendo Vip3Ab y Cry1Fa el par de bases. En algunas realizaciones preferidas de la pirámide, la(s) toxina(s) seleccionada(s) actúan con resistencia no cruzada frente a FAW. Algunas proteínas preferidas para estas combinaciones de pirámide triple pila son Cry1Fa más Vip3Ab más Cry1C, Cry1D, o Cry1Be. Estas pilas triples particulares proporcionarían, de acuerdo con la presente invención, de manera ventajosa y sorprendentemente resistencia no cruzada frente a FAW. Esto puede ayudar a reducir o eliminar el requisito de superficie de refugio.

Siendo Cry1Fa activo tanto frente a FAW como frente al barrenador del maíz europeo (ECB), y a la luz de los datos presentados en el presente documento, también podría ser seleccionada una pila cuádruple (de cuatro vías) para proporcionar cuatro proteínas, en la que tres de las cuatro tienen actividad resistente no cruzada contra ECB, y tres de los cuatro tienen actividad de resistencia no cruzada frente a FAW. Esto podría obtenerse mediante el uso de Cry1Be (activo tanto frente a ECB como FAW) junto con el par objeto de proteínas, además de una proteína adicional que es activa contra ECB. Tales pilas cuádruples, de acuerdo con la presente invención, son:

Cry1F más Cry1Be más Vip3Ab (activo frente a FAW) más Cry1Ab, Cry2A, Cry1I, o DIG-3 (activo contra ECB).

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Dosis respuestas de la inhibición del crecimiento (barras) y mortalidad (◆) para Vip3Ab1 de longitud completa frente a *Spodoptera frugiperda* natural (J.E. Smith), (FAW) y *Spodoptera frugiperda* tipo resistente a Cry1Fa (J.E. Smith), (rFAW). La inhibición del crecimiento porcentual se basa en la comparación del peso promedio de 8 larvas tratadas con tampón sólo frente al peso de las larvas expuestas a la toxina durante 5 días.

Figura 2. Fósforo-imagen de ¹²⁵I Cry1Fa unido a los BBMV de *S. frugiperda* después de separarse mediante SDS-PAGE. Las muestras se realizan por duplicado. La concentración de ¹²⁵I Cry1Fa fue 1 nM. El control representa el nivel de unión de ¹²⁵I Cry1Fa frente a los BBMV en ausencia de cualquier ligando competitivo. Cry1Fa 1.000 nM representa el nivel de unión de ¹²⁵I Cry1Fa frente a los BBMV en presencia de Cry1Fa no radiomarcado 1.000 nM, mostrando el desplazamiento completo del ligando radiomarcado a partir de la proteína BBMV. Vip3Ab1 1.000 nM representa el nivel de unión de ¹²⁵I Cry1Fa frente a los BBMV en presencia de Vip3Ab1 no radiomarcado 1.000 nM, mostrando que esta proteína no tiene la capacidad de desplazar ¹²⁵I Cry1Fa de los BBMV de *S. frugiperda* incluso cuando se añade a 1.000 veces la concentración del ligando radiomarcado.

Figura 3. Fósforo-imagen de ¹²⁵I Cry1Fa unido a los BBMV de *S. frugiperda* natural (FAW) o *S. frugiperda* resistente a Cry1Fa (rFAW) después de separarse mediante SDS-PAGE. Las muestras se realizan por duplicado. La concentración de ¹²⁵I Cry1Fa fue 2,5 nM. El FAW-0 representa el nivel de unión de ¹²⁵I Cry1Fa frente a los BBMV de *S. frugiperda* natural en ausencia de cualquier ligando competitivo. Cry1Fa FAW-1.000 nM representa el nivel de unión de ¹²⁵I Cry1Fa frente a los BBMV de *S. frugiperda* natural en presencia de Cry1Fa no radiomarcado 1.000 nM, mostrando el desplazamiento del ligando radiomarcado a partir de la proteína BBMV. El rFAW-0 representa el nivel de unión de ¹²⁵I Cry1Fa frente a los BBMV de *S. frugiperda* resistente a Cry1Fa en ausencia de cualquier ligando competitivo. Nótese la ausencia de unión de ¹²⁵I Cry1Fa frente a los BBMV de FAW resistente. rFAW-Cry1Fa 1.000 nM representa el nivel de unión de ¹²⁵I Cry1Fa frente a los BBMV en presencia de Vip3Ab1 no radiomarcado 1.000 nM, mostrando de nuevo la incapacidad de unir ¹²⁵I Cry1Fa a los BBMV a partir de *S. frugiperda* resistente a Cry1Fa.

Descripción detallada de la invención

5 Como se informó en el presente documento, una toxina Vip3Ab producida en maíz transgénico (y otras plantas; algodón y soja, por ejemplo) puede ser muy eficaz en el control del gusano cogollero (FAW; *Spodoptera frugiperda*) que han desarrollado resistencia a la actividad de Cry1Fa. Por lo tanto, la presente invención se refiere, en parte, al sorprendente descubrimiento de que el gusano cogollero resistente a Cry1Fa es susceptible (es decir, no tiene resistencia cruzada) a Vip3Ab. Dicho de otra manera, la presente invención también se refiere en parte al sorprendente descubrimiento de que la toxina Vip3Ab es efectiva en la protección de plantas (tales como plantas de maíz) del daño causado por el gusano cogollero resistente a Cry1Fa. Para una discusión de esta plaga, véase, por ejemplo, Tabashnik, PNAS (2008), vol. 105 n°. 49, 19.029-19.030.

10 La presente invención incluye el uso de la toxina Vip3Ab para proteger el maíz y otras especies vegetales de importancia económica (como la soja) de los daños y proporciona menores pérdidas causadas por la alimentación del gusano cogollero o frente a poblaciones del gusano cogollero que han desarrollado resistencia a Cry1Fa.

Así pues, la presente invención muestra una pila IRM que comprende Vip3Ab para prevenir o mitigar el desarrollo de la resistencia por parte del gusano cogollero frente a Cry1Fa.

15 La presente invención proporciona composiciones para controlar plagas de lepidópteros que comprenden células que producen una proteína que contiene la toxina nuclear Cry1Fa y una proteína que contiene la toxina nuclear Vip3Ab.

20 La invención comprende además un huésped transformado para producir tanto una proteína insecticida Cry1Fa como una proteína insecticida Vip3Ab, en el que dicho huésped es una planta. El polinucleótido o los polinucleótidos objetos están preferiblemente en una construcción genética bajo el control de (es decir, unidos operativamente o que comprenden) uno o varios promotores no de *Bacillus-thuringiensis*. Los polinucleótidos objetos pueden comprender el uso del codón para la expresión mejorada en una planta.

25 Se pretende además que la descripción proporcione un método de control plagas lepidópteras que comprende poner en contacto dichas plagas o el medio ambiente de dichas plagas con una cantidad eficaz de una composición que contiene una proteína que contiene la toxina nuclear de Cry1Fa y contiene además una proteína que contiene la toxina nuclear Vip3Ab.

Una descripción comprende una planta de maíz que comprende un gen expresable en planta que codifica una proteína que contiene la toxina nuclear de Vip3Ab y un gen expresable en planta que codifica una proteína que contiene la toxina nuclear de Cry1Fa y una semilla de dicha planta.

30 Una descripción adicional comprende una planta de maíz en la que el gen expresable en planta que codifica la proteína que contiene la toxina nuclear de Vip3Ab y un gen expresable en planta que codifica una proteína que contiene la toxina nuclear de Cry1Fa se han introducido en dicha planta de maíz y semilla de dicha planta.

35 Como se describe en los Ejemplos, los estudios de unión competitivos usando la proteína de la toxina nuclear de Vip3Ab radiomarcada muestran que la proteína de la toxina nuclear de Cry1Ca no compite por la unión en tejidos de insecto FAW a los que Vip3Ab se une. Estos resultados también indican que la combinación de las proteínas Vip3Ab y Cry1Ca es un medio eficaz para mitigar el desarrollo de la resistencia en poblaciones FAW frente a Cry1Fa (y de este modo, el desarrollo de la resistencia a Vip3Ab), y que probablemente aumentaría el nivel de resistencia a esta plaga en plantas de maíz que expresen ambas proteínas. De este modo, basándose en parte en los datos descritos en este documento, se cree que la coproducción (apilamiento) de las proteínas Cry1Ca y Vip3Ab puede usarse para producir una pila IRM de dosis alta para FAW. Siendo Cry1Fa activo otra vez frente a FAW y el barrenador europeo (ECB), el par objeto de toxinas proporciona una acción no competitiva frente al FAW.

40 Se pueden agregar otras proteínas a este par para ampliar el espectro de control del insecto. Otra opción de despliegue sería utilizar las proteínas Cry1Fa y Vip3Ab en combinación con otra, tercera toxina/gen, y utilizar esta triple pila para mitigar el desarrollo de la resistencia en FAW frente a cualquiera de estas toxinas. Por lo tanto, otra opción de despliegue de la presente invención sería utilizar dos, tres o más proteínas en regiones de cultivo donde FAW puede desarrollar poblaciones resistentes.

De acuerdo con esto, la presente invención se refiere también, en parte, a pilas triples o "pirámides" de tres (o más) toxinas, siendo las toxinas Cry1Fa y Vip3Ab el par de bases.

45 En algunas realizaciones preferidas de la pirámide, las tres proteínas seleccionadas proporcionan una acción resistente cruzada frente a FAW. Algunas combinaciones preferidas de la pirámide de la "acción triple" son Cry1Fa más Vip3Ab más tanto Cry1C como Cry1D. Véase el documento USSN 61/284.281 (presentado el 16 de diciembre de 2009), que muestra que Cry1C es activo frente a FAW Cry1F-resistente, y el documento USSN 61/284.252 (presentado el 16 de diciembre de 2009), que muestra que Cry1D es activo contra FAW Cry1F-resistente. Estas dos aplicaciones también muestran que Cry1C no compite con Cry1F para unirse en preparaciones de la membrana de FAW, y que Cry1D no compite con Cry1F para unirse en preparaciones de la membrana de FAW. En algunas realizaciones, Cry1Be o Cry1E se podría combinar con Vip3A y Cry1F como la tercera proteína anti-FAW. Para el

5 uso de Cry1Be con Cry1F, véase el documento USSN 61/284.290 (presentado el 16 de diciembre de 2009). Para el uso de Cry1E con Cry1F, véase el documento USSN 61/284.278 (presentado el 16 de diciembre de 2009). Estos apilamientos triples particulares, de acuerdo con la presente invención, ventajosa y sorprendentemente, proporcionan tres proteínas que generan una resistencia cruzada frente a FAW. Esto puede ayudar a reducir o eliminar el requisito de la superficie de refugio.

10 A la luz de los datos presentados en el presente documento, también se podría seleccionar una pila cuádruple (cuatro vías) para proporcionar tres proteínas con acción no cruzada contra el ECB y tres proteínas con acción resistente no cruzada frente a FAW. Esto podría obtenerse utilizando Cry1Be (activo contra ECB y FAW) junto con Cry1Fa (activo contra ECB y FAW) junto con el Vip3Ab objeto (activo contra FAW) y una cuarta proteína que tiene toxicidad contra el ECB (véase el documento USSN 61/284.290, archivado 16 de diciembre, 2009, que se relaciona con combinaciones de Cry1Fa y Cry1Be.) Los ejemplos de las pilas cuádruples, según la invención del objeto, son:

Cry1F más Cry1Be más Vip3 (activo contra FAW) más (Cry1Ab, Cry2A, Cry1I, o DIG-3-todos activos contra el ECB).

DIG-3 se describe en el documento US 2010 00269223.

15 Las plantas que producen cualquiera de las combinaciones objeto de proteínas se incluyen dentro del alcance de la presente invención. También se pueden añadir otras toxinas/genes, pero las pilas particulares discutidas arriba, ventajosa y sorprendentemente, proporcionan múltiples modos de acción contra FAW y/o ECB. Esto puede ayudar a reducir o a eliminar el requisito para la superficie del refugio. Un campo así plantado de unos 10 acres (4,05 ha) se incluye así dentro de la presente invención.

20 Se puede también utilizar GENBANK para obtener las secuencias para cualesquiera de los genes y de las proteínas descritas o mencionados en este documento. Véase el Apéndice A, a continuación.

La patente de EE.UU. n.º. 5.188.960 y la patente de EE.UU. n.º. 5.827.514 describe proteínas que contienen la toxina nuclear Cry1Fa convenientes para su uso al llevar a cabo la presente invención. La patente EE.UU. n.º. 6.218.188 describe las secuencias de ADN optimizadas en plantas que codifican proteínas que contienen toxinas nucleares de Cry1Fa que son apropiadas para su uso en la invención presente.

25 Cry1Fa aparece en los productos Herculex®, SmartStax™ y WideStrike™. Un gen de Vip3Ab podría combinarse, por ejemplo, en un producto Cry1Fa tal como Herculex®, SmartStax™ y WideStrike™. Por consiguiente, el uso de Vip3Ab podría ser significativo para reducir la presión de selección sobre estas y otras proteínas comercializadas. Vip3Ab podría usarse, así como en la combinación de 3 genes para el maíz y otras plantas (algodón y soja, por ejemplo).

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

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

45 Como ejemplo, una toxina quimérica es una porción de toxina de núcleo completa de Cry1Ca (aproximadamente los primeros 600 aminoácidos) y/o una protoxina heteróloga (los aminoácidos restantes de la proteína en el extremo C). La porción de una toxina quimérica que comprende la protoxina se deriva de una toxina proteica Cry1Ab o la porción de una toxina quimérica que comprende la protoxina se deriva de una toxina de la proteína Cry1Ab.

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

de protoxina, la extensión total de la porción de protoxina de Cry1Ab se extiende desde el extremo de la porción de toxina de núcleo hasta el extremo C de la molécula.

