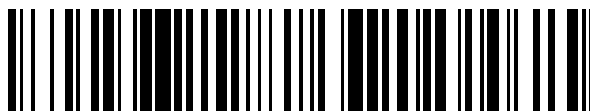


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 704 652**

51 Int. Cl.:

C12N 15/82 (2006.01)

A01H 5/00 (2008.01)

A01H 5/10 (2008.01)

A01N 63/02 (2006.01)

A01N 65/00 (2009.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.12.2010** **PCT/US2010/060815**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.06.2011** **WO11075587**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.12.2010** **E 10838259 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.11.2018** **EP 2512221**

54 Título: **Uso combinado de las proteínas de Cry1Da y Cry1Fa para gestionar la resistencia de los insectos**

30 Prioridad:

16.12.2009 US 284252 P

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

19.03.2019

73 Titular/es:

DOW AGROSCIENCES, LLC (100.0%)
9330 Zionsville Road
Indianapolis, Indiana 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

ES 2 704 652 T3

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

DESCRIPCIÓN

Uso combinado de las proteínas de Cry1Da y Cry1Fa para gestionar la resistencia de los insectos.

Antecedentes de la invención

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.

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.

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).

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 implementación de proteínas a una dosis alta en combinación con un refugio, y la alternancia, o el co-implementación, con diferentes toxinas (McGaughey et al. (1998), "B.t. Resistance Management", *Nature Biotechnol.* 16:144 - 146).

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.

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.

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.

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™.

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/). Véase el Apéndice A adjunto. Actualmente, hay cerca de 60 grupos principales de toxinas "Cry" (Cry1-Cry59), con toxinas Cyt adicionales y toxinas VIP y similares. 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).

5 Breve compendio 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 Cry1Da. Como cualquier experto en la técnica reconocerá gracias a esta descripción, las plantas que expresan estas dos proteínas insecticidas, 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 Cry1Fa y Cry1Da no compiten entre sí por los receptores de unión en el intestino de FAW.

La presente invención también se refiere en parte a las pilas triple o "pirámides" de tres toxinas, o más, siendo Cry1Fa y Cry1Da el par de bases.

La invención objeto también se relaciona en parte con pilas triples o "pirámides" de tres toxinas (o más), siendo las toxinas Cry1Fa y Cry1Da el par base. Una pirámide preferida proporciona al menos proteínas que proporcionan actividad no cruzada frente a dos plagas el FAW y el ECB (por sus siglas en inglés, el taladro del maíz; Ostrinia nubilalis): Cry1Fa más Cry1Da más una o más toxinas anti-ECB, tales como Cry1Ab. En algunas realizaciones preferidas, las toxinas seleccionadas tienen tres modos separados de acción contra FAW. Estas combinaciones piramidales preferidas de "tres modos de acción" son Cry1Fa más Cry1Da, más otra toxina/gen seleccionado del grupo que consiste en Vip3Ab, Cry1C, Cry1Be y Cry1E. Las plantas (y los acres plantados con tales plantas) que producen estas tres toxinas están incluidas dentro del alcance de la presente invención. También pueden añadirse otras toxinas/genes, pero estas pilas triples particulares, de acuerdo con la presente invención, proporcionarían, ventajosa y sorprendentemente, tres modos de acción contra FAW. Esto puede ayudar a reducir o eliminar el requisito de superficie de refugio. La presente invención también se refiere de forma general al uso de tres proteínas insecticidas (proteínas Cry en algunas realizaciones preferidas) que no compite con otras contra una plaga objeto individual.

Por lo tanto, Cry1Da podría usarse como en la combinación de 3 genes para el maíz y otras plantas (algodón y soja, por ejemplo). Un gen de Cry1Da podría combinarse, por ejemplo, en un producto Cry1Fa tal como Herculex®, SmartStax™, y WideStrike™. De acuerdo con esto, el uso de Cry1Da podría ser significativo en la reducción de la presión de selección en otras proteínas comercializadas.

Breve descripción de las figuras

Figura 1: Daño (porcentaje medio de daño de hoja + SEM) a segmentos de hojas de maíz infestados con FAW (barras azules) o rFAW (barras púrpuras). Todos los tratamientos precedidos por los números "5163" son segmentos foliares de plantas transformadas con una construcción que contiene Cry1Da. Las plantas en las que no se detectó la expresión de Cry1Da se agrupan en el extremo izquierdo del gráfico. Las plantas en las que se detectó la expresión de Cry1Da se agrupan en el centro del gráfico. Los controles no transgénicos (es decir, negativos) están en el extremo derecho del gráfico y se denominan "B104", "Hill" e "Isolina". Una endogámica comercial que contiene Cry1Fa es el primer tratamiento a la derecha (denominado "Herculex I") y es el mismo fondo genético que el control no transgénico denominado "Isolina".

Figura 2: Competición por la unión a BBMV de Spodoptera frugiperda por la toxina nuclear de Cry1Fa, la toxina nuclear de Cry1Da, y la proteína de la toxina nuclear de Cry1Da denominada 1251

Descripción detallada de la invención

Como se informó en el presente documento, una toxina Cry1Da producida en maíz transgénico (y otras plantas; algodón y soja, por ejemplo) es muy eficaz en el control del gusano cogollero (FAW; Spodoptera frugiperda) que ha desarrollado resistencia frente 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) frente a Cry1Da.

La presente invención también se refiere en parte al sorprendente descubrimiento de que la toxina Cry1Da 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.

La presente invención incluye el uso de la toxina Cry1Da para proteger el maíz y otras especies vegetales de importancia económica 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 para prevenir o mitigar el desarrollo de la resistencia por parte del gusano cogollero frente a Cry1Fa y/o Cry1Da.

La presente invención proporciona el uso de una composición para controlar plagas de lepidópteros que comprende células que producen una proteína que contiene la toxina nuclear Cry1Fa y una proteína que contiene la toxina nuclear Cry1Da.

La invención comprende además una planta transgénica o célula de planta transformada para producir tanto una proteína que contiene la toxina nuclear Cry1Fa y una proteína que contiene la toxina nuclear Cry1Da, en donde el polinucleótido cry1Fa o el polinucleótido cry1Da 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 pueden comprender el uso del codón para la expresión mejorada en una planta.

Se pretende además que la invención proporcione un método de control de plagas lepidópteras que comprende poner en contacto dichas plagas o el medio ambiente de dichas plagas con una cantidad eficaz de una composición que contiene una proteína que contiene la toxina nuclear de Cry1Fa y contiene además una proteína que contiene la toxina nuclear Cry1Da.

La descripción comprende una planta de maíz que comprende un gen expresable en planta que codifica una proteína que contiene la toxina nuclear de Cry1Da y un gen expresable en planta que codifica una proteína que contiene la toxina nuclear de Cry1Fa y una semilla de dicha planta.

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 Cry1Da 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.

Receptores de insectos. Como se describe en los Ejemplos, los estudios de unión de receptores competitivos usando la proteína de la toxina nuclear de Cry1Da radiomarcada muestran que la proteína de la toxina nuclear de Cry1Fa no compete por el sitio de unión de alta afinidad en tejidos de insecto FAW a los que Cry1Da se une. Estos resultados indican que la combinación de las proteínas Cry1Fa y Cry1Da 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 Cry1Da), 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 y en otras partes, se cree que la coproducción (apilamiento) de las proteínas Cry1Ca y Cry1Fa puede usarse para producir una pila IRM de dosis alta para FAW. Se pueden agregar otras proteínas a esta combinación para ampliar el espectro de control del insecto. Por ejemplo, en el maíz, la adición de Cry1Ab crearía una pirámide IRM para controlar el taladro del maíz.

Otra opción de implementación sería utilizar las proteínas Cry1Fa y Cry1Da 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 implementación de la presente invención sería utilizar uno, dos, tres (o más) de estas 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 Cry1Da el par de bases.

Otra opción de implementación sería usar las proteínas Cry1Fa y Cry1Da en combinación con otra tercera toxina/gen, y usar esta pila triple para mitigar el desarrollo de resistencia en FAW a cualquiera de estas toxinas. Por lo tanto, otra opción de implementación de la presente invención sería utilizar una, dos o tres (o más) de estas proteínas en regiones de cultivo donde FAW puede desarrollar poblaciones resistentes. En consecuencia, la presente invención también se relaciona en parte con las pilas triples o "pirámides" de tres (o más) toxinas, siendo las toxinas Cry1Fa y Cry1Da el par de bases. Una pirámide preferida proporciona al menos dos proteínas que proporcionan una actividad no resistente a los cruces contra dos plagas: el FAW y el BCE (taladro del maíz; *Ostrinia nubilalis*): Cry1Fa más Cry1Da más uno o más toxinas ECB como Cry1Ab (véase el documento US 2008 0311096), ya que Cry1F es activa contra ambos insectos. Otras toxinas del BCE incluyen Cry1Be (véase el documento USSN 61/284.290; presentada el 16 de diciembre de 2009), CryII (véase el documento USSN 61/284.278; presentada el 16 de diciembre de 2009), Cry2Aa (véase el documento USSN 61/284.278; archivada el 16 de diciembre de 2009) y DIG-3 (véase el documento US 2010 00269223). En algunas realizaciones de pirámide preferidas, las toxinas seleccionadas tienen tres modos de acción separados contra FAW. Estas combinaciones de pirámides con "tres modos de acción" preferidas son Cry1Fa más Cry1D más otra toxina/gen seleccionado del grupo que consiste en Vip3Ab, Cry1C (véase el documento USSN 61/284.281; presentada el 16 de diciembre de 2009), Cry1Be y Cry1E (véase el documento USSN 61/284.278; presentada el 16 de diciembre de 2009). Las plantas (y la superficie sembrada con tales plantas) que producen estas tres toxinas están incluidas dentro del alcance de la presente invención. También se pueden agregar toxinas/genes adicionales, pero estas pilas triples particulares, según la presente invención, proporcionarían de manera ventajosa y sorprendente tres modos de acción contra FAW. Esto puede ayudar a reducir o eliminar el requisito de la superficie de refugio. Un campo así plantado de más de 10 acres se incluye así dentro de la invención objeto.

Por lo tanto, Cry1Da podría usarse como en la combinación de 3 genes para el maíz que actualmente se encuentra en el Desarrollo I del nuevo proceso de desarrollo de rasgos. Cry1Fa se encuentra en los productos Herculex®, SmartStax™ y WidesStrike™. Por consiguiente, el uso de Cry1Da podría ser significativo para reducir la presión de selección en otras proteínas comercializadas.

- 5 Otras toxinas Vip3, por ejemplo, se enumeran en el Apéndice A adjunto. Esos números de GENBANK también se pueden usar para obtener las secuencias de cualquiera de los genes y proteínas descritos o mencionados en este documento.

- La patente de EE.UU. nº. 5.188.960 y la patente de EE.UU. nº. 5.827.514 describen proteínas que contienen la toxina nuclear Cry1Fa convenientes para su uso al llevar a cabo la presente invención. La patente EE.UU. nº. 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 presente invención.

- 15 Las combinaciones de las toxinas descritas en la presente invención se pueden usar para controlar plagas de lepidópteros. Los lepidópteros adultos, por ejemplo, las mariposas y polillas, se alimentan principalmente del néctar de las flores y son un importante efector de polinización. Casi todas las larvas de lepidópteros, es decir, las orugas, se alimentan de plantas y muchas son plagas graves. Las orugas se alimentan del follaje, o dentro de éste, o en las raíces o el tallo de las plantas, privando a la planta de nutrientes y, a menudo, destruyendo la estructura física de la planta. Además, las orugas se alimentan de 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 larvianas.

- 20 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 desde el punto de vista insecticida, de una toxina Bt se denomina toxina "nuclear". La transición desde el segmento de la toxina nuclear al segmento de protoxina heteróloga puede producirse aproximadamente en la unión toxina/protoxina o, en alternativa, puede conservarse una porción de la protoxina nativa (que se extiende más allá de la porción de toxina nuclear), ocurriendo la transición a la protoxina heteróloga posteriormente.

Como ejemplo, una toxina quimérica es una porción de toxina de nuclear completa de Cry1Ca (aproximadamente los primeros 600 aminoácidos) y/o una protoxina heteróloga (desde el aminoácido 602 al extremo C).

- 30 La porción de una toxina quimérica que comprende la protoxina se deriva de una toxina proteica Cry1Ab. Como segundo ejemplo, una segunda toxina quimérica tiene la porción completa de la toxina nuclear de Cry1Da (aminoácidos 1 a 619) y una protoxina heteróloga (aminoácidos 620 al extremo C-terminal). La porción de una toxina quimérica que comprende la protoxina se deriva de una toxina de la proteína Cry1Ab.

- 35 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 Cry1Da y Cry1Fa tienen una longitud de aproximadamente 1150 a aproximadamente 1200 aminoácidos. La transición de la porción de toxina del núcleo a la porción de protoxina típicamente ocurrirá entre aproximadamente el 50% y aproximadamente el 60% de la toxina de longitud completa. La toxina quimérica de la presente invención incluirá la extensión completa de esta porción de toxina nuclear N-terminal. De este modo, la toxina quimérica comprenderá al menos aproximadamente el 50% de toda la longitud de la proteína de la toxina de Cry1Fa Bt o al menos aproximadamente el 50% de toda la longitud de la proteína de la toxina de Cry1Da Bt. Ésta tendrá 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.

- 45 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 objetivo, como las toxinas reivindicadas.

- 50 Tal como se usa en el presente documento, los límites representan aproximadamente el 95% (Cry1Fa y Da), 78% (Cry1F y Cry1D), y 45% (Cry1) de identidad de secuencia, por "Revision of the Nomenclature for the Bacillus thuringiensis Pesticidal Crystal Proteins", N. Crickmore, D.R. Zeigler, J. Feitelson, E. Schnepf, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum y D.H. Dean. Microbiology and Molecular Biology Reviews (1998) Vol. 62: 807-813. Estos cortes también se pueden aplicar a las toxinas del núcleo solamente (para las toxinas Cry1F y Cry1D).

Es 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 las 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. Pueden construirse variaciones de genes 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 desde los extremos de estos genes. Los genes que codifican fragmentos activos también se pueden obtener usando una variedad de enzimas de restricción. Pueden usarse proteasas para obtener directamente fragmentos activos de estas toxinas proteicas.

Se describen en este documento 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 experta en la técnica crear estas secuencias de ADN alternativas que codifican las mismas toxinas, o esencialmente las mismas. 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 la 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 tengan 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 de la presente invención. Los segmentos de nucleótidos que se utilizan como sondas de acuerdo con la invención se pueden sintetizar usando un sintetizador de ADN y procedimientos estándar. Estas secuencias de nucleótidos también se pueden usar como cebadores de PCR para amplificar genes de la presente invención.

Toxinas variantes. Ciertas toxinas 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 están 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.

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

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

Huéspedes recombinantes. Los genes que codifican las toxinas de la presente invención se pueden introducir en una amplia variedad de huéspedes microbianos o vegetales. La expresión del gen de la toxina da como resultado, directa o indirectamente, 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 de la presente invención. Otros organismos huésped también pueden ser transformados con uno o ambos genes de la toxina

usados entonces para lograr el efecto sinérgico. Con huéspedes microbianos adecuados, por ejemplo, *Pseudomonas*, los microbios se pueden aplicar al sitio de la plaga, donde proliferarán y se ingerirán. El resultado es el control de la plaga. Alternativamente, el microbio que aloja el gen de la toxina puede ser tratado bajo condiciones que prolongan la actividad de la toxina y estabilizan la célula. La célula tratada, que retiene la actividad tóxica, puede aplicarse entonces al medio ambiente de la plaga objetivo.

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 naturales, proporcionar un mantenimiento estable y la expresión del gen que expresa el plaguicida polipeptídico, y, deseablemente, proporcionar una mejor protección del plaguicida frente a la degradación e inactivación del medio ambiente.

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

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 objetivo. Las células huésped adecuadas pueden incluir procariotas o eucariotas, estando normalmente limitadas a aquellas células que no producen sustancias tóxicas para organismos superiores, tales como mamíferos. Sin embargo, podrían utilizarse organismos que producen sustancias tóxicas para organismos superiores, 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 procariotas y los eucariotas inferiores, tales como los hongos.

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

El tratamiento de la célula microbiana, por ejemplo, un microbio que contiene el gen 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 los agentes halógenos, particularmente los halógenos del número atómico 17-80. Más particularmente, se puede usar yodo en condiciones suaves y durante un tiempo suficiente para conseguir los resultados deseados. Otras técnicas adecuadas incluyen el tratamiento con aldehídos, tales como glutaraldehído; anti-infecciosos, tales como cloruro de zefirano y cloruro de cetilpiridinio; alcoholes, tales como isopropilo y etanol; varios fijadores histológicos, tales como lugol yodo, fijador de Bouin, diversos ácidos y fijador de Helly (véase: Humason, Gretchen L., *Animal Tissue Techniques*, W. H. Freeman and Company, 1967); o una combinación de agentes físicos (calor) y químicos que preservan y prolongan la actividad de la toxina producida en la célula cuando la célula se administra al medio huésped. Los ejemplos de medios físicos son la 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 frente 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 la plaga objetivo. 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 plaguicida, 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.

10 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 recuperadas de acuerdo con los procedimientos convencionales. Alternativamente, las células pueden ser tratadas antes de la recolección.

15 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. Se pueden aplicar al suelo 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. 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 aditivos de adherencia, 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 tendrán 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.

40 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 ADN-T 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 ADN-T. El plásmido Ti o Ri también comprende la región vir necesaria para la transferencia del ADN-T. 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 ADN-T a la célula de planta. Puede contener ADN-T 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 tengan los mismos factores hereditarios transformados u otros factores hereditarios. Los individuos híbridos resultantes tienen las propiedades fenotípicas correspondientes.

Las plantas pueden ser transformadas con genes en los que se ha optimizado el uso de codones para plantas. Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos Nº 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 Nº 6.218.188 y la Patente de Estados Unidos Nº 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 Cry1Da.