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

Tal como se usa en el presente documento, los límites representan aproximadamente el 95% (Vip3Ab y Cry1Fa), 78% (Vip3A y Cry1F), y 45% (Cry1 y Vip3) de identidad de secuencia, por "Revision of the Nomenclature for the Bacillus thuringiensis Pesticidal Crystal Proteins", N. Crickmore, D.R. Zeigler, J. Feitelson, E. Schnepf, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum y D.H. Dean. Microbiology and Molecular Biology Reviews (1998) Vol. 62: 807-813. Estos cortes también se pueden aplicar a las toxinas del núcleo solamente (para Cry1Fa, por ejemplo).

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

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

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

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

Tabla 1

Clase de aminoácido	Ejemplos de aminoácidos
---------------------	-------------------------

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

- 5 Huéspedes recombinantes. Los genes que codifican las toxinas se pueden introducir en una amplia variedad de huéspedes microbianos o vegetales. La expresión del gen de la toxina resulta, directa o indirectamente, en la producción y el mantenimiento intracelular del plaguicida. La transferencia conjugada y la transferencia recombinante se pueden usar para crear una cepa Bt que exprese ambas toxinas. Otros organismos huésped también pueden ser transformados con uno o ambos genes de la toxina usados entonces para lograr el efecto
- 10 sinérgico. Con huéspedes microbianos adecuados, por ejemplo, *Pseudomonas*, los microbios se pueden aplicar al sitio de la plaga, donde proliferarán y se ingerirán. El resultado es el control de la plaga. Alternativamente, el microbio que aloja el gen de la toxina puede ser tratado bajo condiciones que prolongan la actividad de la toxina y estabilizan la célula. La célula tratada, que retiene la actividad tóxica, puede aplicarse entonces al medio ambiente de la plaga diana.
- 15 Cuando el gen de la toxina Bt se introduce a través de un vector adecuado en un huésped microbiano, y dicho huésped se aplica al medio ambiente en un estado vivo, es esencial que se utilicen ciertos microbios huéspedes. Se seleccionan huéspedes de microorganismos que se sabe que ocupan la "fitosfera" (filoplano, filosfera, rizosfera y/o rizoplano) de uno o más cultivos de interés. Estos microorganismos se seleccionan de manera que sean capaces de competir exitosamente en el entorno particular (cultivo y otros hábitats de insecto) con los microorganismos de tipo
- 20 salvaje, proporcionar un mantenimiento estable y la expresión del gen que expresa el plaguicida polipeptídico, y, deseablemente, proporcionar una mejor protección del plaguicida frente a la degradación e inactivación del medio ambiente.

Se sabe que un gran número de microorganismos habitan el filoplano (la superficie de las hojas de la planta) y/o la rizosfera (el suelo que rodea las raíces de las plantas) de una amplia variedad de cultivos importantes. Estos

25 microorganismos incluyen bacterias, algas y hongos. De particular interés son microorganismos, tales como bacterias, por ejemplo, los géneros *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Serratia*, *Klebsiella*, *Xanthomonas*, *Streptomyces*, *Rhizobium*, *Rhodopseudomonas*, *Methylophilus*, *Agrobacterium*, *Acetobacter*, *Lactobacillus*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Leuconostoc* y *Alcaligenes*; hongos, particularmente levaduras, por ejemplo, los géneros *Saccharomyces*, *Cryptococcus*, *Kluyveromyces*, *Sporobolomyces*, *Rhodotorula* y *Aureobasidium*. Son de particular

30 interés las especies bacterianas de fitosfera tales como *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas fluorescens*, *Serratia marcescens*, *Acetobacter xylinum*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Rhodopseudomonas spheroides*, *Xanthomonas campestris*, *Rhizobium melioli*, *Alcaligenes entrophus* y *Azotobacter vinlandii*; y especies de levaduras de fitosfera tales como *Rhodotorula rubra*, *R. glutinis*, *R. marina*, *R. aurantiaca*, *Cryptococcus albidus*, *C. diffluens*, *C. laurentii*, *Saccharomyces rosei*, *S. pretoriensis*, *S. cerevisiae*, *Sporobolomyces roseus*, *S. odoratus*, *Kluyveromyces veronae* y

35 *Aureobasidium pollulans*. De particular interés son los microorganismos pigmentados.

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

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

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

- El tratamiento de la célula microbiana, por ejemplo, un microbio que contiene el gen de la toxina B.t., puede ser por medios químicos o físicos, o por una combinación de medios químicos y/o físicos, siempre y cuando la técnica no afecte negativamente a las propiedades de la toxina, ni disminuya la capacidad celular de proteger la toxina. Ejemplos de reactivos químicos son agentes halogenantes, particularmente halógenos del número atómico 17-80.
- 55 Más particularmente, se puede usar yodo en condiciones suaves y durante un tiempo suficiente para conseguir los resultados deseados. Otras técnicas adecuadas incluyen el tratamiento con aldehídos, tales como glutaraldehído; anti-infecciosos, tales como cloruro de zefirano y cloruro de cetilpiridinio; alcoholes, tales como isopropilo y etanol;

varios fijadores histológicos, tales como lugol yodo, fijador de Bouin, diversos ácidos y fijador de Helly (véase: Humason, Gretchen L., Animal Tissue Techniques, W. H. Freeman and Company, 1967); o una combinación de agentes físicos (calor) y químicos que preservan y prolongan la actividad de la toxina producida en la célula cuando la célula se administra al medio huésped. Los ejemplos de medios físicos son radiación de longitud de onda corta, tal como la radiación gamma y radiación X, congelación, irradiación UV, liofilización y similares. Los métodos para el tratamiento de células microbianas se describen en las Patentes de EE.UU. Números 4.695.455 y 4.695.462.

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

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

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

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

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

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

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

Transformación de plantas. Un huésped recombinante preferido para la producción de las proteínas insecticidas de la presente invención es una planta transformada. Los genes que codifican proteínas de toxina Bt, como se describe en este documento, se pueden insertar en células vegetales usando una variedad de técnicas que son bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, un gran número de vectores de clonación que comprenden un sistema de replicación en Escherichia coli y un marcador que permita la selección de las células transformadas están disponibles para la preparación para la inserción de genes ajenos en plantas superiores. Los vectores comprenden, por ejemplo, pBR322, serie pUC, serie M13mp, pACYC184, entre otros. Por consiguiente, el fragmento de ADN que

tiene la secuencia que codifica la proteína de la toxina Bt puede insertarse en el vector en un sitio de restricción adecuado. El plásmido resultante se utiliza para la transformación en *E. coli*. Las células de *E. coli* se cultivan en un medio nutriente adecuado, después se recogen y se lisan. Se recupera el plásmido. El análisis de secuencias, el análisis de restricción, la electroforesis y otros métodos bioquímicos y biológicos moleculares se llevan a cabo generalmente como métodos de análisis. Después de cada manipulación, la secuencia de ADN utilizada puede escindirse y unirse a la siguiente secuencia de ADN. Cada secuencia de plásmido puede clonarse en el mismo plásmido o en otros plásmidos. Dependiendo del método de inserción de genes deseados en la planta, pueden ser necesarias otras secuencias de ADN. Si, por ejemplo, se usa el plásmido Ti o Ri para la transformación de la célula vegetal, entonces se debe unir como mínimo el borde derecho, aunque a menudo el borde derecho e izquierdo del T-ADN del plásmido Ti o Ri, como la región flanqueante de los genes a insertar. El uso de T-ADN para la transformación de células de planta ha sido ampliamente investigado y suficientemente descrito en el documento EP 120 516, Lee y Gelvin (2008), Hoekema (1985), Fraley et al., (1986) y An et al., (1985), y está bien establecido en la técnica.

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

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

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

En una realización preferida de la presente invención, las plantas se transformarán con genes en los que se ha optimizado el uso de codones para plantas. Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 5.380.831. Aunque algunas toxinas truncadas se ejemplifican en la presente memoria, es bien conocido en la técnica de Bt que las toxinas de tipo 130 kDa (de longitud completa) tienen una mitad N-terminal que es la toxina nuclear y una mitad C-terminal que es la protoxina "cola". De este modo, se pueden usar "colas" apropiadas con toxinas truncadas/nucleares de la presente invención. Véase, p. ej., la Patente de Estados Unidos N° 6.218.188 y la Patente de Estados Unidos N° 6.673.990. Además, se conocen en la técnica métodos para crear genes Bt sintéticos para su uso en plantas (Stewart y Burgin, 2007). Un ejemplo no limitativo de una planta transformada preferida es una planta de maíz fértil que comprende genes expresables en una planta que codifican una proteína Cry1Fa, y que comprenden además un segundo gen expresable en planta que codifica una proteína Vip3Ab.

La transferencia (o introgresión) del rasgo o de los rasgos determinados por Cry1Fa y Vip3Ab en líneas de maíz endogámico puede lograrse mediante la reproducción recurrente selección, por ejemplo, mediante retrocruzamiento. En este caso, un progenitor recurrente deseado se cruza primero con un donante endogámico (el progenitor no recurrente) que lleva el gen(es) apropiado(s) para los rasgos determinados por Cry1Fa y Vip3Ab. La progenie de este cruce se vuelve a acoplar entonces al progenitor recurrente seguido por la selección en la progenie resultante para el/los rasgo(s) deseado(s) a ser transferidos del progenitor no recurrente. Después de tres, preferiblemente cuatro, más preferiblemente cinco o más generaciones de retrocruzamientos con el progenitor recurrente con selección para el/los rasgo(s) deseado(s), la progenie será heterocigótica para los loci que controlan el/los rasgo/s que se transfieren, pero será como el progenitor recurrente para la mayoría o casi todos los otros

genes (véase, por ejemplo, Poehlman & Sleper (1995) *Breeding Field Crops*, 4th Ed., 172-175; Fehr (1987) *Principles of Cultivar Development*, Vol. 1: Theory and Technique, 360 - 376).

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

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

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

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

50% de refugio Bt no Lepidóptero en el Cinturón de Algodón

Bloques

15 Internos (es decir, dentro del campo Bt)

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

Franjas en el campo

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

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

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

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

"Requisitos del IRM del barrenador del maíz:

25 -Plantar al menos el 20% de sus acres de maíz a híbridos de refugio

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

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

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

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

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

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

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

40 estructurado (generalmente 5%) de maíz no Bt que para productos de un solo rasgo (generalmente 20%).

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

45 Los porcentajes anteriores, o relaciones de refugio similares, se pueden usar para las pilas o pirámides dobles o triples objeto. Para las pilas triples con tres modos de acción contra una única plaga objetivo, un objetivo sería cero

refugio (o menos del 5% de refugio, por ejemplo). Esto es particularmente cierto para la superficie comercial - de más de 10 acres (4.05 ha), por ejemplo.

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

5 Los siguientes son ejemplos que ilustran procedimientos para poner en práctica la invención.

Estos ejemplos no deben ser interpretados como limitantes. Todos los porcentajes son en peso y todas las proporciones de la mezcla de disolventes son en volumen a menos que se indique lo contrario. Todas las temperaturas están en grados Celsius.

Ejemplos

10 Ejemplo 1 - Resumen de ejemplos

Se proporcionan ejemplos que muestran que Vip3Ab1 es activa contra larvas *Spodoptera frugiperda* naturales (gusano cogollero) y contra una cepa de *Spodoptera frugiperda* recolectada en el campo encontrada en Puerto Rico que es resistente a la toxina cristalina de *Bacillus thuringiensis* Cry1Fa. Estos datos biológicos respaldan la utilidad de Vip3Ab1 para combatir el desarrollo de la resistencia a Cry1 en insectos, ya que los insectos que desarrollan resistencia a las toxinas Cry1Fa seguirían siendo susceptibles a la toxicidad de Vip3Ab1.

15 Del mismo modo, en *Spodoptera frugiperda*, Cry1Fa radiomarcado con ¹²⁵I se une a las proteínas receptoras y la unión puede ser desplazada utilizando Cry1Fa no radiomarcado. Sin embargo, Vip3Ab1 no puede desplazar la unión de Cry1Fa ¹²⁵I de su receptor en estos experimentos. Estos resultados indican que Vip3Ab1 tiene un único sitio de unión en comparación con Cry1Fa. La capacidad de Vip3Ab1 para ejercer toxicidad frente a los insectos que son resistentes a Cry1Fa se nutre de su demostrada no interacción en el sitio donde se unen las toxinas. Además de los datos que se muestran, la naturaleza de la resistencia Cry1Fa en *Spodoptera frugiperda* se debe a la incapacidad de Cry1Fa para unirse a un BBMV preparado a partir de este insecto. La actividad biológica de larvas de *S. frugiperda* resistentes a Vip3Ab1 frente a Cry1Fa, que pierden su capacidad de unirse a Cry1Fa, apuntala también el sitio diana no interactuante de Vip3Ab1 comparado con Cry1Fa. Ejemplo 1. Purificación y procesamiento con tripsina de proteínas Cry1Ca y Vip3Ab.

20 Los genes que codifican las pro-toxinas Cry1Fa y Vip3Ab1 se expresaron en cepas de expresión de *Pseudomonas fluorescens* y las proteínas de longitud completa se aislaron como cuerpos de inclusión insolubles. Los cuerpos de inclusión lavados se solubilizaron por agitación a 37°C en tampón que contenía tampón CAPS 20 mM, pH 11, + DDT 10 mM, + 2-mercaptoetanol al 0,1%, durante 2 h. La solución se centrifugó a 27.000 x g durante 10 min a 37°C y el sobrenadante se trató con tripsina tratada con TCPK al 0,5% (p/v) (Sigma). Esta solución se incubó mezclando durante 1 h más a temperatura ambiente, se filtró y luego se cargó en una columna Pharmacia Mono Q 1010 equilibrada con CAPS 20 mM, pH 10,5. Después de lavar la columna cargada con 2 volúmenes de columna de tampón, la toxina truncada se eluyó usando un gradiente lineal de NaCl de 0 a 0,5 M en CAPS 20 mM en 15 volúmenes de columna a un caudal de 1,0 ml/min. Las proteínas Cry truncadas con tripsina purificadas se eluyeron a aproximadamente 0,2-0,3 M de NaCl. La pureza de las proteínas se comprobó mediante SDS PAGE y con visualización usando colorante azul brillante de Coomassie. En algunos casos, las fracciones combinadas de la toxina purificada se concentraron y cargaron en una columna Superose 6 (1,6 cm de diámetro, 60 cm de longitud), y se purificaron adicionalmente mediante cromatografía de exclusión por tamaños. Las fracciones que comprendían un solo pico del peso molecular monomérico se combinaron, y se concentraron, dando como resultado una preparación más homogénea al 95% para una proteína que tenía un peso molecular de aproximadamente 60.000 kDa.