La transferencia (o introgresión) del rasgo o de los rasgos determinados por Cry1Fa y Cry1Da en líneas de maíz endogámico puede lograrse mediante la reproducción recurrente por selección, por ejemplo, mediante retrocruzamiento. En este caso, un progenitor recurrente deseado se cruza primero con un donante endogámico (el progenitor no recurrente) que lleva el gen(es) apropiado(s) para los rasgos determinados por Cry1F y Cry1D. La progenie de este cruce se vuelve a acoplar entonces al progenitor recurrente seguido por la selección en la progenie resultante para el(los) rasgo(s) deseado(s) a ser transferidos del progenitor no recurrente. Después de tres, preferiblemente cuatro, más preferiblemente cinco o más generaciones de retrocruzamientos con el progenitor recurrente con selección para el(los) rasgo(s) deseado(s), la progenie será heterocigótica para los loci que controlan el(los) rasgo/s que se transfieren, pero será como el progenitor recurrente para la mayoría o casi todos los otros genes (véase, por ejemplo, Poehlman & Sleper (1995) *Breeding Field Crops*, 4th Ed., 172-175; Fehr (1987) *Principles of Cultivar Development*, Vol. 1: Theory and Technique, 360 - 376).

Estrategias de 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/opppbpd/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.

"Los requisitos estructurados específicos para los productos de maíz Bt (Cry1Ab o Cry1F) 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

5 Bloques

Internos (es decir, dentro del campo Bt)

Externos (es decir, campos separados dentro de 1/2 milla (0,8 km) (1/4 de milla (0,4 km) si es posible) del campo Bt para maximizar el acoplamiento al azar)

Franjas en el campo

10 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:

15 "Requisitos del IRM del barrenador del maíz:

-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 (0,8 km) de los híbridos de refugio

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

-El refugio 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"

25 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
30 Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos requiere que se deposite significativamente menos refugio estructurado (generalmente 5%) de maíz no Bt que para productos de un solo rasgo (generalmente 20%).

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.

35 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.

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

40 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.

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.

45

Ejemplos

Ejemplo 1

Datos del bioensayo

Cry1Da expresada en maíz transgénico (pDAS5163) brinda protección contra la alimentación del cogollero del maíz (FAW), *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). Los mismos eventos son más efectivos en el control de FAW que han desarrollado resistencia frente a Cry1Fa y son claramente superiores a las plantas de maíz que contienen el evento TC1507, que es posiblemente el rasgo de resistencia a insectos líder en la industria para el control de FAW.

También hemos demostrado que Cry1Fa (proteína de la cepa DR1649 de *Pseudomonas fluorescens* recombinante; plásmido pDAB1817) y Cry1Da (proteína de la cepa DC782 de *Pseudomonas fluorescens* recombinante) son eficaces para controlar el FAW en bioensayos de dieta artificial y que la potencia de la combinación es mayor que lo que se espera de sus potencias individuales.

Según los datos descritos anteriormente, la expresión conjunta de Cry1Da y Cry1Fa puede producir una pila de IRM de dosis alta para FAW, otras especies importantes de *Spodoptera* y, quizás, otras plagas de lepidópteros. Se pueden agregar otras proteínas a esta combinación para agregar espectro. Por ejemplo, en maíz, la adición de Cry1Ab crearía una pila IRM para el barrenador de maíz europeo (BCE), *Ostrinia nubilalis* (Hübner).

Como se muestra en la Figura 1, el daño (media en % del daño en la hoja + SEM) a los segmentos de la hoja de maíz infestados con FAW (barras azules) o rFAW (barras de color púrpura). Todos los tratamientos precedidos por los números "5163" son segmentos de hojas de plantas transformadas con una construcción que contiene Cry1Da. Las plantas en las que no se detectó la expresión de Cry1Da se agrupan en el extremo izquierdo del gráfico. Las plantas en las que se detectó la expresión de Cry1Da se agrupan en el centro del gráfico. Los controles no transgénicos (es decir, negativos) están en el extremo derecho de la gráfica y se denominan "B104", "Hill" e "Isolina". Una línea endogámica comercial que contiene Cry1Fa es el primer tratamiento a la derecha (denominado "Herculex I") y tiene los mismos antecedentes genéticos que el control no transgénico denominado "Isolina".

Se creó una quimera de protoxina que consistía en la secuencia de codificación de la toxina límite escindida con tripsina de Cry1Da y la secuencia de codificación para la región de protoxina c-terminal de Cry1Ab y se diseñó en un casete de expresión capaz de dirigir la expresión en maíz (pDAS5163). El maíz se transformó utilizando *Agrobacterium tumefaciens* y se identificaron los eventos que contenían la quimera Cry1Da/1Ab. Las secciones de las hojas de las plantas regeneradas se sometieron a un bioensayo con gusanos cogolleros del maíz naturales (FAW) o larvas de una población de cogolleros del maíz que fueron resistentes a Cry1Fa (rFAW). Las plantas transformadas con Cry1Da/1Ab redujeron la alimentación de FAW pero no fueron tan efectivas como la línea endogámica que contiene 2 copias de Cry1Fa (Figura 1). (Los eventos de Cry1Da probados fueron hemicígotos para el transgén, mientras que las líneas endogámicas convertidas fueron homocígotas para el evento TC1507). Por el contrario, los mismos eventos que contenían Cry1Da/1Ab fueron generalmente mucho más efectivos para reducir la alimentación de rFAW que las líneas endogámicas que contenían Cry1Fa (Figura 1).

La actividad insecticida de Cry1Fa (proteína de la cepa DR1649 de *Pseudomonas fluorescens* recombinante; plásmido pDAB 1817), Cry1Da (proteína de la cepa DC782 de *P. fluorescens* recombinante) y una combinación 1:1 (p:p) de 2 se probó en bioensayos estándar de dieta artificial utilizados para evaluar la potencia. Las estimaciones de potencia se realizaron utilizando el análisis LOGIT (JMP® 8.0, SAS Inc. 2008) que produjo estimaciones de LC₅₀ y límites superior e inferior (95%) para la LC₅₀. Se realizó una prueba de sinergismo utilizando el método descrito por Tabashnik (1992) mediante el cual se calcula el valor esperado de la potencia de una combinación utilizando las potencias de cada componente solo. Una combinación se considera sinérgica cuando el límite de confianza superior estimado de la combinación es inferior a la potencia esperada calculada. En el caso del cogollero del maíz (FAW) y una población del cogollero del maíz que fue resistente a Cry1Fa (rFAW), los límites de confianza superiores para los LC₅₀ de la combinación fueron más bajos que las potencias estimadas (Tablas 1 y 2), lo que llevó a la conclusión de que la combinación de Cry1Fa y Cry1Da en estas 2 poblaciones es sinérgica.

Tabla 1. Estimaciones de potencia, límites superior e inferior del intervalo de confianza del 95% (LCL y UCL, respectivamente), para Cry1Fa, Cry1Da y la combinación 1:1 (p:p) de los 2 en el gusano cogollero del maíz natural (FAW), *Spodoptera frugiperda*. La última columna contiene el valor LC₅₀ esperado basado en la potencia de cada proteína sola usando la fórmula descrita por Tabashnik (1992). Tabashnik BE. Evaluación del sinergismo entre toxinas de *Bacillus Thuringiensis*. *Applied Environmental Microbiology* 58 [10], 3343-3346, 1992. Una combinación se considera sinérgica cuando el valor esperado es más alto que el límite de confianza superior para la combinación.

	Valores observados			Esperados
FAW	LC50	LCL	UCL	LC50
1 Da solo	530	234	1731	.
1 Fa solo	136	75	252	.
1 Fa-1Da	79	49	126	215.8909

Tabla 2. Estimaciones de potencia, límites superior e inferior del intervalo de confianza del 95% (LCL y UCL, respectivamente), para Cry1Fa, Cry1Da y la combinación 1:1 (p:p) de los 2 en el gusano cogollero del maíz resistente a Cry1Fa (rFAW), *Spodoptera frugiperda*. La última columna contiene el valor LC₅₀ esperado basado en la potencia de cada proteína sola usando la fórmula descrita por Tabashnik (1992). Una combinación se considera sinérgica cuando el valor esperado es más alto que el límite de confianza superior para la combinación.

	Valores observados			Esperados
rFAW	LC50	LCL	UCL	LC50
1 Da solo	92	58	144	.
1 Fa solo	3000	.	.	.
1 Fa-1Da	39	27	58	177.9434

Ejemplo 2

RESUMEN DE DATOS DE UNIÓN

Los experimentos de unión competitiva realizados con Cry1Da marcado con ¹²⁵I usando vesículas de microvellosidades epiteliales del intestino de los insectos (BBMV) aisladas de FAW se describen a continuación. Los resultados de estos experimentos demuestran que Cry1Da se une fuertemente a su receptor y que Cry1Fa no compite con Cry1Da por los sitios de unión. Si la resistencia a Cry1Da puede basarse en una mutación en el receptor observado en estos estudios, estos datos sugieren que Cry1Fa sería una buena herramienta de IRM para controlar estas poblaciones resistentes o mitigar el desarrollo de dicha resistencia. Los resultados de los bioensayos con FAW resistentes a Cry1Fa (rFAW) demuestran que Cry1Da es activo en esta población. Juntos, estos datos sugieren que Cry1Fa y Cry1Da podrían ser una pila IRM que mitige de manera efectiva el desarrollo de la resistencia a cualquiera de las proteínas insecticidas.