35 El procesamiento de Vip3Ab1 se consiguió de una manera similar comenzando con la proteína purificada de 85 kDa de longitud completa (DIG-307) proporcionada por Monte Badger. La proteína (12 mg) se dializó en tampón de fosfato de sodio 50 mM, pH 8,4, después se procesó añadiendo 1 mg de tripsina sólida y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente. La solución se cargó en una columna de intercambio aniónico MonoQ (1 cm de diámetro, 10 cm de longitud) y se eluyó con un gradiente lineal de NaCl de 0 a 500 mM en tampón de fosfato de sodio 20 mM, pH 8,4 en 7 volúmenes de columna. La elución de la proteína se controló mediante SDS-PAGE. La banda procesada principal tenía un peso molecular de 65 kDa, como se determinó mediante SDS-PAGE usando patrones de peso molecular para su comparación.

50 Ejemplo 3 - Bioensayos con insectos.

Se analizaron proteínas purificadas para determinar la actividad insecticida en los bioensayos realizados con larvas neonatas de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) en una dieta de insectos artificiales. Los FAW resistentes a Cry1F se recolectaron de los campos de maíz Herculex I (Cry1Fa) en Puerto Rico y se llevaron al Insectario Dow AgroSciences para su crianza continua. La caracterización de esta cepa de FAW resistente se describe en el informe interno de Schlenz, et al. (Schlenz et al., 2008).

55

Los bioensayos de insectos se realizaron en bandejas de bioensayos de plástico de 128 pocillos (C-D International, Pitman, NJ). Cada pocillo contenía 0,5 ml de dieta de lepidópteros multiespecie (Southland Products, Lake Village, AR). Se suministró una alícuota de 40 µl de la proteína Cry o Vip3Ab1 purificada diluida a diversas concentraciones en CAPS 10 mM, pH 10,5, o solución de control mediante pipeta en la superficie de la dieta de 1,5 cm² de cada pocillo (26,7 µL/cm²). Dieciséis pozos fueron analizados por muestra. El control negativo fue una solución tampón en blanco que no contenía proteína. Los controles positivos incluyeron preparaciones de Cry1F. Las bandejas tratadas se mantuvieron en una campana extractora hasta que el líquido en la superficie de la dieta se evaporó o fue absorbido por la dieta.

A las pocas horas de la eclosión, las larvas individuales se recogieron con un cepillo humedecido de pelo de camello y se depositaron en la dieta tratada, una larva por pocillo. Los pocillos infestados se sellaron luego con láminas adhesivas de plástico transparente que se ventilaban para permitir el intercambio de gases (C-D International, Pitman, NJ). Las bandejas de bioensayos se mantuvieron bajo condiciones ambientales controladas (28 ° C, ~40% de HR, fotoperíodo 16:8 [L:O]). Después de 5 días, se registró el número total de insectos expuestos a cada muestra de proteína, el número de insectos muertos y el peso de los insectos supervivientes.

Ejemplo 4 - Yodación de las toxinas Cry1Fa

Se ha mostrado que la yodación de Cry1F destruye tanto la toxicidad como la capacidad de unión de esta proteína cuando se prueba frente a larvas de la oruga del tabaco y BBMV preparados a partir de estos insectos (Luo et al., 1999; Sheets y Storer, 2001). La inactivación es presumiblemente debida a la necesidad de que los residuos de tirosina sin modificar se acercan a su sitio de unión. Cuando Cry1F se yodó mediante el método de perlas de lodo, la proteína perdió la totalidad de su capacidad de exhibir características de unión específicas utilizando los BBMV de *H. virescens*. Usando NaI no radiomarcado para yodar Cry1F, empleando el método de perlas de lodo, la Cry1F yodada también perdió su actividad insecticida frente a *H. virescens*.

Estudios anteriores en el laboratorio de los inventores demostraron que Cry1Fa podía ser marcada con fluorescencia utilizando reactivos marcadores conjugados con maleimida que alquilan específicamente proteínas en los residuos de cisteína. Dado que la toxina nuclear de tripsina Cry1Fa contiene un único residuo de cisteína en la posición 205, el marcaje de la proteína con un reactivo de este tipo daría como resultado la alquilación de la proteína en un solo sitio específico. Se determinó que Cry1Fa podía estar marcada de forma fluorescente con fluoresceína-5-maleimida y que la proteína marcada conservaba la actividad insecticida. Sobre la base de la retención de la actividad biológica de la Cry1Fa marcada con cisteína fluoresceína, se determinó que también se podría radioyodar la porción de fluoresceína del marcador mediante el método de Palmer et al. (Palmer et al., 1997) y unirla a la cisteína de Cry1Fa y tener una Cry1Fa radiomarcada que retenga la actividad biológica.

Se disolvió la fluoresceína-5-maleimida a 10 mM en DMSO, luego se diluyó hasta 1 mM en PBS, como se determina por su coeficiente de extinción molar de 68.000 M⁻¹cm⁻¹. A una solución de 70 µL de PBS que contenía dos Perlas de Yodo, se añadió 0,5 mCi de Na¹²⁵I detrás del blindaje de plomo. La solución se dejó mezclar a temperatura ambiente durante 5 min, luego fueron añadidos 10 µL de la fluoresceína-5-maleimida 1 mM. Los reactivos se dejaron reaccionar durante 10 min y luego se eliminaron de las perlas de yodo. A la solución reaccionada se añadieron 2 µg de la toxina de núcleo Cry1Fa truncada con tripsina altamente purificada en PBS. La proteína se incubó a 4°C con la solución de fluoresceína-5-maleimida yodada durante 48 horas. La reacción se terminó por adición de 2-mercaptoetanol a 14 mM. La mezcla de reacción se añadió entonces a una columna de centrifugado Zebra equilibrada en CAPS 20 mM, KCl 150 mM, pH9 y se centrifugó a 1500 x g durante 2 min para separar el colorante yodado no reaccionado de la proteína. La fluoresceína-Cry1Fa radiomarcada con ¹²⁵I se contó en un contador gamma para determinar su radiactividad específica, asumiendo una recuperación del 80% de la toxina de entrada. La proteína se caracterizó también por SDS-PAGE y se visualizó mediante formación de imágenes de fósforo para validar que la radiactividad medida estaba covalentemente asociada con la proteína de Cry1Fa.

Ejemplo 5 - Preparación y fraccionamiento de BBMV solubilizados.

Los métodos estándar de cuantificación de proteínas y electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida se emplearon como se enseña, por ejemplo, en Sambrook et al. (Sambrook y Russell, 2001) y sus actualizaciones. Las larvas de *S. frugiperda* de último estadio se mantuvieron en ayunas durante la noche y luego se diseccionaron después de enfriarlas en hielo durante 15 minutos. El tejido del intestino medio se retiró de la cavidad del cuerpo, dejando atrás el intestino posterior unido al tegumento. El intestino medio se colocó en un volumen 9X de tampón de homogeneización enfriado con hielo (manitol 300 mM, EGTA 5 mM, Tris base 17 mM, pH 7,5), suplementado con un cóctel inhibidor de proteasa (Sigma-Aldrich P-2714) diluido según lo recomendado por el proveedor. El tejido se homogeneizó con 15 golpes de un homogeneizador de tejido de vidrio. Los BBMV se prepararon mediante el método de precipitación con MgCl₂ de Wolfersberger (Wolfersberger, 1993). Brevemente, se mezcló un volumen igual de una solución de MgCl₂ 24 mM en manitol 300 mM con el homogeneizado de intestino medio, se agitó durante 5 minutos y se dejó reposar en hielo durante 15 minutos. La solución se centrifugó a 2.500 x g durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante se guardó y el sedimento se suspendió en el volumen original de tampón de homogeneización diluido 0,5X y se centrifugó nuevamente. Los dos sobrenadantes se combinaron y se centrifugaron a 27.000 x g durante 30 minutos a 4°C para formar la fracción de BBMV. El sedimento se suspendió en tampón de

almacenamiento BBMV (HEPES 10 mM, KCl 130 mM, glicerol al 10%, pH 7,4) hasta una concentración de aproximadamente 3 mg/ml de proteína. La concentración de proteína se determinó utilizando BSA como estándar.

5 La actividad de la L-leucina-p-nitroanilida aminopeptidasa (una enzima marcador para la fracción de BBMV) se determinó antes de congelar las muestras. En resumen, se agregaron 50 μ l de L-leucina-p-nitroanilida (1 mg/ml en PBS) a 940 ml de Tris HCl 50 mM en una cubeta estándar. La cubeta se colocó en un espectrofotómetro Cary 50 Bio, se ajustó a cero para la lectura de absorbancia a 405 nm, y la reacción se inició mediante la adición de 10 μ l de homogeneizado de intestino medio de insecto o de preparación de BBMV de insecto. El aumento de la absorbancia a 405 nm se controló durante 5 minutos a temperatura ambiente. La actividad específica de las preparaciones de homogeneizado y BBMV se determinó en función de la cinética del aumento de la absorbancia a lo largo del tiempo durante un aumento lineal en la absorbancia por unidad de proteína total agregada al ensayo en función de la siguiente ecuación:

$$\Delta OD/(\text{min} \cdot \text{mg}) = \text{Flujo de aminopeptidasa } (\Delta OD/\text{ml} \cdot \text{min})/[\text{proteína}](\text{mg}/\text{ml})$$

15 La actividad específica de esta enzima generalmente aumentó 7 veces en comparación con la que se encuentra en la fracción inicial de homogeneizado del intestino medio. Los BBMV se dividieron en partes alícuotas en muestras de 250 μ l, se congelaron instantáneamente en N₂ líquido y se almacenaron a -80°C.

Ejemplo 6 - Electroforesis.

20 El análisis de proteínas mediante SDS-PAGE se realizó bajo condiciones de reducción (es decir, en 5% de mercaptoetanol, BME) y desnaturalización (es decir, se calentó durante 5 minutos a 90°C en presencia de SDS al 4%). Las proteínas se cargaron en los pocillos de un gel de poliacrilamida de tris-glicina del 4% al 20% (BioRad; Hercules, CA) y se separaron a 200 voltios durante 60 minutos. Las bandas de proteínas se detectaron mediante tinción con Azul Brillante de Coomassie R-250 (BioRad) durante una hora y se destiñeron con una solución de metanol al 5% en ácido acético al 7%. Se tomaron imágenes de los geles y se analizaron con un BioRad Fluoro-S Multi Imager™. Los pesos moleculares relativos de las bandas de proteína se determinaron por comparación con las movilidades de las proteínas de peso molecular conocidas observadas en una muestra de BenchMark™ Protein Ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA) cargada en un pocillo del gel.

Ejemplo 7 - Imágenes.

30 La radio-pureza de las proteínas Cry yodadas y la medición de Cry1Fa radioactivo en los ensayos de extracción se determinaron mediante SDS-PAGE y un generador de imágenes de fósforo. Brevemente, se tomaron imágenes de los geles de SDS-PAGE envolviendo los geles en una película de Mylar (12 μ m de espesor), después de la separación y fijación de la proteína, luego exponiendo el gel bajo una criba de fósforo de almacenamiento de Molecular Dynamics (35 cm x 43 cm) por lo menos durante la noche, y hasta 4 días. Las placas se desarrollaron utilizando un generador de imágenes de fósforo Molecular Dynamics Storm 820 y la imagen se analizó con el software ImageQuant™.

Ejemplo 8 - Resumen de los resultados

35 Los resultados de la mortalidad de los bioensayos de la proteína Vip3Ab1 de longitud completa probados en una variedad de dosis frente a las larvas de *S. frugiperda* naturales y resistentes a Cry1Fa se muestran en la Figura 1. Contra las larvas de *S. frugiperda* naturales, se obtuvo una mortalidad del 100% a la concentración más alta analizada (9.000 ng/cm²) y menores niveles de mortalidad a dosis más bajas. La LC-50 se estimó en aproximadamente 2.000 ng/cm². Vip3Ab1 fue altamente efectivo contra *S. frugiperda* en la inhibición del crecimiento de las larvas, con una inhibición del crecimiento superior al 95% a concentraciones de 1.000 ng/cm² y mayores. El alto nivel de inhibición del crecimiento observado para ambas larvas de *S. frugiperda* sugiere que estos insectos probablemente progresarán a la mortalidad si se los deja durante un período de tiempo más prolongado.

45 También se realizó un bioensayo para comparar la actividad biológica de Vip3Ab1 frente a *S. frugiperda* de tipo natural versus *S. frugiperda* resistente a Cry1Fa (Figura 1). El porcentaje de inhibición del crecimiento está indicado por las barras verticales y el porcentaje de mortalidad por los símbolos de diamante. La mortalidad medida 5 días después de la exposición a la toxina fue inferior al 50% para ambos tipos de insectos en todas las concentraciones analizadas. Se obtuvo una clara respuesta a la dosis para la inhibición del crecimiento. Vip3Ab1 produjo una inhibición > 95% del crecimiento larvario de larvas de *S. frugiperda* sensibles a Cry1Fa y resistentes a Cry1Fa a concentraciones superiores a 1.000 ng/cm², y resultó en una inhibición de aproximadamente 50% del crecimiento larvario de *S. frugiperda* de tipo natural a aproximadamente 40 ng/cm². Vip3Ab1 resultó en más del 50% de inhibición del crecimiento de *S. frugiperda* resistente a Cry1Fa en todas las concentraciones analizadas, hasta la más baja de 4,1 ng/cm². Por lo tanto, Vip3Ab1 tiene una alta actividad contra larvas de *S. frugiperda* resistentes a Cry1Fa.

55 Se realizaron otros duplicados de bioensayos para generar concentraciones letales medias (LC50), concentraciones de inhibición de crecimiento medio. La Tabla 2 muestra (GI50) e intervalos de confianza al 95% de *Spodoptera frugiperda* sensible a Cry1F y *Spodoptera frugiperda* resistente a Cry1F frente a Vip3 Ab1 comparado con los controles.

Tabla 2

Insecto	LC-50	IC 95%	GI-50	IC 95%
FAW	3966,3	(2150,3-9406,6)	21,9	(18,5-25,6)
Cry1Fa pos control vs. FAW	57,3	(43,6-77,4)	<13	
rFAW	499,9	(338,9-748,6)	7,7	(5,5-10,7)
Cry1Fa pos control vs. rFAW	No se observa mortalidad dentro de cada dosis analizada		No se observa inhibición del crecimiento dentro de cada dosis analizada	
Tampón (FAW, rFAW)	Sin mortalidad		Promedio WT por insecto	53,2 mg (FAW) 39,3 mg (rFAW)
Agua (FAW, rFAW)	Sin mortalidad		Promedio WT por insecto	53,1 mg (FAW) 35,9 mg (rFAW)

5 Se realizaron ensayos de unión competitiva radiomarcados para determinar si Vip3Ab1 interactúa en el mismo sitio que Cry1Fa se une en FAW. Se desarrolló un ensayo de competición para medir la capacidad de Vip3Ab para competir con la unión de Cry1Fa ¹²⁵I radiomarcada.

10 La Figura 2 muestra la formación de imágenes fosforescentes de Cry1Fa radioactiva separada por SDS-PAGE después de la unión a proteínas BBMV. En ausencia de ligandos que compitan, se puede detectar ¹²⁵I Cry1Fa asociado con la proteína BBMV. Cuando se incubaba en presencia de Cry1Fa no marcada 1.000 nM (un exceso de 500 veces en comparación con la concentración de proteína marcada utilizada en el ensayo), se detecta muy poca radioactividad correspondiente a Cry1Fa ¹²⁵I. Por lo tanto, este resultado muestra que el Cry1Fa no marcado compite efectivamente con el Cry1Fa radiomarcado para unirse a las proteínas receptoras, como sería de esperar ya que estas proteínas homólogas se unen al mismo sitio. Cuando se realiza el mismo experimento utilizando la proteína Vip3Ab1 no marcada 1.000 nM como proteína competidora, no se ve ningún cambio en el nivel de unión de Cry1Fa ¹²⁵I respecto a las proteínas BBMV de *S. frugiperda*, lo que indica que Vip3Ab1 no compite con la unión de Cry1Fa ¹²⁵I. Este resultado se interpreta para indicar que Vip3Ab1 no se enlaza en el mismo sitio que Cry1Fa.

15 Los insectos pueden desarrollar resistencia frente a la toxicidad de las proteínas Cry a través de varios mecanismos bioquímicos diferentes, pero el mecanismo más común se debe a una reducción en la capacidad de la proteína toxina Cry para unirse a su receptor específico en el intestino del insecto (Heckel et al., 2007; Tabashnik et al., 2000; Xu et al., 2005). Esto puede ser provocado por mutaciones puntuales, grandes deleciones genéticas o por otros mecanismos genéticos o bioquímicos. Cuando se investigaron las proteínas BBMV de *S. frugiperda* resistentes a Cry1Fa para comprender la naturaleza de su resistencia frente a Cry1Fa, se descubrió que los BBMV preparados a partir de insectos resistentes a Cry1Fa eran mucho menos capaces de unirse a Cry1Fa de ¹²⁵I en comparación con los insectos naturales (Figura 3). Por lo tanto, el mecanismo de resistencia frente a Cry1Fa en *S. frugiperda* se debe a un nivel muy reducido de unión de Cry1Fa a los BBMV de los insectos resistentes. Como se muestra en la Figura 2 que Vip3Ab1 no compite con la unión de Cry1Fa, esto demuestra además que Vip3Ab1 no debe verse afectado por un mecanismo de resistencia que esté involucrado con la unión de Cry1Fa a su receptor específico. Esto se deriva de los bioensayos. Por lo tanto, Vip3Ab1 complementa la actividad de Cry1Fa, ya que tiene actividad biológica contra insectos similares, pero no se une a los mismos sitios receptores que estas proteínas Cry y, por lo tanto, no se ve afectada por mecanismos de resistencia que involucrarían la reducción de la unión de la toxina Cry. Se concluye a partir de estos estudios que Vip3Ab1 es una excelente toxina para insectos que se combina con Cry1Fa como un enfoque del control de la resistencia a insectos para proporcionar actividad biológica contra insectos que pueden haber desarrollado resistencia a cualquiera de estas proteínas, y también para prevenir insectos resistentes.

Lista de referencias

35 Heckel, D.G., Gahan, L.J., Baxter, S.W., Zhao, J.Z., Shelton, A.M., Gould, F., and Tabashnik, B.E. (2007). The diversity of Bt resistance genes in species of Lepidoptera. *J Invertebr Pathol* 95, 192-197.

Luo, K., Banks, D., and Adang, M.J. (1999). Toxicity, binding, and permeability analyses of four bacillus thuringiensis cry1 delta-endotoxins using brush border membrane vesicles of *Spodoptera exigua* and *Spodoptera frugiperda*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 457-464.

40 Palmer, M., Buchkremer, M., Valeva, A., and Bhakdi, S. Cysteine-specific radioiodination of proteins with fluorescein maleimide. *Analytical Biochemistry* 253, 175-179. 1997. Ref Type: Journal (Full)

Sambrook, J. and Russell, D.W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory).

Schlenz, M. L., Babcock, J. M., and Storer, N. P. Response of Cry1F-resistant and Susceptible European Corn Borer and Fall Armyworm Colonies to Cry 1A. 105 and Cry12Ab2. DAI 0830, 2008. Indianapolis, Dow AgroSciences. Derbi Report.

- 5 Sheets, J. J. and Storer, N. P. Analysis of Cry1Ac Binding to Proteins in Brush Border Membrane Vesicles of Corn Earworm Larvae (*Heliothis zea*). Interactions with Cry1F Proteins and Its Implication for Resistance in the Field. DAI-0417, 1-26. 2001. Indianapolis, Dow AgroSciences.

Tabashnik, B.E., Liu, Y.B., Finson, N., Masson, L., and Heckel, D.G. (1997). One gene in diamondback moth confers resistance to four *Bacillus thuringiensis* toxins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 1640-1644.

- 10 Tabashnik, B.E., Malvar, T., Liu, Y.B., Finson, N., Borthakur, D., Shin, B.S., Park, S.H., Masson, L., de Maagd, R.A., and Bosch, D. (1996). Cross-resistance of the diamondback moth indicates altered interactions with domain II of *Bacillus thuringiensis* toxins. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 2839-2844.

Tabashnik, B.E., Roush, R.T., Earle, E.D., and Shelton, A.M. (2000). Resistance to Bt toxins. *Science* 287, 42.

- 15 Wolfersberger, M.G. (1993). Preparation and partial characterization of amino acid transporting brush border membrane vesicles from the larval midgut of the gypsy moth (*Lymantria dispar*). *Arch. Insect Biochem. Physiol* 24, 139-147.

Xu, X., Yu, L., and Wu, Y. (2005). Disruption of a cadherin gene associated with resistance to Cry1Ac {delta}-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* in *Helicoverpa armigera*. *Appl Environ Microbiol* 71, 948-954.

Apéndice A

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

El número de entrada es la entrada NCBI

Nombre	Nº. entrada	Autores	Año	Cepa fuente	Comentario
Cry1Aa1	AAA22353	Schnepf et al	1985	Bt kurstaki HD1	
Cry1Aa2	AAA22552	Shibano et al	1985	Bt sotto	
Cry1Aa3	BAA00257	Shimizu et al	1988	Bt aizawai IPL7	
Cry1Aa4	CAA31886	Masson et al	1989	Bt entomocidus	
Cry1Aa5	BAA04468	Udayasuriyan et al	1994	Bt Fu-2-7	
Cry1Aa6	AAA86265	Masson et al	1994	Bt kurstaki NRD-12	
Cry1Aa7	AAD46139	Osman et al	1999	Bt C12	
Cry1Aa8	I26149	Liu	1996		Solo la secuencia de ADN
Cry1Aa9	BAA77213	Nagamatsu et al	1999	Bt dendrolimus T84A1	
Cry1Aa10	AAD55382	Hou and Chen	1999	Bt kurstaki HD-1-02	
Cry1Aa11	CAA70856	Tounsi et al	1999	Bt kurstaki	
Cry1Aa12	AAP80146	Yao et al	2001	Bt Ly30	
Cry1Aa13	AAM44305	Zhong et al	2002	Bt sotto	
Cry1Aa14	AAP40639	Ren et al	2002	no publicado	
Cry1Aa15	AAY66993	Sauka et al	2005	Bt INTA Mol-12	
Cry1Ab1	AAA22330	Wabiko et al	1986	Bt berliner 1715	
Cry1Ab2	AAA22613	Thorne et al	1986	Bt kurstaki	

ES 2 700 458 T3

Cry1Ab3	AAA22561	Geiser et al	1986	Bt kurstaki HD1	
Cry1Ab4	BAA00071	Kondo et al	1987	Bt kurstaki HD1	
Cry1Ab5	CAA28405	Hofte et al	1986	Bt berliner 1715	
Cry1Ab6	AAA22420	Hefford et al	1987	Bt kurstaki NRD-12	
Cry1Ab7	CAA31620	Haider & Ellar	1988	Bt aizawai IC1	
Cry1Ab8	AAA22551	Oeda et al	1987	Bt aizawai IPL7	
Cry1Ab9	CAA38701	Chak & Jen	1993	Bt aizawai HD133	
Cry1Ab10	A29125	Fischhoff et al	1987	Bt kurstaki HD1	
Cry1Ab11	I12419	Ely & Tippett	1995	Bt A20	Solo la secuencia de ADN
Cry1Ab12	AAC64003	Silva-Werneck et al	1998	Bt kurstaki S93	
Cry1Ab13	AAN76494	Tan et al	2002	Bt c005	
Cry1Ab14	AAG16877	Meza-Basso & Theoduloz	2000	Native Chilean Bt	
Cry1Ab15	AAO13302	Li et al	2001	Bt B-Hm-16	
Cry1Ab16	AAK55546	Yu et al	2002	Bt AC-11	
Cry1Ab17	AAT46415	Huang et al	2004	Bt WB9	
Cry1Ab18	AAQ88259	Stobdan et al	2004	Bt	
Cry1Ab19	AAW31761	Zhong et al	2005	Bt X-2	
Cry1Ab20	ABB72460	Liu et al	2006	BtC008	
Cry1Ab21	ABS18384	Swiecicka et al	2007	BtIS5056	
Cry1Ab22	ABW87320	Wu and Feng	2008	BtS2491Ab	
Cry1Ab-like	AAK14336	Nagarathinam et al	2001	Bt kunthala RX24	secuencia incierta
Cry1Ab-like	AAK14337	Nagarathinam et al	2001	Bt kunthala RX28	secuencia incierta
Cry1Ab-like	AAK14338	Nagarathinam et al	2001	Bt kunthala RX27	secuencia incierta
Cry1Ab-like	ABG88858	Lin et al	2006	Bt ly4a3	secuencia insuficiente
Cry1Ac1	AAA22331	Adang et al	1985	Bt kurstaki HD73	
Cry1Ac2	AAA22338	Von Tersch et al	1991	Bt kenyae	
Cry1Ac3	CAA38098	Dardenne et al	1990	Bt BTS89A	
Cry1Ac4	AAA73077	Feitelson	1991	Bt kurstaki PS85A1	
Cry1Ac5	AAA22339	Feitelson	1992	Bt kurstaki PS81GG	
Cry1Ac6	AAA86266	Masson et al	1994	Bt kurstaki NRD-12	
Cry1Ac7	AAB46989	Herrera et al	1994	Bt kurstaki HD73	
Cry1Ac8	AAC44841	Omolo et al	1997	Bt kurstaki HD73	
Cry1Ac9	AAB49768	Gleave et al	1992	Bt DSIR732	
Cry1Ac10	CAA05505	Sun	1997	Bt kurstaki YBT-1520	
Cry1Ac11	CAA10270	Makhdoom &	1998		

ES 2 700 458 T3

		Riazuddin			
Cry1Ac12	I12418	Ely & Tippett	1995	Bt A20	Solo la secuencia de ADN
Cry1Ac13	AAD38701	Qiao et al	1999	Bt kurstaki HD1	
Cry1Ac14	AAQ06607	Yao et al	2002	Bt Ly30	
Cry1Ac15	AAN07788	Tzeng et al	2001	Bt de Taiwan	
Cry1Ac16	AAU87037	Zhao et al	2005	Bt H3	
Cry1Ac17	AAX18704	Hire et al	2005	Bt kenyae HD549	
Cry1Ac18	AAZ88347	Kaur & Allam	2005	Bt SK-729	
Cry1Ac19	ABD37053	Gao et al	2005	Bt C-33	
Cry1Ac20	ABB89046	Tan et al	2005		
Cry1Ac21	AAZ66992	Sauka et al	2005	INTA Mol-12	
Cry1Ac22	ABZ01836	Zhang & Fang	2008	Bt WO5-1	
Cry1Ac23	CAQ30431	Kashyap et al	2008	Bt	
Cry1Ac24	ABL01535	Arango et al	2008	Bt 146-158-01	
Cry1Ac25	FJ513324	Guan Peng et al	2008	Bt Tm37-6	Sin enlace NCBI Julio 09
Cry1Ac26	FJ617446	Guan Peng et al	2009	Bt Tm41-4	Sin enlace NCBI Julio 09
Cry1Ac27	FJ617447	Guan Peng et al	2009	Bt Tm44-1B	Sin enlace NCBI Julio 09
Cry1Ac28	ACM90319	Li et al	2009	Bt Q-12	
Cry1Ad1	AAA22340	Feitelson	1993	Bt aizawai PS81I	
Cry1Ad2	CAA01880	Anonymous	1995	Bt PS81RR1	
Cry1Ae1	AAA22410	Lee & Aronson	1991	Bt alesti	
Cry1Af1	AAB82749	Kang et al	1997	Bt NT0423	
Cry1Ag1	AAD46137	Mustafa	1999		
Cry1Ah1	AAQ14326	Tan et al	2000		
Cry1Ah2	ABB76664	Qi et al	2005	Bt alesti	
Cry1Ai1	AAO39719	Wang et al	2002		
Cry1A-tipo	AAK14339	Nagarathinam et al	2001	Bt kunthala nags3	secuencia incierta
Cry1Ba1	CAA29898	Brizzard & Whiteley	1988	Bt thuringiensis HD2	
Cry1Ba2	CAA65003	Soetaert	1996	Bt entomocidus HD110	
Cry1Ba3	AAK63251	Zhang et al	2001		
Cry1Ba4	AAK51084	Nathan et al	2001	Bt entomocidus HD9	
Cry1Ba5	ABO20894	Song et al	2007	Bt sfw-12	
Cry1Ba6	ABL60921	Martins et al	2006	Bt S601	