Los ensayos de unión del receptor muestran que ¹²⁵I Cry1Da se une fuertemente a su(s) receptor(es) y puede eliminarse de manera efectiva mediante Cry1Da sin marcar. Ni Cry1Ab, Cry1Fa ni Cry1Be pueden competir con ¹²⁵I Cry1Da a partir de su(s) sitio(s) receptor(es) en las BBMV de FAW, lo que indica que Cry1Da tiene un sitio de unión único en el intestino medio de FAW con el que Cry1Ab, Cry1F y Cry1Be no compiten. Dado que los rFAW son tan sensibles frente a Cry1Da como los FAW naturales, esto indica que el supuesto sitio del receptor que se altera en los insectos rFAW no es el sitio del receptor al que se une Cry1Da. Por lo tanto, Cry1Da es un excelente compañero de apilamiento para Cry1Fa ya que interactúa en un sitio diana diferente que es responsable para su actividad biológica.

Cuando se agregó ¹²⁵I Cry1Da a las BBMV de FAW, solo Cry1Da no radiomarcado fue capaz de desplazar el ¹²⁵I Cry1Da unido. La incapacidad de Cry1Fa, Cry1Ab y Cry1Be para desplazar el ¹²⁵I Cry1Da unido de las BBMV indicó que en el intestino medio de FAW, Cry1Da unido a un sitio receptor único con el que Cry1Fa, Cry1Ab y Cry1Be no interactúan, incluso aunque las cuatro de estas diferentes toxinas Cry sean activas contra las larvas de FAW.

Ejemplo 3

Diseño de toxinas quiméricas que comprenden las toxinas nucleares Cry1 y protoxinas heterólogas

Toxinas quiméricas. Se han publicado anteriormente proteínas quiméricas que utilizan el dominio de la toxina nuclear de una toxina Cry fusionada con el segmento de protoxina de otra toxina Cry, por ejemplo, en la Patente de EE. UU. No. 5593881 y la Patente de EE. UU. 5932209.

Las variantes de proteínas quiméricas Cry1Da de esta invención incluyen toxinas quiméricas que comprenden un segmento de toxina nuclear del extremo N-terminal derivado de una toxina insecticida Cry1Da fusionada con un segmento de protoxina de endotoxina delta heteróloga en algún punto pasado el extremo del segmento de toxina nuclear. La transición de la toxina del núcleo al segmento de protoxinas heterólogas puede ocurrir aproximadamente en la unión de la toxina del núcleo/protoxinas o, como alternativa, se puede retener una parte de la protoxina nativa (que se extiende más allá del segmento de la toxina del núcleo), con la transición a la protoxina

heteróloga que se produce posteriormente. De manera diferente, los segmentos de toxina central y protoxina pueden comprender exactamente la secuencia de aminoácidos de las toxinas nativas de las que se derivan, o pueden incluir adiciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos que no disminuyen, y pueden mejorar, la función biológica de los segmentos cuando se fusionan entre sí.

Por ejemplo, una toxina quimérica de la presente invención comprende un segmento de toxina nuclear derivado de Cry1Da y una protoxina heteróloga. En una realización preferida de la invención, el segmento de toxina del núcleo derivado de Cry1Da2 (594 aminoácidos) se fusiona con un segmento heterólogo que comprende un segmento de protoxina derivado de una delta-endotoxina Cry1Ab (545 aminoácidos). La secuencia de 1139 aminoácidos de la proteína quimérica, denominada en este documento Cry1Da. Debe entenderse que otras fusiones quiméricas que comprenden variantes de toxina nuclear Cry1Da2 y protoxinas derivadas de Cry1Ab están dentro del alcance de esta invención.

Una segunda proteína quimérica de la invención comprende un segmento de toxina nuclear derivado de Cry1Fa (603 aminoácidos) fusionado a un segmento heterólogo que comprende un segmento de protoxina derivado de una delta-endotoxina Cry1Ab (545 aminoácidos). La secuencia de 1148 aminoácidos de la proteína quimérica, llamada en este documento Cry1Fa.

Ejemplo 4. Construcción de plásmidos de expresión que codifican proteínas quiméricas y expresión en *Pseudomonas*

Se utilizaron métodos de clonación estándar [como se describe, por ejemplo, en Sambrook et al., (1989) y Ausubel et al., (1995), y las actualizaciones de los mismos] en la construcción del constructo de expresión de *Pseudomonas fluorescens* (Pf) pDOW2848 diseñado para producir una proteína quimérica Cry1Da de longitud completa. La producción de proteínas se realizó en la cepa MB214 de *Pseudomonas fluorescens* (un derivado de la cepa MB101; *P. fluorescens* biovar I), con una inserción de un operón lac modificado como se describe en la patente de EE. UU. No. 5169760. La estrategia de clonación básica implicó subclonar un fragmento de ADN que codificaba la proteína Cry1Da en vectores plásmidos, por lo que se coloca bajo el control de la expresión del promotor Ptac y el terminador rrnBTIT2 del plásmido pKK223-3 (PL Pharmacia, Milwaukee, WI). Uno de estos plásmidos se denominó pDOW2848 y el aislado MB214 que albergaba este plásmido se denominaba Dpfl50.

Análisis del crecimiento y expresión en matraces de agitación. La producción de la proteína Cry1Da para la caracterización y el ensayo biológico de insectos se realizó mediante la cepa Dpfl50 *P. fluorescens* cultivada en matraz de agitación. La producción de proteína Cry1Da conducida por el promotor Ptac se realizó como se ha descrito previamente en la patente de EE.UU. Nº 5527883. Los detalles de las manipulaciones microbiológicas están disponibles en Squires et al., (2004), Solicitud de Patente de los Estados Unidos 20060008877, Solicitud de Patente de los Estados Unidos 20080193974 y Solicitud de Patente de los Estados Unidos 20080058262. La expresión se indujo mediante la adición de isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) después de una incubación inicial de 24 horas a 30°C con agitación. De los cultivos se tomaron muestras en el momento de la inducción y en varios momentos después de la inducción. La densidad celular se midió por la densidad óptica a 600 nm (OD₆₀₀).

Fraccionamiento celular y análisis de SDS-PAGE de muestras en matraz de agitación. En cada tiempo de muestreo, la densidad celular de las muestras se ajustó a OD₆₀₀ = 20 y se centrifugaron alícuotas de 1 ml a 14000 x g durante cinco minutos. Los sedimentos celulares se congelaron a -80°C. Se generaron fracciones solubles e insolubles de muestras de peletes de células en matraz de agitación congeladas utilizando la solución de extracción de proteínas bacterianas EasyLyse™ (EPICENTRE® Biotechnologies, Madison, WI). Cada sedimento celular se resuspendió en 1 ml de solución EasyLyse™ y se diluyó adicionalmente 1:4 en tampón de lisis y se incubó con agitación a temperatura ambiente durante 30 minutos. El lisado se centrifugó a 14.000 rpm durante 20 minutos a 4°C y el sobrenadante se recuperó como la fracción soluble. El sedimento (fracción insoluble) se resuspendió luego en un volumen igual de solución salina tamponada con fosfato (PBS; Na₂HPO₄ 11,9 mM, NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, pH 7,4).

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

Preparación de cuerpos de inclusión. Las preparaciones de los cuerpos de inclusión de la proteína Cry1Da (IB) se realizaron en células de fermentaciones de *P. fluorescens* que produjeron la proteína insecticida Bt insoluble, como se demostró mediante SDS-PAGE y MALDI-MS (espectrometría de masas con ionización/desorción por láser asistida por matriz). Los sedimentos de fermentación de *P. fluorescens* se descongelaron en un baño de agua a 37°C. Las células se resuspendieron a 25% p/v en tampón de lisis [Tris 50 mM, pH 7,5, NaCl 200 mM, sal disódica EDTA 20 mM (ácido etilendiaminotetraacético), Triton X-100 al 1% y ditiotretol 5 mM (DTT); se agregaron 5 ml/l de cóctel inhibidor de la proteasa bacteriana (número de catálogo P8465; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) justo antes de su uso]. Las células se suspendieron utilizando un homogeneizador manual en el ajuste más bajo (Tissue Tearor, BioSpec Products, Inc., Bartlesville, OK). Se añadió lisozima (25 mg de Sigma L7651, de clara de huevo de gallina) a la suspensión celular mezclando con una espátula de metal, y la suspensión se incubó a temperatura ambiente

durante una hora. La suspensión se enfrió en hielo durante 15 minutos, luego se sonicó utilizando un Branson Sonifier 250 (dos sesiones de 1 minuto, a 50% de ciclo de trabajo, 30% de salida). La lisis celular se verificó mediante microscopía. Si fuera necesario, se agregaron 25 mg adicionales de lisozima, y se repitieron la incubación y la sonicación. Tras la confirmación de la lisis celular mediante microscopía, el lisado se centrifugó a 11.500 x g durante 25 minutos (4°C) para formar el sedimento de IB, y se descartó el sobrenadante. El sedimento de IB se resuspendió con 100 ml de tampón de lisis, se homogeneizó con el mezclador manual y se centrifugó como anteriormente. El sedimento de IB se lavó repetidamente por resuspensión (en 50 ml de tampón de lisis), homogeneización, sonicación y centrifugación hasta que el sobrenadante se volvió incoloro y el sedimento de IB se volvió firme y de color blanquecino. Para el lavado final, el sedimento de IB se resuspendió en agua destilada filtrada estéril (0,22 µl) que contenía EDTA 2 mM y se centrifugó. El sedimento final se resuspendió en agua destilada filtrada estéril que contenía EDTA 2 mM y se almacenó en alícuotas de 1 ml a -80°C.

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

Solubilización de cuerpos de inclusión. Se centrifugaron seis ml de suspensión de cuerpos de inclusión Cry1Da del clon Pf DPf150 en el ajuste más alto de una microcentrífuga Eppendorf modelo 5415C (aproximadamente 14.000 x g) para sedimentar las inclusiones. El sobrenadante del tampón de almacenamiento se eliminó y se reemplazó con 25 ml de tampón de carbonato de sodio 100 mM, pH 11, en un tubo cónico de 50 ml. Las inclusiones se resuspendieron usando una pipeta y se agitaron para mezclarlas completamente. El tubo se colocó en una plataforma de oscilación suave a 4°C durante la noche para extraer la proteína objetivo. El extracto se centrifugó a 30.000 x g durante 30 minutos a 4°C, y el sobrenadante resultante se concentró 5 veces utilizando un dispositivo de filtro centrífugo de celulosa regenerada Amicon Ultra-15 (30.000 de corte de peso molecular; Millipore). El tampón de muestra se cambió luego a CAPS 10 mM [ácido 3-(ciclohexamino)1-propanosulfónico] pH 10 utilizando columnas desechables PD-10 (GE Healthcare, Piscataway, NJ).

Solubilización y activación con tripsina de la proteína del cuerpo de inclusión. En algunos casos, la suspensión de los cuerpos de inclusión Cry1Da del clon Pfl DPf150 se centrifugó en el ajuste más alto de una microcentrífuga Eppendorf modelo 5415C (aproximadamente 14.000 x g) para sedimentar las inclusiones. El sobrenadante del tampón de almacenamiento se eliminó y se reemplazó con CAPS 100 mM, pH 11, para proporcionar una concentración de proteína de aproximadamente 50 mg/ml. El tubo se agitó a temperatura ambiente durante tres horas para solubilizar completamente la proteína. Se añadió tripsina en una cantidad igual del 5% al 10% (p:p, basado en el peso inicial del polvo IB) y la digestión se realizó mediante incubación mientras se agitaba durante la noche a 4°C o agitando de 90 a 120 minutos a temperatura ambiente. El material insoluble se eliminó mediante centrifugación a 10.000 x g durante 15 minutos, y el sobrenadante se aplicó a una columna de intercambio aniónico MonoQ (10 mm por 10 cm). La proteína Cry1Da activada se eluyó (según lo determinado por SDS-PAGE, ver más abajo) mediante un gradiente de NaCl 1 M de 0% a 100% en 25 volúmenes de columna. Las fracciones que contenían la proteína activada se agruparon y, cuando fue necesario, se concentraron a menos de 10 ml utilizando un dispositivo de filtro centrífugo de celulosa regenerada Amicon Ultra-15 como anteriormente. El material se pasó luego a través de una columna Superdex 200 (16 mm por 60 cm) en un tampón que contenía NaCl 100 mM, glicerol al 10%, Tween-20 al 0,5% y EDTA 1 mM. Se determinó mediante análisis de SDS-PAGE que la proteína activada (truncada enzimáticamente) eluye de 65 a 70 ml. Las fracciones que contenían la proteína activada se agruparon y se concentraron usando el concentrador centrífugo como se indicó anteriormente.

Electroforesis en gel. Las preparaciones de proteínas concentradas se prepararon para realizar la electroforesis diluyendo 1:50 en tampón de muestra NuPAGE® LDS (Invitrogen) que contenía DTT 5 mM como agente reductor y se calentó a 95°C durante 4 minutos. La muestra se cargó en carriles duplicados de un gel NuPAGE® al 4-12% junto con cinco estándares BSA que iban desde 0,2 µg a 2 µg/carril (para la generación de curvas estándar). El voltaje se aplicó a 200 V utilizando el tampón de ejecución MOPS SDS (Invitrogen) hasta que el tinte de rastreo alcanzó la parte inferior del gel. El gel se tiñó con un 0,2% de Coomassie Blue G-250 en un 45% de metanol, un 10% de ácido acético y se eliminó, primero brevemente con un 45% de metanol, un 10% de ácido acético, y luego con un 7% de ácido acético, un 5% de metanol hasta que el fondo se aclaró. Después de destintar, el gel fue escaneado con un Multimager BioRad Fluor-S. El software Quantity One v.4.5.2 del instrumento se usó para obtener volúmenes sustraídos de la línea de fondo de las bandas de proteína teñidas y para generar la curva estándar de BSA que se usó para calcular la concentración de proteína Cry1Da quimérica en la solución madre.

Ejemplo 5

Preparación de las proteínas de la toxina del núcleo Cry1Fa y Cry1Da y aislamiento de las vesículas de membrana con borde en cepillo *Spodoptera frugiperda* para experimentos de unión competitiva

Los siguientes ejemplos evalúan la unión competitiva de las proteínas de la toxina del núcleo Cry 1 a los receptores putativos en los tejidos del intestino del insecto. Se muestra que la proteína toxina Cry1Da marcada con 125I se une con alta afinidad a las vesículas de microvellosidades epiteliales del intestino de los insectos (BBMV) preparadas a partir de *Spodoptera frugiperda* (gusano cogollero del maíz) y que la proteína de la toxina nuclear Cry1Fa no compete con esta unión.

Purificación de las proteínas Cry. Un gen que codifica una proteína Cry1Da quimérica se expresó en la cepa de expresión de *Pseudomonas fluorescens* como se describe en el Ejemplo 4. De manera similar, un gen que codificaba una proteína quimérica que comprendía la toxina nuclear Cry1Fa (603 aminoácidos) y la protoxina Cry1Ab (545 aminoácidos) se expresó en el sistema Pf. En el caso de Cry1Fa, el plásmido de expresión se denominó pDAB1817 y la cepa de *P. fluorescens* que albergaba pDAB 1817 se denominó DPfl29. Las proteínas se purificaron mediante los métodos del Ejemplo 4, y luego se realizó la digestión con tripsina para producir toxinas nucleares activadas a partir de las proteínas de longitud completa, y los productos se purificaron mediante los métodos descritos en el Ejemplo 4. Las preparaciones de las proteínas procesadas con tripsina (toxina del núcleo activada) tenían una pureza > 95% y tenían un peso molecular de aproximadamente 65 kDa, según lo determinado experimentalmente por SDS-PAGE. Como se usa en el presente documento, la toxina nuclear activada preparada a partir de la proteína Cry1Da se denomina proteína toxina nuclear Cry1Da, y la toxina nuclear activada preparada a partir de la proteína Cry1Fa se denomina proteína toxina nuclear Cry1Fa.

Preparación y fraccionamiento de BBMV solubilizadas. Se emplearon métodos estándar de cuantificación de proteínas y electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida como se muestra, por ejemplo, en Sambrook et al. (1989) y Ausubel (1995) y sus actualizaciones. Se mantuvieron larvas de *S. frugiperda* de último estadio 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 corporal, 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. Las BBMV se prepararon mediante el método de precipitación con $MgCl_2$ de Wolfersberger (1993). Brevemente, se mezcló un volumen igual de una solución de $MgCl_2$ 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 $2.500 \times g$ 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 $27.000 \times g$ 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 Albúmina Bovina de Suero (BSA) como estándar.

La determinación de la fosfatasa alcalina (una enzima marcadora para la fracción BBMV) se realizó antes de congelar las muestras utilizando el kit de ensayo de fosfatasa alcalina QuantiChrom™ DALP-250 (Gentaur Molecular Products, Kampenhout, BE) siguiendo las instrucciones del fabricante. 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. Las BBMV se dividieron en partes alícuotas en muestras de 250 µl, se congelaron instantáneamente en N_2 líquido y se almacenaron a -80°C.

Electroforesis. 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 conocido observadas en una muestra de BenchMark™ Protein Ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA) cargadas en un pocillo del gel.

Yodación de la proteína de la toxina del núcleo Cry1Da. La proteína de la toxina nuclear Cry1Da purificada se yodó utilizando perlas de yodación Pierce (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL). Brevemente, dos perlas de yodación se lavaron dos veces con 500 µl de PBS (fosfato de sodio 20 mM, NaCl 0,15 M, pH 7,5) y se colocaron en un tubo de centrifuga de 1,5 ml con 100 µl de PBS. Se agregaron 0,5 mCi de yoduro de sodio marcado con ^{125}I , los componentes se dejaron reaccionar durante 5 minutos a temperatura ambiente, luego se agregaron 1 µg de proteína de toxina nuclear Cry1Da a la solución y se dejó reaccionar durante 3 a 5 minutos más. La reacción se terminó pipeteando la solución a partir de las perlas de yodación y aplicándola a una columna de centrifugación Zeba™ (Invitrogen) equilibrada en CAPS 50 mM, pH 10,0, DTT 1 mM (ditiotretol), EDTA 1 mM y glicerol al 5%. Las perlas de yodación se lavaron dos veces con 10 µl de PBS y la solución de lavado también se aplicó a la columna de desalación Zeba™. La solución radiactiva se eluyó a través de la columna de centrifugación mediante centrifugación a $1.000 \times g$ durante 2 min. La proteína toxina nuclear Cry1Da radiomarcada con ^{125}I se dializó luego contra CAPS 50 mM, pH 10,0, DTT 1 mM, EDTA 1 mM y glicerol al 5%.