ES 2 700 458 T3

Cry1Bb1	AAA22344	Donovan et al	1994	Bt EG5847	
Cry1Bc1	CAA86568	Bishop et al	1994	Bt morrisoni	
Cry1Bd1	AAD10292	Kuo et al	2000	Bt wuhanensis HD525	
Cry1Bd2	AAM93496	Isakova et al	2002	Bt 834	
Cry1Be1	AAC32850	Payne et al	1998	Bt PS158C2	
Cry1Be2	AAQ52387	Baum et al	2003		
Cry1Be3	FJ716102	Xiaodong Sun et al	2009	Bt	Sin enlace NCBI Julio 09
Cry1Bf1	CAC50778	Arnaut et al	2001		
Cry1Bf2	AAQ52380	Baum et al	2003		
Cry1Bg1	AAO39720	Wang et al	2002		
Cry1Ca1	CAA30396	Honee et al	1988	Bt entomocidus 60.5	
Cry1Ca2	CAA31951	Sanchis et al	1989	Bt aizawai 7.29	
Cry1Ca3	AAA22343	Feitelson	1993	Bt aizawai PS81I	
Cry1Ca4	CAA01886	Van Mellaert et al	1990	Bt entomocidus HD110	
Cry1Ca5	CAA65457	Strizhov	1996	Bt aizawai 7.29	
Cry1Ca6	AAF37224	Yu et al	2000	Bt AF-2	
Cry1Ca7	AAG50438	Aixing et al	2000	Bt J8	
Cry1Ca8	AAM00264	Chen et al	2001	Bt c002	
Cry1Ca9	AAL79362	Kao et al	2003	Bt G10-01A	
Cry1Ca10	AAN16462	Lin et al	2003	Bt E05-20a	
Cry1Ca11	AAX53094	Cai et al	2005	Bt C-33	
Cry1Cb1	M97880	Kalman et al	1993	Bt galleriae HD29	Solo la secuencia de ADN
Cry1Cb2	AAG35409	Song et al	2000	Bt c001	
Cry1Cb3	ACD50894	Huang et al	2008	Bt 087	
Cry1Cb-like	AAX63901	Thammasittirong et al	2005	Bt TA476-1	secuencia insuficiente
Cry1Da1	CAA38099	Hofte et al	1990	Bt aizawai HD68	
Cry1Da2	176415	Payne & Sick	1997		Solo la secuencia de ADN
Cry1Db1	CAA80234	Lambert	1993	Bt BTS00349A	
Cry1Db2	AAK48937	Li et al	2001	Bt B-Pr-88	
Cry1Dc1	ABK35074	Lertwiriawong et al	2006	BtJC291	
Cry1Ea1	CAA37933	Visser et al	1990	Bt kenyae 4F1	
Cry1Ea2 Ea2	CAA39609	Bosse et al	1990	Bt kenyae	
Cry1Ea3	AAA22345	Feitelson	1991	Bt kenyae PS81F	

ES 2 700 458 T3

Cry1Ea4	AAD04732	Barboza-Corona et al	1998	Bt kenyae LBIT-147	
Cry1Ea5	A15535	Botterman et al	1994		Solo la secuencia de ADN
Cry1Ea6	AAL50330	Sun et al	1999	Bt YBT-032	
Cry1Ea7	AAW72936	Huehne et al	2005	Bt JC190	
Cry1Ea8	ABX11258	Huang et al	2007	Bt HZM2	
Cry1Eb1	AAA22346	Feitelson	1993	Bt aizawai PS81A2	
Cry1Fa1	AAA22348	Chambers et al	1991	Bt aizawai EG6346	
Cry1Fa2	AAA22347	Feitelson	1993	Bt aizawai PS81I	
Cry1Fb1	CAA80235	Lambert	1993	Bt BTS00349A	
Cry1Fb2	BAA25298	Masuda & Asano	1998	Bt morrisoni INA67	
Cry1Fb3	AAF21767	Song et al	1998	Bt morrisoni	
Cry1Fb4	AAC10641	Payne et al	1997		
Cry1Fb5	AAO13295	Li et al	2001	Bt B-Pr-88	
Cry1Fb6	ACD50892	Huang et al	2008	Bt 012	
Cry1Fb7	ACD50893	Huang et al	2008	Bt 087	
Cry1Ga1	CAA80233	Lambert	1993	Bt BTS0349A	
Cry1Ga 2	CAA70506	Shevelev et al	1997	Bt wuhanensis	
Cry1Gb1	AAD10291	Kuo & Chak	1999	Bt wuhanensis HD525	
Cry1Gb2	AAO13756	Li et al	2000	Bt B-Pr-88	
Cry1Gc	AAQ52381	Baum et al	2003		
Cry1Ha1	CAA80236	Lambert	1993	Bt BTS02069AA	
Cry1Hb1	AAA79694	Koo et al	1995	Bt morrisoni BF190	
Cry1H-like	AAF01213	Srifah et al	1999	Bt JC291	secuencia insuficiente
Cry1Ia1	CAA44633	Tailor et al	1992	Bt kurstaki	
Cry1Ia2	AAA22354	Gleave et al	1993	Bt kurstaki	
Cry1Ia3	AAC36999	Shin et al	1995	Bt kurstaki HD1	
Cry1Ia4	AAB00958	Kostichka et al	1996	Bt AB88	
Cry1Ia5	CAA70124	Selvapandiyan	1996	Bt 61	
Cry1Ia6	AAC26910	Zhong et al	1998	Bt kurstaki S101	
Cry1Ia7	AAM73516	Porcar et al	2000	Bt	
Cry1Ia8	AAK66742	Song et al	2001		
Cry1Ia9	AAQ08616	Yao et al	2002	Bt Ly30	
Cry1Ia10	AAP86782	Espindola et al	2003	Bt thuringiensis	
Cry1Ia11	CAC85964	Tounsi et al	2003	Bt kurstaki BNS3	
Cry1Ia12	AAV53390	Grossi de Sa et al	2005	Bt	

ES 2 700 458 T3

Cry1Ia13	ABF83202	Martins et al	2006	Bt	
Cry1Ia14	ACG63871	Liu & Guo	2008	Bt11	
Cry1Ia15	FJ617445	Guan Peng et al	2009	Bt E-1B	Sin enlace NCBI Julio 2009
Cry1Ia16	FJ617448	Guan Peng et al	2009	Bt E-1A	Sin enlace NCBI Julio 2009
Cry1Ib1	AAA82114	Shin et al	1995	Bt entomocidus BP465	
Cry1Ib2	ABW88019	Guan et al	2007	BtPP61	
Cry1Ib3	ACD75515	Liu & Guo	2008	Bt GS8	
Cry1Ic1	AAC62933	Osman et al	1998	Bt C18	
Cry1Ic2	AAE71691	Osman et al	2001		
Cry1Id1	AAD44366	Choi	2000		
Cry1Ie1	AAG43526	Song et al	2000	Bt BTC007	
Cry1If1	AAQ52382	Baum et al	2003		
Cry1I-like	AAC31094	Payne et al	1998		secuencia insuficiente
Cry1I-like	ABG88859	Lin & Fang	2006	Bt ly4a3	secuencia insuficiente
Cry1Ja1	AAA22341	Donovan	1994	Bt EG5847	
Cry1Jb1	AAA98959	Von Tersch & Gonzalez	1994	Bt EG5092	
Cry1Jc1	AAC31092	Payne et al	1998		
Cry1Jc2	AAQ52372	Baum et al	2003		
Cry1Jd1	CAC50779	Arnaut et al	2001	Bt	
Cry1Ka1	AAB00376	Koo et al	1995	Bt morrisoni BF190	
Cry1La1	AAS60191	Je et al	2004	Bt kurstaki K1	
Cry1-like	AAC31091	Payne et al	1998		secuencia insuficiente
Cry2Aa1	AAA22335	Donovan et al	1989	Bt kurstaki	
Cry2Aa2	AAA83516	Widner & Whiteley	1989	Bt kurstaki HD1	
Cry2Aa3	D86064	Sasaki et al	1997	Bt sotto	Solo la secuencia de ADN
Cry2Aa4	AAC04867	Misra et al	1998	Bt kenyae HD549	
Cry2Aa5	CAA10671	Yu & Pang	1999	Bt SL39	
Cry2Aa6	CAA10672	Yu & Pang	1999	Bt YZ71	
Cry2Aa7	CAA10670	Yu & Pang	1999	Bt CY29	
Cry2Aa8	AAO13734	Wei et al	2000	Bt Dongbei 66	
Cry2Aa9	AAO13750	Zhang et al	2000		
Cry2Aa10	AAQ04263	Yao et al	2001		
Cry2Aa11	AAQ52384	Baum et al	2003		

ES 2 700 458 T3

Cry2Aa12	ABI83671	Tan et al	2006	Bt Rpp39
Crv2Aa13	ABL01536	Arango et al	2008	But 146-158-01
Cry2Aa14	ACF04939	Hire et al	2008	Bt HD-550
Cry2Ab1	AAA22342	Widner & Whiteley	1989	Bt kurstaki HD1
Cry2Ab2	CAA39075	Dankocsik et al	1990	Bt kurstaki HD1
Cry2Ab3	AAG36762	Chen et al	1999	Bt BTC002
Cry2Ab4	AAO13296	Li et al	2001	Bt B-Pr-88
Cry2Ab5	AAQ04609	Yao et al	2001	Bt ly30
Cry2Ab6	AAP59457	Wang et al	2003	Bt WZ-7
Cry2Ab7	AAZ66347	Udayasuriyan et al	2005	Bt 14-1
Cry2Ab8	ABC95996	Huang et al	2006	Bt WB2
Cry2Ab9	ABC74968	Zhang et al	2005	Bt LLB6
Cry2Ab10	EF157306	Lin et al	2006	Bt LyD
Cry2Ab11	CAM84575	Saleem et al	2007	Bt CMBL-BT1
Cry2Ab12	ABM21764	Lin et al	2007	Bt LyD
Cry2Ab13	ACG76120	Zhu et al	2008	Bt ywc5-4
Cry2Ab14	ACG76121	Zhu et al	2008	Bt Bts
Cry2Ac1	CAA40536	Aronson	1991	Bt shanghai S1
Cry2Ac2	AAG35410	Song et al	2000	
Cry2Ac3	AAQ52385	Baum et al	2003	
Cry2Ac4	ABC95997	Huang et al	2006	Bt WB9
Cry2Ac5	ABC74969	Zhang et al	2005	
Cry2Ac6	ABC74793	Xia et al	2006	Bt wuhanensis
Cry2Ac7	CAL18690	Saleem et al	2008	Bt SBSBT-1
Cry2Ac8	CAM09325	Saleem et al	2007	Bt CMBL-BT1
Cry2Ac9	CAM09326	Saleem et al	2007	Bt CMBL-BT2
Cry2Ac10	ABN15104	Bai et al	2007	Bt QCL-1
Cry2Ac11	CAM83895	Saleem et al	2007	Bt HD29
Cry2Ac12	CAM83896	Saleem et al	2007	Bt CMBL-BT3
Cry2Ad1	AAF09583	Choi et al	1999	Bt BR30
Cry2Ad2	ABC86927	Huang et al	2006	Bt WB10
Cry2Ad3	CAK29504	Saleem et al	2006	Bt 5_2AcT(1)
Cry2Ad4	CAM32331	Saleem et al	2007	Bt CMBL-BT2
Cry2Ad5	CAO78739	Saleem et al	2007	Bt HD29
Cry2Ae1	AAQ52362	Baum et al	2003	
Cry2Af1	ABO30519	Beard et al	2007	Bt C81