Imágenes. Se determinó la radio-pureza de la proteína toxina nuclear Cry yodada mediante SDS-PAGE y un generador de imágenes de fósforo. Brevemente, se secaron geles de SDS-PAGE usando un aparato de secado de gel BioRad siguiendo las instrucciones del fabricante. Se tomaron imágenes de los geles secos envolviendo los geles en una película de Mylar (12 µm de espesor), y exponiéndolos a una criba de fósforo de almacenamiento de Molecular Dynamics (35 cm x 43 cm) durante 1 hora. 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 6

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

Se generó una curva de saturación para determinar la cantidad óptima de proteína BBMV para usar en los ensayos de unión con las proteínas de la toxina nuclear Cry1Da y Cry1Fa. Se incubaron 0,5 nM de la proteína de la toxina nuclear Cry1 radiomarcada con ¹²⁵I durante 1 hora a 28°C en tampón de unión (NaHPO₄ 8 mM, KH₂PO₄ 2 mM, NaCl 150 mM, BSA al 0,1%, pH 7,4) con cantidades de proteína BBMV que variaban de 0 µg/mL a 500 µg/mL (volumen total de 0,5 mL). La proteína toxina nuclear Cry1 marcada con ¹²⁵I unida a las proteínas BBMV se separó de la fracción no unida mediante el muestreo de 150 µl de la mezcla de reacción por triplicado en tubos de centrífuga de 1,5 ml separados y centrifugando las muestras a 14.000 x g durante 8 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante se eliminó suavemente y el sedimento se lavó tres veces con tampón de unión helado. La parte inferior del tubo de centrífuga que contenía el sedimento se cortó, se colocó en un tubo de cultivo de vidrio de 13 x 75 mm y las muestras se contaron durante 5 minutos cada una en el contador gamma. Se representaron los CPM (conteos por minuto) obtenidos menos los CPM de fondo (reacción sin proteína BBMV) frente a la concentración de proteína BBMV. De acuerdo con los resultados mostrados por otros (Luo et al., 1999), se determinó que la concentración óptima de proteína BBMV para usar en los ensayos de unión era de 150 µg/ml.

Ejemplo 7

Ensayos de unión competitiva frente a BBMV de *S. frugiperda* con proteínas de toxina de núcleo de Cry1Da y Cry1Fa

Se llevaron a cabo ensayos de unión competitiva homóloga y heteróloga utilizando 150 µg/ml de proteína BBMV de *S. frugiperda* y 0,5 nM de la proteína de toxina del núcleo de Cry1Da radiomarcada con ¹²⁵I. Las concentraciones de la proteína de toxina central Cry1Fa no radiomarcada competitiva agregadas a la mezcla de reacción variaron de 0,045 nM a 1000 nM y se agregaron al mismo tiempo que la proteína de la toxina nuclear de Cry1Da radiactiva, para asegurar una verdadera competición de unión. Las incubaciones se llevaron a cabo durante 1 hora a 28°C y la cantidad de proteína marcada con la toxina del núcleo de Cry1Da marcada en ¹²⁵I unida al BBMV (unión específica) se midió como se describió anteriormente. La unión no específica se representó por los recuentos obtenidos en presencia de 1.000 nM de proteína de toxina nuclear de Cry1Da no radiomarcada. Se consideró que la unión total al cien por ciento era la cantidad de unión en ausencia de cualquier proteína competidora de toxina Cry1Fa.

Los ensayos de unión al receptor que utilizan la proteína de la toxina del núcleo de Cry1Da marcada con ¹²⁵I determinaron la capacidad de la proteína de la toxina del núcleo Cry1Fa para desplazar este ligando radiomarcado de su sitio de unión en los BBMV de *S. frugiperda*. Los resultados muestran que la proteína de la toxina del núcleo Cry1Fa no desplazaba la proteína de la toxina del núcleo de la Cry1Da marcada con ¹²⁵I unida a su proteína o proteínas receptoras a concentraciones tan altas como 1000 nM (2000 veces la concentración del ligando de unión radiactivo). Como se esperaba, la proteína de toxina central de Cry1Da no marcada fue capaz de desplazar la proteína de toxina nuclear de Cry1Da radiomarcada de su(s) proteína(s) de unión, mostrando una curva de respuesta a la dosis sigmoideal con un desplazamiento del 50% a 5 nM.

Por lo tanto, se indica que la proteína de la toxina del núcleo de Cry1Da interactúa con un sitio de unión en BBMV de *S. frugiperda* que no se une a la proteína de la toxina del núcleo de Cry1Fa.

Lista de referencias

- Finney, D.J. 1971. Probit analysis. Cambridge University Press, England.
- Hua, G., L. Masson, J. L. Jurat-Fuentes, G. Schwab, and M. J. Adang. Binding analyses of *Bacillus thuringiensis* Cry d-endotoxins using brush border membrane vesicles of *Ostrinia nubilalis*. *Applied and Environmental Microbiology* 67[2], 872-879. 2001.
- LeOra Software. 1987. POLO-PC. A user's guide to probit and logit analysis. Berkeley, CA.
- McGaughey, W. H., F. Gould, and W. Gelernter. Bt resistance management. *Nature Biotechnology* 16[2], 144-146. 1998
- Marçon, P.R.G.C., L.J. Young, K. Steffey, and B.D. Siegfried. 1999. Baseline susceptibility of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* (Hübner) (Lepidoptera: Pyralidae) to *Bacillus thuringiensis* toxins. *J. Econ. Entomol.* 92 (2): 280—285.

Robertson, L.J. and H.K. Preisler. 1992. Pesticide bioassays with arthropods. CRC Press, Boca Ranton, FL.

SAS Institute Inc. 1988. SAS procedures guide, Release 6.03 edition. SAS Institute Inc, Cary, NC.

Stone, B.F. 1968. A formula for determining degree of dominance in cases of monofactorial inheritance of resistance to Chemicals. Bull. WHO 38:325—329.

- 5 Van Mellaert, H., J. Botterman, J. Van Rie, and H. Joos. Transgenic plants for the prevention of development of insects resistant to *Bacillus thuringiensis* toxins. (Plant Genetic Systems N.V., Belg. 89-401499[400246], 57-19901205. EP. 5-31-1989Apéndice A

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	
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 & Tippet	1995	Bt A20	Solo la secuencia de ADN

ES 2 704 652 T3

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 Riazuddin &	1998		
Cry1Ac12	I12418	Ely & Tippet	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	AAY88347	Kaur & Allam	2005	Bt SK-729	

ES 2 704 652 T3

Cry1Ac19	ABD37053	Gao et al	2005	Bt C-33		
Cry1Ac20	ABB89046	Tan et al	2005			
Cry1Ac21	AAY66992	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 Julio 09	NCBI
Cry1Ac26	FJ617446	Guan Peng et al	2009	Bt Tm41-4	Sin enlace Julio 09	NCBI
Cry1Ac27	FJ617447	Guan Peng et al	2009	Bt Tm44-1B	Sin enlace Julio 09	NCBI
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		
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 Julio 09	NCBI

ES 2 704 652 T3

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	
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	

ES 2 704 652 T3

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	Selvapandiyar	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	
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	

ES 2 704 652 T3

				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 kenya 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		
Cry2Aa12	ABI83671	Tan et al	2006	Bt Rpp39	
Cry2Aa13	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	

ES 2 704 652 T3

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	
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 09

ES 2 704 652 T3

Cry4Cb2	FJ597622	Jun & Furong	2008	Bt Ywc2-8	Sin enlace Julio 09	NCBI
Cry4Cc1	FJ403207	Jun & Furong	2008	Bt MC28	Sin enlace Julio 09	NCBI
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 Julio 09	NCBI
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 Sept 09	NCBI
Cry7Ab8	GU145299	Feng Jing	2009		Sin enlace Nov 09	NCBI
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 Julio 09	NCBI
Cry8Ba1	AAA21118	Narva & Fu	1993	Bt kumamotoensis		
Cry8Bb1	CAD57542	Abad et al	2002			
Cry8Bc1	CAD57543	Abad et al	2002			

ES 2 704 652 T3

Cry8Ca1	AAA21119	Sato et al.	1995	Bt japonensis Buibui	
Cry8Ca2	AAR98783	Shu et al	2004	Bt HBF-1	
Cry8Ca3	EU625349	Du et al	2008	Bt FTL-23	Sin enlace NCBI Julio 09
Cry8Da1	BAC07226	Asano et al	2002	Bt galleriae	
Cry8Da2	BD133574	Asano et al	2002	Bt	Solo la secuencia de ADN
Cry8Da3	BD133575	Asano et al	2002	Bt	Solo la secuencia de ADN
Cry8Db1	BAF93483	Yamaguchi et al	2007	Bt BBT2-5	
Cry8Ea1	AAQ73470	Fuping et al	2003	Bt 185	
Cry8Ea2	EU047597	Liu et al	2007	Bt B-DLL	Sin enlace NCBI Julio 09
Cry8Fa1	AAT48690	Shu et al	2004	Bt 185	también AAW81032
Cry8Ga1	AAT46073	Shu et al	2004	Bt HBF-18	
Cry8Ga2	ABC42043	Yan et al	2008	Bt 145	
Cry8Ga3	FJ198072	Xiaodong et al	2008	Bt FCD114	Sin enlace NCBI Julio 09
Cry8Ha1	EF465532	Fuping et al	2006	Bt 185	Sin enlace NCBI Julio 09
Cry8Ia1	EU381044	Yan et al	2008	Bt su4	Sin enlace NCBI Julio 09
Cry8Ja1	EU625348	Du et al	2008	Bt FPT-2	Sin enlace NCBI Julio 09
Cry8Ka1	FJ422558	Quezado et al	2008		Sin enlace NCBI Julio 09
Cry8Ka2	ACN87262	Noguera & Ibarra	2009	Bt 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	