ES 2 700 458 T3

Cry2Ag	ACH91610	Zhu et al	2008	Bt JF19-2	
Cry2Ah	EU939453	Zhang et al	2008	Bt	Sin enlace NCBI Julio 09
Cry2Ah2	ACL80665	Zhang et al	2009	Bt BRC-ZQL3	
Cry2Ai	FJ788388	Udayasuriyan et al	2009	Bt	Sin enlace NCBI Julio 09
Cry3Aa1	AAA22336	Herrnstadt et al	1987	Bt san diego	
Cry3Aa2	AAA22541	Sekar et al	1987	Bt tenebrionis	
Cry3Aa3	CAA68482	Hofte et al	1987		
Cry3Aa4	AAA22542	McPherson et al	1988	Bt tenebrionis	
Cry3Aa5	AAA50255	Donovan et al	1988	Bt morrisoni EG2158	
Cry3Aa6	AAC43266	Adams et al	1994	Bt tenebrionis	
Cry3Aa7	CAB41411	Zhang et al	1999	Bt 22	
Cry3Aa8	AAS79487	Gao and Cai	2004	Bt YM-03	
Cry3Aa9	AAWO659	Bulla and Candas	2004	Bt UTD-001	
Cry3Aa10	AAU29411	Chen et al	2004	Bt 886	
Cry3Aa11	AAW82872	Kurt et al	2005	Bt tenebrionis Mm2	
Cry3Aa12	ABY49136	Sezen et al	2008	Bt tenebrionis	
Cry3Ba1	CAA34983	Sick et al	1990	Bt tolworthi 43F	
Cry3Ba2	CAA00645	Peferoen et al	1990	Bt PGSI208	
Cry3Bb1	AAA22334	Donovan et al	1992	Bt EG4961	
Cry3Bb2	AAA74198	Donovan et al	1995	Bt EG5144	
Cry3Bb3	I15475	Peferoen et al	1995		Solo la secuencia de ADN
Cry3Ca1	CAA42469	Lambert et al	1992	Bt kurstaki Btl109P	
Cry4Aa1	CAA68485	Ward & Ellar	1987	Bt israelensis	
Cry4Aa2	BAA00179	Sen et al	1988	Bt israelensis HD522	
Cry4Aa3	CAD30148	Berry et al	2002	Bt israelensis	
Cry4A-like	AAY96321	Mahalakshmi et al	2005	Bt LDC-9	secuencia insuficiente
Cry4Ba1	CAA30312	Chungjatpornchai et al	1988	Bt israelensis 4Q2-72	
Cry4Ba2	CAA30114	Tungpradubkul et al	1988	Bt israelensis	
Cry4Ba3	AAA22337	Yamamoto et al	1988	Bt israelensis	
Cry4Ba4	BAA00178	Sen et al	1988	Bt israelensis HD522	
Cry4Ba5	CAD30095	Berry et al	2002	Bt israelensis	
Cry4Ba-like	ABC47686	Mahalakshmi et al	2005	Bt LDC-9	secuencia insuficiente
Cry4Ca1	EU646202	Shu et al	2008		Sin enlace NCBI Julio 09
Cry4Cb1	FJ403208	Jun & Furong	2008	Bt HS18-1	Sin enlace NCBI Julio

ES 2 700 458 T3

					09
Cry4Cb2	FJ597622	Jun & Furong	2008	Bt Ywc2-8	Sin enlace NCBI Julio 09
Cry4Cc1	FJ403207	Jun & Furong	2008	Bt MC28	Sin enlace NCBI Julio 09
Cry5Aa1	AAA67694	Narva et al	1994	Bt darmstadiensis PS17	
Cry5Ab1	AAA67693	Narva et al	1991	Bt darmstadiensis PS17	
Cry5Ac1	I34543	Payne et al	1997		Solo la secuencia de ADN
Cry5Ad1	ABQ82087	Lenane et al	2007	Bt L366	
Cry5Ba1	AAA68598	Foncerrada & Narva	1997	Bt PS86Q3	
Cry5Ba2	ABW88932	Guo et al	2008	YBT 1518	
Cry6Aa1	AAA22357	Narva et al	1993	Bt PS52A1	
Cry6Aa2	AAM46849	Bai et al	2001	YBT 1518	
Cry6Aa3	ABH03377	Jia et al	2006	Bt 96418	
Cry6Ba1	AAA22358	Narva et al	1991	Bt PS69D1	
Cry7Aa1	AAA22351	Lambert et al	1992	Bt galleriae PGSI245	
Cry7Ab1	AAA21120	Narva & Fu	1994	Bt dakota HD511	
Cry7Ab2	AAA21121	Narva & Fu	1994	Bt kumamotoensis 867	
Cry7Ab3	ABX24522	Song et al	2008	Bt WZ-9	
Cry7Ab4	EU380678	Shu et al	2008	Bt	Sin enlace NCBI Julio 09
Cry7Ab5	ABX79555	Aguirre-Arzola et al	2008	Bt monterrey GM-33	
Cry7Ab6	ACI44005	Deng et al	2008	Bt HQ122	
Cry7Ab7	FJ940776	Wang et al	2009		Sin enlace NCBI Sept 09
Cry7Ab8	GU145299	Feng Jing	2009		Sin enlace NCBI Nov 09
Cry7Ba1	ABB70817	Zhang et al	2006	Bt huazhongensis	
Cry7Ca1	ABR67863	Gao et al	2007	Bt BTH-13	
Cry7Da1	ACQ99547	Yi et al	2009	Bt LH-2	
Cry8Aa1	AAA21117	Narva & Fu	1992	Bt kumamotoensis	
Cry8Ab1	EU044830	Cheng et al	2007	Bt B-JJX	Sin enlace NCBI Julio 09
Cry8Ba1	AAA21118	Narva & Fu	1993	Bt kumamotoensis	
Cry8Bb1	CAD57542	Abad et al	2002		
Cry8Bc1	CAD57543	Abad et al	2002		
Cry8Ca1	AAA21119	Sato et al.	1995	Bt japonensis Buibui	

ES 2 700 458 T3

Cry8Ca2	AAR98783	Shu et al	2004	Bt HBF-1	
Cry8Ca3	EU625349	Du et al	2008	Bt FTL-23	Sin enlace NCBI Julio 09
Cry8Da1	BAC07226	Asano et al	2002	Bt galleriae	
Cry8Da2	BD133574	Asano et al	2002	Bt	Solo la secuencia de ADN
Cry8Da3	BD133575	Asano et al	2002	Bt	Solo la secuencia de ADN
Cry8Db1	BAF93483	Yamaguchi et al	2007	Bt BBT2-5	
Cry8Ea1	AAQ73470	Fuping et al	2003	Bt 185	
Cry8Ea2	EU047597	Liu et al	2007	Bt B-DLL	Sin enlace NCBI Julio 09
Cry8Fa1	AAT48690	Shu et al	2004	Bt 185	también AAW81032
Cry8Ga1	AAT46073	Shu et al	2004	Bt HBF-18	
Cry8Ga2	ABC42043	Yan et al	2008	Bt 145	
Cry8Ga3	FJ198072	Xiaodong et al	2008	Bt FCD114	Sin enlace NCBI Julio 09
Cry8Ha1	EF465532	Fuping et al	2006	Bt 185	Sin enlace NCBI Julio 09
Cry8Ia1	EU381044	Yan et al	2008	Bt su4	Sin enlace NCBI Julio 09
Cry8Ja1	EU625348	Du et al	2008	Bt FPT-2	Sin enlace NCBI Julio 09
Cry8Ka1	FJ422558	Quezado et al	2008		Sin enlace NCBI Julio 09
Cry8Ka2	ACN87262	Noguera & Ibarra	2009	Bt kenyae	
Cry8-like	FJ770571	Noguera & Ibarra	2009	Bt canadensis	Solo la secuencia de ADN
Cry8-like	ABS53003	Mangena et al	2007	Bt	
Cry9Aa1	CAA41122	Shevelev et al	1991	Bt galleriae	
Cry9Aa2	CAA41425	Gleave et al	1992	Bt DSIR517	
Cry9Aa3	GQ249293	Su et al	2009	Bt SC5(D2)	Sin enlace NCBI Julio 09
Cry9Aa4	GQ249294	Su et al	2009	Bt T03C001	Sin enlace NCBI Julio 09
Cry9Aa like	AAQ52376	al Baum et	2003		secuencia incompleta
Cry9Ba1	CAA52927	Shevelev et al	1993	Bt galleriae	
Cry9Bb1	AAV28716	Silva-Werneck et al	2004	Btjaponensis	
Cry9Ca1	CAA85764	Lambert et al	1996	Bt tolworthi	
Cry9Ca2	AAQ52375	Baum et al	2003		
Cry9Da1	BAA 19948	Asano	1997	Bt japonensis N141	

ES 2 700 458 T3

Cry9Da2	AAB97923	Wasano & Ohba	1998	Bt japonensis	
Cry9Da3	GQ249295	Su et al	2009	Bt T03B001	Sin enlace NCBI Julio 09
Cry9Da4	GQ249297	Su et al	2009	Bt T03B001	Sin enlace NCBI Julio 09
Cry9Db1	AAX78439	Flannagan & Abad	2005	Bt kurstaki DP1019	
Cry9Ea1	BAA34908	Midoh & Oyama	1998	Bt aizawai SSK-10	
Cry9Ea2	AAO12908	Li et al	2001	Bt B-Hm-16	
Cry9Ea3	ABM21765	Lin et al	2006	Bt lyA	
Cry9Ea4	ACE88267	Zhu et al	2008	Bt ywc5-4	
Cry9Ea5	ACF04743	Zhu et al	2008	Bts	
Cry9Ea6	ACG63872	Liu & Guo	2008	Bt 11	
Cry9Ea7	FJ380927	Sun et al	2008		Sin enlace NCBI Julio 09
Cry9Ea8	GQ249292	Su et al	2009	GQ249292	Sin enlace NCBI Julio 09
Cry9Eb1	CAC50780	Arnaut et al	2001		
Cry9Eb2	GQ249298	Su et al	2009	Bt T03B001	Sin enlace NCBI Julio 09
Cry9Ec1	AAC63366	Wasano et al	2003	Bt galleriae	
Cry9Ed1	AAX78440	Flannagan & Abad	2005	Bt kurstaki DP1019	
Cry9Ee1	GQ249296	Su et al	2009	Bt T03B001	Sin enlace NCBI Aug 09
Cry9-like	AAC63366	Wasano et al	1998	Bt galleriae	secuencia insuficiente
Cry10Aa1	AAA22614	Thorne et al	1986	Bt israelensis	
Cry10Aa2	E00614	Aran & Toomasu	1996	Bt israelensis ONR-60A	Solo la secuencia de ADN
Cry10Aa3	CAD30098	Berry et al	2002	Bt israelensis	
Cry10Alike	DQ167578	Mahalakshmi et al	2006	Bt LDC-9	secuencia incompleta
Cry11Aa1	AAA22352	Donovan et al	1988	Bt israelensis	
Cry11Aa2	AAA22611	Adams et al	1989	Bt israelensis	
Cry11Aa3	CAD30081	Berry et al	2002	Bt israelensis	
Cry11Aa-like	DQ166531	Mahalakshmi et al	2007	Bt LDC-9	secuencia incompleta
Cry11Ba1	CAA60504	Delecluse et al	1995	Bt jegathesan 367	
Cry11Bb1	AAC97162	Orduz et al	1998	Bt medellin	
Cry12Bb1	AAA22355	Narva et al	1991	Bt PS33F2	
Cry13Bb1	AAA22356	Narva et al	1992	Bt PS63B	
Cry14Aa1	AAA21516	Narva et al	1994	Bt sotto PS80JJ1	
Cry15Aa1	AAA22333	Brown & Whiteley	1992	Bt thompsoni	

ES 2 700 458 T3

Cry16Aa1	CAA63860	Barloy et al	1996	Cb malaysia CH18	
Cry17Aa1	CAA67841	Barloy et al	1998	Cb malaysia CH18	
Cry18Aa1	CAA67506	Zhang et al	1997	Paenibacillus popilliae	
Cry18Ba1	AAF89667	Patel et al	1999	Paenibacillus popilliae	
Cry18Ca1	AAF89668	Patel et al	1999	Paenibacillus popilliae	
Cry19Aa1	CAA68875	Rosso & Delecluse	1996	Bt jegathesan 367	
Cry19Ba1	BAA32397	Hwang et al	1998	Bt higo	
Cry20Aa1	AAB93476	Lee & Gill	1997	Bt fukuokaensis	
Cry20Ba1	ACS93601	Noguera & Ibarra	2009	Bt higo LBIT-976	
Cry20-like	GQ144333	Yi et al	2009	Bt Y-5	Solo la secuencia de ADN
Cry21Aa1	I32932	Payne et al	1996		Solo la secuencia de ADN
Cry21Aa2	I66477	Feitelson	1997		Solo la secuencia de ADN
Cry21Ba1	BAC06484	Sato & Asano	2002	Bt roskildiensis	
Cry22Aa1	I34547	Payne et al	1997		Solo la secuencia de ADN
Cry22Aa2	CAD43579	Isaac et al	2002	Bt	
Cry22Aa3	ACD93211	Du et al	2008	Bt FZ-4	
Cry22Ab1	AAK50456	Baum et al	2000	Bt EG4140	
Cry22Ab2	CAD43577	Isaac et al	2002	Bt	
Cry22Ba1	CAD43578	Isaac et al	2002	Bt	
Cry23Aa1	AAF76375	Donovan et al	2000	Bt	Binario con Cry37Aa1
Cry24Ba1	AAC61891	Kawalek and Gill	1998	Bt jegathesan	
Cry24Ba1	BAD32657	Ohgushi et al	2004	Bt sotto	
Cry24Ca1	CAJ43600	Beron & Salerno	2005	Bt FCC-41	
Cry25Aa1	AAC61892	Kawalek and Gill	1998	Bt jegathesan	
Cry26Aa1	AAD25075	Wojciechowska et al	1999	Bt finitimus B-1166	
Cry27Aa1	BAA82796	Saitoh	1999	Bt higo	
Cry28Aa1	AAD24189	Wojciechowska et al	1999	Bt finitimus B-1161	
AAG00235	Moore Debro	y 2000		Bt finitimus	
Cry29Aa1	CAC80985	Delecluse et al	2000	Bt medellin	
Cry30Aa1	CAC80986	Delecluse et al	2000	Bt medellin	
Cry30Ba1	BAD00052	Ito et al	2003	Bt entomocidus	
Cry30Ca1	BAD67157	Ohgushi et al	2004	Bt sotto	