ES 2 704 652 T3

Cry9Ca2	AAQ52375	Baum et al	2003		
Cry9Da1	BAA 19948	Asano	1997	Bt japonensis N141	
Cry9Da2	AAB97923	Wasano & Ohba	1998	Bt japonensis	
Cry9Da3	GQ249295	Su et al	2009	Bt T03B001	Sin enlace NCBI Julio 09
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	
Tipo Cry11Aa	DQ166531	Mahalakshmi et al	2007	Bt LDC-9	secuencia incompleta
Cry11Ba1	CAA60504	Delecluse et al	1995	Bt jegathesan 367	
Cry11Bb1	AAC97162	Ordúz et al	1998	Bt medellin	
Cry12Bb1	AAA22355	Narva et al	1991	Bt PS33F2	

ES 2 704 652 T3

Cry13Bb1	AAA22356	Narva et al	1992	Bt PS63B		
Cry14Aa1	AAA21516	Narva et al	1994	Bt sotto PS80JJ1		
Cry15Aa1	AAA22333	Brown & Whiteley	1992	Bt thompsoni		
Cry16Aa1	CAA63860	Barloy et al	1996	Cb malaysia CH18		
Cry17Aa1	CAA67841	Barloy et al	1998	Cb malaysia CH18		
Cry18Aa1	CAA67506	Zhang et al	1997	Paenibacillus popilliae		
Cry18Ba1	AAF89667	Patel et al	1999	Paenibacillus popilliae		
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 Cry37Aa1	con
Cry24Ba1	AAC61891	Kawalek and Gill	1998	Bt jegathesan		
Cry24Ba1	BAD32657	Ohgushi et al	2004	Bt sotto		
Cry24Ca1	CAJ43600	Beron & Salerno	2005	Bt FCC-41		
Cry25Aa1	AAC61892	Kawalek and Gill	1998	Bt jegathesan		
Cry26Aa1	AAD25075	Wojciechowska et al	1999	Bt finitimus B-1166		
Cry27Aa1	BAA82796	Saitoh	1999	Bt higo		
Cry28Aa1	AAD24189	Wojciechowska et al	1999	Bt finitimus B-1161		
Cry28Aa2	AAG00235	Moore y Debro	2000	Bt finitimus		
Cry29Aa1	CAC80985	Delecluse et al	2000	Bt medellin		

ES 2 704 652 T3

Cry30Aa1	CAC80986	Delecluse et al	2000	Bt medellin		
Cry30Ba1	BAD00052	Ito et al	2003	Bt entomocidus		
Cry30Ca1	BAD67157	Ohgushi et al	2004	Bt sotto		
Cry30Ca2	ACU24781	Sun and Park	2009	Bt jegathesan 367		
Cry30Da1	EF095955	Shu et al	2006	Bt Y41	Sin enlace Julio 09	NCBI
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 July09	NCBI
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 Cry35Aa1	con
Cry34Aa2	AAK64560	Rupar et al	2001	Bt EG5899	Binario Cry35Aa2	con
Cry34Aa3	AAT29032	Schnepf et al	2004	Bt PS69Q	Binario Cry35Aa3	con
Cry34Aa4	AAT29030	Schnepf et al	2004	Bt PS185GG	Binario Cry35Aa4	con
Cry34Ab1	AAG41671	Moellenbeck et al	2001	Bt PS149B1	Binario Cry35Ab1	con
Cry34Ac1	AAG50118	Ellis et al	2001	Bt PS167H2	Binario Cry35Ac1	con
Cry34Ac2	AAK64562	Rupar et al	2001	Bt EG9444	Binario Cry35Ab2	con
Cry34Ac3	AAT29029	Schnepf et al	2004	Bt KR1369	Binario	con

ES 2 704 652 T3

					Cry35Ab3	
Cry34Ba1	AAK64565	Rupar et al	2001	Bt EG4851	Binario Cry35Ba1	con
Cry34Ba2	AAT29033	Schnepf et al	2004	Bt PS201L3	Binario Cry35Ba2	con
Cry34Ba3	AAT29031	Schnepf et al	2004	Bt PS201HH2	Binario Cry35Ba3	con
Cry35Aa1	AAG50342	Ellis et al	2001	Bt PS80JJ1	Binario Cry34Aa1	con
Cry35Aa2	AAK64561	Rupar et al	2001	Bt EG5899	Binario Cry34Aa2	con
Cry35Aa3	AAT29028	Schnepf et al	2004	Bt PS69Q	Binario Cry34Aa3	con
Cry35Aa4	AAT29025	Schnepf et al	2004	Bt PS185GG	Binario Cry34Aa4	con
Cry35Ab1	AAG41672	Moellenbeck et al	2001	Bt PS149B1	Binario Cry34Ab1	con
Cry35Ab2	AAK64563	Rupar et al	2001	Bt EG9444	Binario Cry34Ac2	con
Cry35Ab3	AY536891	AAT29024	2004	Bt KR1369	Binario Cry34Ab3	con
Cry35Ac1	AAG50117	Ellis et al	2001	Bt PS167H2	Binario Cry34Ac1	con
Cry35Ba1	AAK64566	Rupar et al	2001	Bt EG4851	Binario Cry34Ba1	con
Cry35Ba2	AAT29027	Schnepf et al	2004	BtPS201L3	Binario Cry34Ba2	con
Cry35Ba3	AAT29026	Schnepf et al	2004	Bt PS201HH2	Binario Cry34Ba3	con
Cry36Aa1	AAK64558	Rupar et al	2001	Bt		
Cry37Aa1	AAF76376	Donovan et al	2000	Bt	Binario Cry23Aa	con
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 July09	NCBI
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		

ES 2 704 652 T3

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
Crv48Ab	CAJ86548	Jones y Berry		2006	Bs LP1G	Binario con 49Ab1
Cry48Ab2	CAJ86549	Jones y Berry		2006	Bs 2173	Binario con 49Aa4
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	

ES 2 704 652 T3

Cry58Aa1	ANC87260	Noguera & Ibarra	2009	Bt entomocidus
Cry59Aa1	ACR43758	Noguera & Ibarra	2009	Bt kim LBIT-980

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

ES 2 704 652 T3

Vip3Aa19	Vip3ALD	DQ241674	Liu et al	2006	no publicado	Bt AL	
Vip3Aa19	Vip3A-1	DQ539887	Hart et al	2006	no publicado		
Vip3Aa20	Vip3A-2	DQ539888	Hart et al	2006	no publicado		
Vip3Aa21	Vip	ABD84410	Panbangred	2006	no publicado	Bt aizawai	
Vip3Aa22	Vip3A-LS1	AAY41427	Lu et al	2005	no publicado	Bt LS1	
Vip3Aa23	Vip3A-LS8	AAY41428	Lu et al	2005	no publicado	Bt LS8	
Vip3Aa24		BI 880913	Song et al	2007	no publicado	Bt WZ-7	
Vip3Aa25		EF608501	Hsieh et al	2007	no publicado		
Vip3Aa26		EU294496	Shen and Guo	2007	no publicado	Bt TF9	
Vip3Aa27		EU332167	Shen and Guo	2007	no publicado	Bt 16	
Vip3Aa28		FJ494817	Xiumei Yu	2008	no publicado	Bt JF23-8	
Vip3Aa29		FJ626674	Xieumei et al	2009	no publicado	Bt JF21-1	
Vip3Aa30		FJ626675	Xieumei et al	2009	no publicado	MD2-1	
Vip3Aa31		FJ626676	Xieumei et al	2009	no publicado	JF21-1	
Vip3Aa32		FJ626677	Xieumei et al	2009	no publicado	MD2-1	
.							
Vip3Ab1	Vip3B	AAR40284	Feitelson et al	1999	US 6603063 Ago 2003	Bt KB59A4-6	WO9957 282(A2, A3) 11Nov 1999
Vip3Ab2	Vip3D	AAY88247	Feng and Shen	2006	no publicado	Bt	
.							
Vip3Ac1	PS49C		Narva et al.	Solicitud US 2004012871 6			
.							
Vip3Ad1	PS158C2		Narva et al	.	Solicitud US 2004012871 6		
Vip3Ad2	ISP3B	CAI43276	Van Rie et al	2005	no publicado	Bt	
.							
Vip3Ae1	ISP3C	CAI43277	Van Rie et al	2005	no publicado	Bt	
.							
Vip3Af1	ISP3A	CAI43275	Van Rie et al	2005	no publicado	Bt	
Vip3Af2	Vip3C	ADN08753	Syngenta	.	WO 03/075655		
				.			