ES 2 700 458 T3

Cry30Ca2	ACU24781	Sun and Park	2009	Bt jegathesan 367	
Cry30Da1	EF095955	Shu et al	2006	Bt Y41	Sin enlace NCBI Julio 09
Cry30Db1	BAE80088	Kishida et al	2006	Bt aizawai BUN1-14	
Cry30Ea1	ACC95445	Fang et al	2007	BtS2160-1	
Cry30Ea2	FJ499389	Jun et al	2008	Bt Ywc2-8	Sin enlace NCBI July09
Cry30Fa1	ACI22625	Tan et al	2008	Bt MC28	
Cry30Ga1	ACG60020	Zhu et al	2008	Bt HS 18-1	
Cry31Aa1	BAB11757	Saitoh & Mizuki	2000	Bt 84-HS-1-11	
Cry31Aa2	AAL87458	Jung and Cote	2000	Bt M15	
Cry31Aa3	BAE79808	Uemori et al	2006	Bt B0195	
Cry31Aa4	BAF32571	Yasutake et al	2006	Bt 79-25	
Cry31Aa5	BAF32572	Yasutake et al	2006	Bt 92-10	
Cry31Ab1	BAE79809	Uemori et al	2006	Bt B0195	
Cry31Ab2	BAF32570	Yasutake et al	2006	Bt 31-5	
Cry31Ac1	BAF34368	Yasutake et al	2006	Bt 87-29	
Cry32Aa1	AAG36711	Balasubramanian et al	2001	Bt yunnanensis	
Cry32Ba1	BAB78601	Takebe et al	2001	Bt	
Cry32Ca1	BAB78602	Takebe et al	2001	Bt	
Cry32Da1	BAB78603	Takebe et al	2001	Bt	
Cry33Aa1	AAL26871	Kim et al	2001	Bt dakota	
Cry34Aa1	AAG50341	Ellis et al	2001	Bt PS80JJ1	Binario con Cry35Aa1
Cry34Aa2	AAK64560	Rupar et al	2001	Bt EG5899	Binario con Cry35Aa2
Cry34Aa3	AAT29032	Schnepf et al	2004	Bt PS69Q	Binario con Cry35Aa3
Cry34Aa4	AAT29030	Schnepf et al	2004	Bt PS185GG	Binario con Cry35Aa4
Cry34Ab1	AAG41671	Moellenbeck et al	2001	Bt PS149B1	Binario con Cry35Ab1
Cry34Ac1	AAG50118	Ellis et al	2001	Bt PS167H2	Binario con Cry35Ac1
Cry34Ac2	AAK64562	Rupar et al	2001	Bt EG9444	Binario con Cry35Ab2
Cry34Ac3	AAT29029	Schnepf et al	2004	Bt KR1369	Binario con Cry35Ab3
Cry34Ba1	AAK64565	Rupar et al	2001	Bt EG4851	Binario con Cry35Ba1
Cry34Ba2	AAT29033	Schnepf et al	2004	Bt PS201L3	Binario con Cry35Ba2
Cry34Ba3	AAT29031	Schnepf et al	2004	Bt PS201HH2	Binario con Cry35Ba3
Cry35Aa1	AAG50342	Ellis et al	2001	Bt PS80JJ1	Binario con Cry34Aa1
Cry35Aa2	AAK64561	Rupar et al	2001	Bt EG5899	Binario con Cry34Aa2
Cry35Aa3	AAT29028	Schnepf et al	2004	Bt PS69Q	Binario con Cry34Aa3
Cry35Aa4	AAT29025	Schnepf et al	2004	Bt PS185GG	Binario con Cry34Aa4

ES 2 700 458 T3

Cry35Ab1	AAG41672	Moellenbeck et al	2001	Bt PS149B1	Binario con Cry34Ab1
Cry35Ab2	AAK64563	Rupar et al	2001	Bt EG9444	Binario con Cry34Ac2
Cry35Ab3	AY536891	AAT29024	2004	Bt KR1369	Binario con Cry34Ab3
Cry35Ac1	AAG50117	Ellis et al	2001	Bt PS167H2	Binario con Cry34Ac1
Cry35Ba1	AAK64566	Rupar et al	2001	Bt EG4851	Binario con Cry34Ba1
Cry35Ba2	AAT29027	Schnepf et al	2004	BtPS201L3	Binario con Cry34Ba2
Cry35Ba3	AAT29026	Schnepf et al	2004	Bt PS201HH2	Binario con Cry34Ba3
Cry36Aa1	AAK64558	Rupar et al	2001	Bt	
Cry37Aa1	AAF76376	Donovan et al	2000	Bt	Binario con Cry23Aa
Cry38Aa1	AAK64559	Rupar et al	2000	Bt	
Cry39Aa1	BAB72016	Ito et al	2001	Bt aizawai	
Cry40Aa1	BAB72018	Ito et al	2001	Bt aizawai	
Cry40Ba1	BAC77648	Ito et al	2003	Bun1-14	
Cry40Ca1	EU381045	Shu et al	2008	Bt Y41	Sin enlace NCBI July09
Cry40Da1	ACF15199	Zhang et al	2008	Bt S2096-2	
Cry41Aa1	BAD35157	Yamashita et al	2003	Bt A1462	
Cry41Ab1	BAD35163	Yamashita et al	2003	Bt A1462	
Cry42Aa1	BAD35166	Yamashita et al	2003	Bt A1462	
Cry43Aa1	BAD15301	Yokoyama Tanaka	and 2003	P. lentimorbus semadara	
Cry43Aa2	BAD95474	Nozawa	2004	P. popilliae popilliae	
Cry43Ba1	BAD15303	Yokoyama Tanaka	and 2003	P. lentimorbus semadara	
Cry43-like	BAD15305	Yokoyama Tanaka	and 2003	P. lentimorbus semadara	
Cry44Aa	BAD08532	Ito et al	2004	Bt entomocidus INA288	
Cry45Aa	BAD22577	Okumura et al	2004	Bt 89-T-34-22	
Cry46Aa	BAC79010	Ito et al	2004	Bt dakota	
Cry46Aa2	BAG68906	Ishikawa et al	2008	Bt A1470	
Cry46Ab	BAD35170	Yamagiwa et al	2004	Bt	
Cry47Aa	AAY24695	Kongsuwan et al	2005	Bt CAA890	
Cry48Aa	CAJ18351	Jones and Berry	2005	Bs IAB59	Binario con 49Aa
Cry48Aa2	CAJ86545	Jones and Berry	2006	Bs 47-6B	Binario con 49Aa2
Cry48Aa3	CAJ86546	Jones y Berry	2006	Bs NHA15b	Binario con 49Aa3
Cry48Ab	CAJ86548	Jones y Berry	2006	Bs LP1G	Binario con 49Ab1
Cry48Ab2	CAJ86549	Jones y Berry	2006	Bs 2173	Binario con 49Aa4

ES 2 700 458 T3

Cry49Aa	CAH56541	Jones y Berry	2005	Bs IAB59	Binario con 48Aa
Cry49Aa2	CAJ86541	Jones y Berry	2006	Bs 47-6B	Binario con 48Aa2
Cry49Aa3	CAJ86543	Jones y Berry	2006	BsNHA15b	Binario con 48Aa3
Cry49Aa4	CAJ86544	Jones y Berry	2006	Bs 2173	Binario con 48Ab2
Cry49Ab1	CAJ86542	Jones y Berry	2006	Bs LP1G	Binario con 48Ab1
Cry50Aa1	BAE86999	Ohgushi et al	2006	Bt sotto	
Cry51Aa1	ABI14444	Meng et al	2006	Bt F14-1	
Cry52Aa1	EF613489	Song et al	2007	Bt Y41	Sin enlace NCBI July09
Cry52Ba1	FJ361760	Jun et al	2008	Bt BM59-2	Sin enlace NCBI July09
Cry53Aa1	EF633476	Song et al	2007	Bt Y41	Sin enlace NCBI July09
Cry53Ab1	FJ361759	Jun et al	2008	Bt MC28	Sin enlace NCBI July09
Cry54Aa1	ACA52194	Tan et al	2009	Bt MC28	
Cry55Aa1	ABW88931	Guo et al	2008	YBT 1518	
Cry55Aa2	AAE33526	Bradfish et al	2000	BT Y41	
Cry56Aa1	FJ597621	Jun & Furong	2008	Bt Ywc2-8	Sin enlace NCBI July09
Cry56Aa2	GQ483512	Guan Peng et al	2009	Bt G7-1	Sin enlace NCBI Aug09
Cry57Aa1	ANC87261	Noguera & Ibarra	2009	Bt kim	
Cry58Aa1	ANC87260	Noguera & Ibarra	2009	Bt entomocidus	
Cry59Aa1	ACR43758	Noguera & Ibarra	2009	Bt kim LBIT-980	

Vip3Aa1	Vip3Aa	AAC37036	Estruch et al	1996	PNAS 93, 5389-5394	AB88	
Vip3Aa2	Vip3Ab	AAC37037	Estruch et al	1996	PNAS 93, 5389-5394	AB424	
Vip3Aa3	Vip3Ac		Estruch et al	2000	US 6137033 Oct 2000		
Vip3Aa4	PS36A Sup	AAR81079	Feitelson et al	1998	US 6656908 Dic 2003	Bt PS36A	WO9818 932(A2, A3) 7 Mayo 1998
Vip3Aa5	PS81F Sup	AAR81080	Feitelson et al	1998	US 6656908 Dic 2003	Bt PS81F	WO9818 932(A2, A3) 7 Mayo 1998
Vip3Aa6	Jav90 Sup	AAR81081	Feitelson et al	1998	US 6656908 Dic 2003	Bt	WO9818 932(A2, A3) 7 Mayo 1998

ES 2 700 458 T3

Vip3Aa7	Vip83	AAK95326	Cai et al	2001	no publicado	Bt YBT-833	
Vip3Aa8	Vip3A	AAK97481	Loguercio et al	2001	no publicado	Bt HD125	
Vip3Aa9	VipS	CAA76665	Selvapandiyan et al	2001	no publicado	Bt A13	
Vip3Aa10	Vip3V	AAN60738	Doss et al	2002	Protein Expr. Purif. 26, 82-88	Bt	
Vip3Aa11	Vip3A	AAR36859	Liu et al	2003	no publicado	Bt C9	
Vip3Aa12	Vip3A-WB5	AAM22456	Wu and Guan	2003	no publicado	Bt	
Vip3Aa13	Vip3A	AAL69542	Chen et al	2002	Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao 18, 687-692	Bt S184	
Vip3Aa14	Vip	AAQ12340	Polumetla et al	2003	no publicado	Bt tolworthi	
Vip3Aa15	Vip3A	AAP51131	Wu et al	2004	no publicado	Bt WB50	
Vip3Aa16	Vip3LB	AAW65132	Mesrati et al	2005	FEMS Micro Lett 244, 353-358	Bt	
Vip3Aa17	Jav90		Feitelson et al	1999	US 6603063 Ago 2003	Javelin 1990	WO9957 282(A2, A3) 11 Nov 1999
Vip3Aa18		AAX49395	Cai and Xiao	2005	no publicado	Bt 9816C	
Vip3Aa19	Vip3ALD	DQ241674	Liu et al	2006	no publicado	Bt AL	
Vip3Aa19	Vip3A-1	DQ539887	Hart et al	2006	no publicado		
Vip3Aa20	Vip3A-2	DQ539888	Hart et al	2006	no publicado		
Vip3Aa21	Vip	ABD84410	Panbangred	2006	no publicado	Bt aizawai	
Vip3Aa22	Vip3A-LS1	AAY41427	Lu et al	2005	no publicado	Bt LS1	
Vip3Aa23	Vip3A-LS8	AAY41428	Lu et al	2005	no publicado	Bt LS8	
Vip3Aa24		BI 880913	Song et al	2007	no publicado	Bt WZ-7	
Vip3Aa25		EF608501	Hsieh et al	2007	no publicado		
Vip3Aa26		EU294496	Shen and Guo	2007	no publicado	Bt TF9	
Vip3Aa27		EU332167	Shen and Guo	2007	no publicado	Bt 16	
Vip3Aa28		FJ494817	Xiumei Yu	2008	no publicado	Bt JF23-8	
Vip3Aa29		FJ626674	Xiumei et al	2009	no publicado	Bt JF21-1	
Vip3Aa30		FJ626675	Xiumei et al	2009	no publicado	MD2-1	

ES 2 700 458 T3

Vip3Aa31		FJ626676	Xieumei et al	2009	no publicado	JF21-1	
Vip3Aa32		FJ626677	Xieumei et al	2009	no publicado	MD2-1	
.							
Vip3Ab1	Vip3B	AAR40284	Feitelson et al	1999	US 6603063 Ago 2003	Bt KB59A4- 6	WO9957 282(A2, A3) 11Nov 1999
Vip3Ab2	Vip3D	AAV88247	Feng and Shen	2006	no publicado	Bt	
.							
Vip3Ac1	PS49C		Narva et al.	Solicitud US 2004012871 6			
.							
Vip3Ad1	PS158C2		Narva et al	.	Solicitud US 2004012871 6		
Vip3Ad2	ISP3B	CAI43276	Van Rie et al	2005	no publicado	Bt	
.							
Vip3Ae1	ISP3C	CAI43277	Van Rie et al	2005	no publicado	Bt	
.							
Vip3Af1	ISP3A	CAI43275	Van Rie et al	2005	no publicado	Bt	
Vip3Af2	Vip3C	ADN08753	Syngenta	.	WO 03/075655		
.							
Vip3Ag1	Vip3B	ADN08758	Syngenta	.	WO 02/078437		
Vip3Ag2		FJ556803	Audtho et al	2008		Bt	
.							
Vip3Ah1	Vip3S	DQ832323	Li y Shen	2006	No publicado	Bt	
.							
Vip3Ba1		AAV70653	Rang et al	2004	no publicado		
.							
Vip3Bb1	Vip3Z	ADN08760	Syngenta	.	WO 03/075655		
Vip3Bb2		EF439819	Akhurst et al	2007			

Listado de secuencias

<110> Dow AGROSCIENCES LLC

<120> Uso combinado de CRY1FA y VIP3AB1 para reprimir insectos resistentes

5 <130> DAS-P0177-US

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

ES 2 700 458 T3

<210> 1
 <211> 605
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Cry1Fa

<400> 1
 Met Glu Asn Asn Ile Gln Asn Gln Cys Val Pro Tyr Asn Cys Leu Asn
 1 5 10 15
 Asn Pro Glu Val Glu Ile Leu Asn Glu Glu Arg Ser Thr Gly Arg Leu
 20 25 30
 Pro Leu Asp Ile Ser Leu Ser Leu Thr Arg Phe Leu Leu Ser Glu Phe
 35 40 45
 Val Pro Gly Val Gly Val Ala Phe Gly Leu Phe Asp Leu Ile Trp Gly
 50 55 60
 Phe Ile Thr Pro Ser Asp Trp Ser Leu Phe Leu Leu Gln Ile Glu Gln
 65 70 75 80
 Leu Ile Glu Gln Arg Ile Glu Thr Leu Glu Arg Asn Arg Ala Ile Thr
 85 90 95
 Thr Leu Arg Gly Leu Ala Asp Ser Tyr Glu Ile Tyr Ile Glu Ala Leu
 100 105 110
 Arg Glu Trp Glu Ala Asn Pro Asn Asn Ala Gln Leu Arg Glu Asp Val
 115 120 125
 Arg Ile Arg Phe Ala Asn Thr Asp Asp Ala Leu Ile Thr Ala Ile Asn
 130 135 140
 Asn Phe Thr Leu Thr Ser Phe Glu Ile Pro Leu Leu Ser Val Tyr Val
 145 150 155 160
 Gln Ala Ala Asn Leu His Leu Ser Leu Leu Arg Asp Ala Val Ser Phe
 165 170 175

ES 2 700 458 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 700 458 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

Tyr Ala Thr Ile Asn Thr Ala Phe Thr Phe Pro Met Ser Gln Ser Ser
 565 570 575

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

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

<210> 2

<211> 788

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Vip3Ab1

<400> 2

Met Ala Asn Met Asn Asn Thr Lys Leu Asn Ala Arg Ala Leu Pro Ser
 1 5 10 15

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

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

10

ES 2 700 458 T3

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

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

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

Gln Asn Gln Val Leu Asn Asp Val Asn Asn Lys Leu Asp Ala Ile Asn
 100 105 110

Thr Met Leu His Ile Tyr Leu Pro Lys Ile Thr Ser Met Leu Ser Asp
 115 120 125

Val Met Lys Gln Asn Tyr Ala Leu Ser Leu Gln Val Glu Tyr Leu Ser
 130 135 140

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

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

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

Thr Thr Leu Lys Val Lys Lys Asp Ser Ser Pro Ala Asp Ile Leu Asp
 195 200 205

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

Val Asp Gly Phe Glu Phe Tyr Leu Asn Thr Phe His Asp Val Met Val
 225 230 235 240

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

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

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

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

ES 2 700 458 T3

Thr Ser Ile Met Asn Glu His Leu Asn Lys Glu Lys Glu Glu Phe Arg
305 310 315 320

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

Ala Lys Val Lys Gly Ser Asp Glu Asp Ala Lys Met Ile Val Glu Ala
340 345 350

Lys Pro Gly His Ala Leu Val Gly Phe Glu Ile Ser Asn Asp Ser Met
355 360 365

Thr Val Leu Lys Val Tyr Glu Ala Lys Leu Lys Gln Asn Tyr Gln Val
370 375 380

Asp Lys Asp Ser Leu Ser Glu Val Ile Tyr Ser Asp Met Asp Lys Leu
385 390 395 400

Leu Cys Pro Asp Gln Ser Glu Gln Ile Tyr Tyr Thr Asn Asn Ile Val
405 410 415

Phe Pro Asn Glu Tyr Val Ile Thr Lys Ile Asp Phe Thr Lys Lys Met
420 425 430

Lys Thr Leu Arg Tyr Glu Val Thr Ala Asn Ser Tyr Asp Ser Ser Thr
435 440 445

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

Tyr Arg Thr Leu Ser Ala Asn Asn Asp Gly Val Tyr Met Pro Leu Gly
465 470 475 480

Val Ile Ser Glu Thr Phe Leu Thr Pro Ile Asn Gly Phe Gly Leu Gln
485 490 495

Ala Asp Glu Asn Ser Arg Leu Ile Thr Leu Thr Cys Lys Ser Tyr Leu
500 505 510

Arg Glu Leu Leu Leu Ala Thr Asp Leu Ser Asn Lys Glu Thr Lys Leu
515 520 525

Ile Val Pro Pro Ile Ser Phe Ile Ser Asn Ile Val Glu Asn Gly Asn
530 535 540

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

Tyr Val Asp His Thr Gly Gly Ile Asn Gly Thr Lys Val Leu Tyr Val

REIVINDICACIONES

1. Una planta transgénica que comprende y expresa ADN que codifica una proteína insecticida Vip3Ab y ADN que codifica una proteína insecticida Cry1F, comprendiendo y expresando además el ADN que codifica una tercera proteína insecticida, seleccionándose dicha tercera proteína del grupo que consiste en Cry1C, Cry1D y Cry1Be.
- 5 2. La semilla de una planta transgénica que comprende y expresa el ADN que codifica una proteína insecticida Vip3Ab y el ADN que codifica una proteína Cry1F, que además comprende y expresa un ADN que codifica una tercera proteína insecticida, seleccionándose dicha tercera proteína del grupo que consiste en Cry1C, Cry1D y Cry1Be.
- 10 3. Una mezcla de semillas que comprende semillas de refugio de plantas de refugio no Bt, y una pluralidad de semillas de la reivindicación 2, en donde dichas semillas de refugio no comprenden el 40% de todas las semillas en la mezcla.
- 15 4. Una composición para controlar plagas de lepidópteros que comprende una célula hospedadora transformada para expresar cantidades efectivas de una proteína que contiene toxina central Cry1F y una proteína Vip3Ab, que además comprende una tercera proteína insecticida, en donde la tercera proteína se selecciona del grupo que consiste en Cry1C, Cry1D, y Cry1Be,
en donde dicha proteína que contiene la toxina central de Cry1F contiene la porción de toxina N-terminal, insecticida activa, de Cry1F.
- 20 5. La planta transgénica de la reivindicación 1, en donde dicha planta produce una cuarta proteína y una quinta proteína seleccionada del grupo que consiste en Cry2A, Cry1I, Cry1Ab y DIG-3.
6. La planta transgénica de la reivindicación 1, en donde dicha planta produce una cuarta proteína seleccionada del grupo que consiste en Cry2A, Cry1I, Cry1Ab y DIG-3.
7. La planta transgénica de la reivindicación 6, en la que dicha tercera proteína es una proteína Cry1Be.
- 25 8. Una mezcla de semillas que comprende semillas de refugio de plantas de refugio que no son Bt, y una pluralidad de semillas de una planta de la reivindicación 7, que comprende y expresa el ADN que codifica una proteína insecticida Vip3Ab y el ADN que codifica una proteína Cry1F, que comprende y expresa además ADN que codifica una proteína insecticida Cry1Be y que produce una cuarta proteína seleccionada del grupo que consiste en Cry2A, Cry1I, Cry1Ab y DIG-3, en donde dichas semillas de refugio comprenden menos del 10% de todas las semillas en la mezcla.
- 30 9. Una planta de cualquiera de las reivindicaciones 1 y 5 a 7, en la que dicha planta se selecciona del grupo que consiste en maíz, soja y algodón.
10. Una célula vegetal de una planta de cualquiera de las reivindicaciones 1 y 5 a 7, en la que dicha célula vegetal comprende y expresa dicho ADN que codifica dicha proteína insecticida Cry1F y dicho ADN que codifica dicha proteína insecticida Vip3Ab, en donde dicha proteína insecticida Cry1F es al menos el 99% idéntica a la SEQ ID. NO: 1, y dicha proteína insecticida Vip3Ab es al menos un 99% idéntica a la SEQ ID NO: 2.
- 35 11. Una planta de cualquiera de las reivindicaciones 1 y 5 a 7, en la que dicha proteína insecticida Cry1F comprende la SEQ ID NO: 1 y dicha proteína insecticida Vip3Ab comprende la SEQ ID NO: 2.

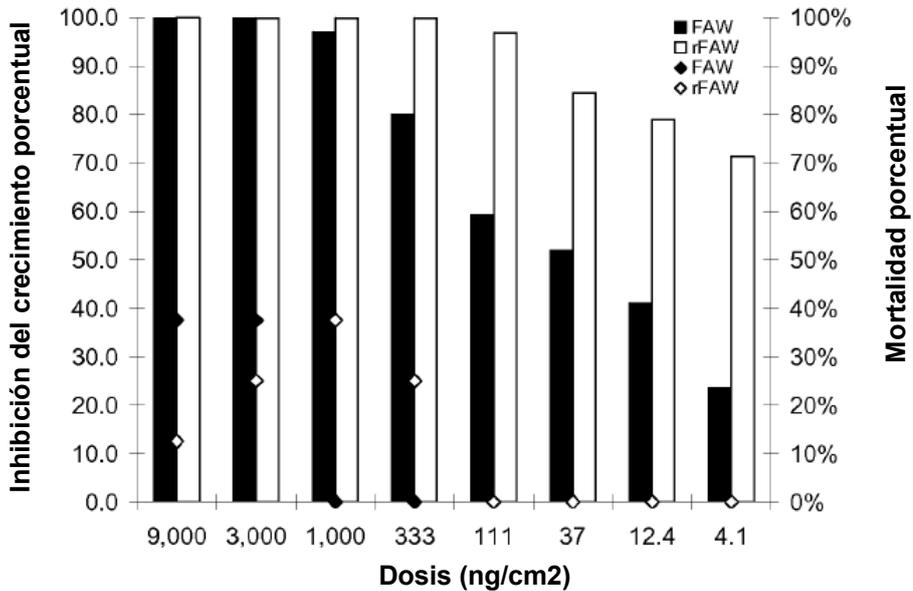


Figura 1. Dosis respuestas de la inhibición del crecimiento (barras) y mortalidad (◆) para Vip3Ab1 de longitud completa frente a *Spodoptera frugiperda* natural (J.E. Smith), (FAW) y *Spodoptera frugiperda* tipo resistente a Cry1Fa (J.E. Smith), (rFAW). La inhibición del crecimiento porcentual se basa en la comparación del peso promedio de 8 larvas tratadas con tampón sólo frente al peso de las larvas expuestas a la toxina durante 5 días.

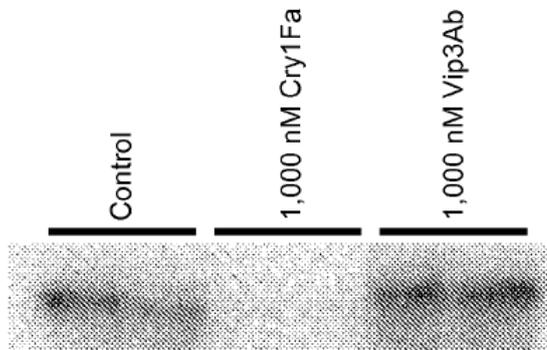


Figura 2. Fósforo-imagen de ¹²⁵I Cry1Fa unido a los BBMVs de *S. frugiperda* después de separarse mediante SDS-PAGE. Las muestras se realizan por duplicado. La concentración de ¹²⁵I Cry1Fa fue 1 nM. El control representa el nivel de unión de ¹²⁵I Cry1Fa frente a los BBMVs en ausencia de cualquier ligando competitivo. Cry1Fa 1.000 nM representa el nivel de unión de ¹²⁵I Cry1Fa frente a los BBMVs en presencia de Cry1Fa no radiomarcado 1.000 nM, mostrando el desplazamiento completo del ligando radiomarcado a partir de la proteína BBMVs. Vip3Ab1 1.000 nM representa el nivel de unión de ¹²⁵I Cry1Fa frente a los BBMVs en presencia de Vip3Ab1 no radiomarcado 1.000 nM, mostrando que esta proteína no tiene la capacidad de desplazar ¹²⁵I Cry1Fa de los BBMVs de *S. frugiperda* incluso cuando se añade a 1.000 veces la concentración del ligando radiomarcado.

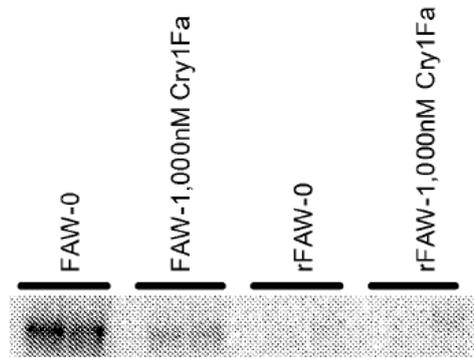


Figura 3. Fósforo-imagen de ¹²⁵I Cry1Fa unido a los BBMV de *S. frugiperda* natural (FAW) o *S. frugiperda* resistente a Cry1Fa (rFAW) después de separarse mediante SDS-PAGE. Las muestras se realizan por duplicado. La concentración de ¹²⁵I Cry1Fa fue 2,5 nM. El FAW-0 representa el nivel de unión de ¹²⁵I Cry1Fa frente a los BBMV de *S. frugiperda* natural en ausencia de cualquier ligando competitivo. Cry1Fa FAW-1.000 nM representa el nivel de unión de ¹²⁵I Cry1Fa frente a los BBMV de *S. frugiperda* natural en presencia de Cry1Fa no radiomarcado 1.000 nM, mostrando el desplazamiento del ligando radiomarcado a partir de la proteína BBMV. El rFAW-0 representa el nivel de unión de ¹²⁵I Cry1Fa frente a los BBMV de *S. frugiperda* resistente a Cry1Fa en ausencia de cualquier ligando competitivo. Nótese la ausencia de unión de ¹²⁵I Cry1Fa frente a los BBMV de FAW resistente. rFAW-Cry1Fa 1.000 nM representa el nivel de unión de ¹²⁵I Cry1Fa frente a los BBMV en presencia de Vip3Ab1 no radiomarcado 1.000 nM, mostrando de nuevo la incapacidad de unir ¹²⁵I Cry1Fa a los BBMV a partir de *S. frugiperda* resistente a Cry1Fa.