Vip3Ag1	Vip3B	ADN08758	Syngenta	.	WO 02/078437		
Vip3Ag2		FJ556803	Audtho et al	2008		Bt	
.							
Vip3Ah1	Vip3S	DQ832323	Li y Shen	2006	No publicado	Bt	
.							
Vip3Ba1		AAV70653	Rang et al	2004	no publicado		
.							
Vip3Bb1	Vip3Z	ADN08760	Syngenta	.	WO 03/075655		
Vip3Bb2		EF439819	Akhurst et al	2007			

Listado de secuencias

<110> Dow AGROSCIENCES LLC

<120> Uso combinado de las proteínas de CRY1Da y CRY1Fa para gestionar la resistencia de los insectos

5 <130> DAS-P0161-US

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 605

10 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cry1Fa

<400> 1

ES 2 704 652 T3

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 2 704 652 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 2 704 652 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> 594

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cry1Da

<400> 2

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

Asn Pro Lys Glu Ile Ile Leu Gly Glu Glu Arg Leu Glu Thr Gly Asn
20 25 30

Thr Val Ala Asp Ile Ser Leu Gly Leu Ile Asn Phe Leu Tyr Ser Asn
35 40 45

10

ES 2 704 652 T3

Phe Val Pro Gly Gly Gly Phe Ile Val Gly Leu Leu Glu Leu Ile Trp
 50 55 60
 Gly Phe Ile Gly Pro Ser Gln Trp Asp Ile Phe Leu Ala Gln Ile Glu
 65 70 75 80
 Gln Leu Ile Ser Gln Arg Ile Glu Glu Phe Ala Arg Asn Gln Ala Ile
 85 90 95
 Ser Arg Leu Glu Gly Leu Ser Asn Leu Tyr Lys Val Tyr Val Arg Ala
 100 105 110
 Phe Ser Asp Trp Glu Lys Asp Pro Thr Asn Pro Ala Leu Arg Glu Glu
 115 120 125
 Met Arg Ile Gln Phe Asn Asp Met Asn Ser Ala Leu Ile Thr Ala Ile
 130 135 140
 Pro Leu Phe Arg Val Gln Asn Tyr Glu Val Ala Leu Leu Ser Val Tyr
 145 150 155 160
 Val Gln Ala Ala Asn Leu His Leu Ser Ile Leu Arg Asp Val Ser Val
 165 170 175
 Phe Gly Glu Arg Trp Gly Tyr Asp Thr Ala Thr Ile Asn Asn Arg Tyr
 180 185 190
 Ser Asp Leu Thr Ser Leu Ile His Val Tyr Thr Asn His Cys Val Asp
 195 200 205
 Thr Tyr Asn Gln Gly Leu Arg Arg Leu Glu Gly Arg Phe Leu Ser Asp
 210 215 220
 Trp Ile Val Tyr Asn Arg Phe Arg Arg Gln Leu Thr Ile Ser Val Leu
 225 230 235 240
 Asp Ile Val Ala Phe Phe Pro Asn Tyr Asp Ile Arg Thr Tyr Pro Ile
 245 250 255
 Gln Thr Ala Thr Gln Leu Thr Arg Glu Val Tyr Leu Asp Leu Pro Phe
 260 265 270
 Ile Asn Glu Asn Leu Ser Pro Ala Ala Ser Tyr Pro Thr Phe Ser Ala
 275 280 285
 Ala Glu Ser Ala Ile Ile Arg Ser Pro His Leu Val Asp Phe Leu Asn
 290 295 300

ES 2 704 652 T3

Ser Phe Thr Ile Tyr Thr Asp Ser Leu Ala Arg Tyr Ala Tyr Trp Gly
305 310 315 320

Gly His Leu Val Asn Ser Phe Arg Thr Gly Thr Thr Thr Asn Leu Ile
325 330 335

Arg Ser Pro Leu Tyr Gly Arg Glu Gly Asn Thr Glu Arg Pro Val Thr
340 345 350

Ile Thr Ala Ser Pro Ser Val Pro Ile Phe Arg Thr Leu Ser Tyr Ile
355 360 365

Thr Gly Leu Asp Asn Ser Asn Pro Val Ala Gly Ile Glu Gly Val Glu
370 375 380

Phe Gln Asn Thr Ile Ser Arg Ser Ile Tyr Arg Lys Ser Gly Pro Ile
385 390 395 400

Asp Ser Phe Ser Glu Leu Pro Pro Gln Asp Ala Ser Val Ser Pro Ala
405 410 415

Ile Gly Tyr Ser His Arg Leu Cys His Ala Thr Phe Leu Glu Arg Ile
420 425 430

Ser Gly Pro Arg Ile Ala Gly Thr Val Phe Ser Trp Thr His Arg Ser
435 440 445

Ala Ser Pro Thr Asn Glu Val Ser Pro Ser Arg Ile Thr Gln Ile Pro
450 455 460

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

Pro Gly Phe Thr Gly Gly Asp Ile Leu Thr Arg Asn Ser Met Gly Glu
485 490 495

Leu Gly Thr Leu Arg Val Thr Phe Thr Gly Arg Leu Pro Gln Ser Tyr
500 505 510

Tyr Ile Arg Phe Arg Tyr Ala Ser Val Ala Asn Arg Ser Gly Thr Phe
515 520 525

Arg Tyr Ser Gln Pro Pro Ser Tyr Gly Ile Ser Phe Pro Lys Thr Met
530 535 540

Asp Ala Gly Glu Pro Leu Thr Ser Arg Ser Phe Ala His Thr Thr Leu
545 550 555 560

Phe Thr Pro Ile Thr Phe Ser Arg Ala Gln Glu Glu Phe Asp Leu Tyr
565 570 575

Ile Gln Ser Gly Val Tyr Ile Asp Arg Ile Glu Phe Ile Pro Val Thr
580 585 590

Ala Thr

REIVINDICACIONES

1. Una planta o célula vegetal transgénica que comprende ADN que codifica y expresa una proteína insecticida Cry1Da y ADN que codifica y expresa una proteína insecticida Cry1Fa.
- 5 2. La semilla de una planta de la reivindicación 1, en la que dicha semilla comprende ADN que codifica y expresa una proteína insecticida Cr1Da y ADN que codifica y expresa una proteína insecticida Cry1Fa.
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 que comprenden ADN que codifica y expresa una proteína insecticida de Cr1Da y ADN que codifica y expresa una proteína insecticida de Cry1Fa, en donde dichas semillas de refugio comprenden menos del 40% de todas las semillas en la mezcla.
- 10 4. Un método para controlar el desarrollo de la resistencia a toxinas Cry por un insecto, comprendiendo dicho método plantar semillas que comprenden ADN que codifica y expresa una proteína insecticida Cry1Da y ADN que codifica y expresa una proteína insecticida Cry1Fa para producir un campo de plantas.
- 5 15 5. La planta transgénica de la reivindicación 1, comprendiendo dicha planta además un ADN que codifica una proteína que contiene toxinas de núcleo de Cry1Ab, en donde una toxina de núcleo de Cry1Ab es la porción de toxina insecticida activa N-terminal de la proteína Cry1Ab.
6. El uso de una composición para controlar plagas de lepidópteros que comprenden células que expresan cantidades efectivas tanto de una proteína que contiene la toxina núcleo de Cry1Fa como de una proteína que contiene la toxina núcleo de Cry1da, en donde una toxina núcleo de Cry1Fa es la porción activa insecticida de toxina N-terminal de la proteína Cry1Fa, y en la que una toxina núcleo de Cry1Da es la parte de la toxina N-terminal, insecticida activa de la proteína Cry1Da.
- 20 7. El uso de una composición de la reivindicación 6, que comprende un huésped transformado para expresar una proteína que contiene tanto toxina nuclear Cry1Fa como proteína que contiene la toxina del núcleo Cry1Da, en donde dicho huésped es un microorganismo o una célula vegetal, en donde una toxina del núcleo Cry1Fa es la parte de toxina N-terminal, insecticida activa de la proteína Cry1Fa, y en donde una toxina del núcleo Cry1Da es la parte de la toxina N-terminal, insecticida activa de la proteína Cry1Da.
- 25 8. Un método para controlar plagas de lepidópteros que comprende presentar a dichas plagas o al medio ambiente de dichas plagas una cantidad eficaz de una composición de la reivindicación 6.
9. Una planta transgénica que produce tres proteínas insecticidas, que comprenden una proteína insecticida Cry1Da y una proteína insecticida Cry1Fa y una tercera proteína Cry insecticida, que son insecticidas para el mismo insecto objetivo, teniendo dicho insecto potencial para desarrollar resistencia a cualquiera de dichas proteínas Cry, y en donde cada una de dichas proteínas Cry se une a un receptor intestinal diferente en dicho insecto objetivo.
- 30 10. La planta de la reivindicación 9, en la que dicho insecto es el gusano cogollero del maíz.
11. Una planta transgénica que produce una proteína Cry1Fa más una proteína Cry1Da más una tercera proteína seleccionada del grupo que consiste en las proteínas Vip3A, Cry1C, Cry1Be, y Cry1E.

35

Figura 1

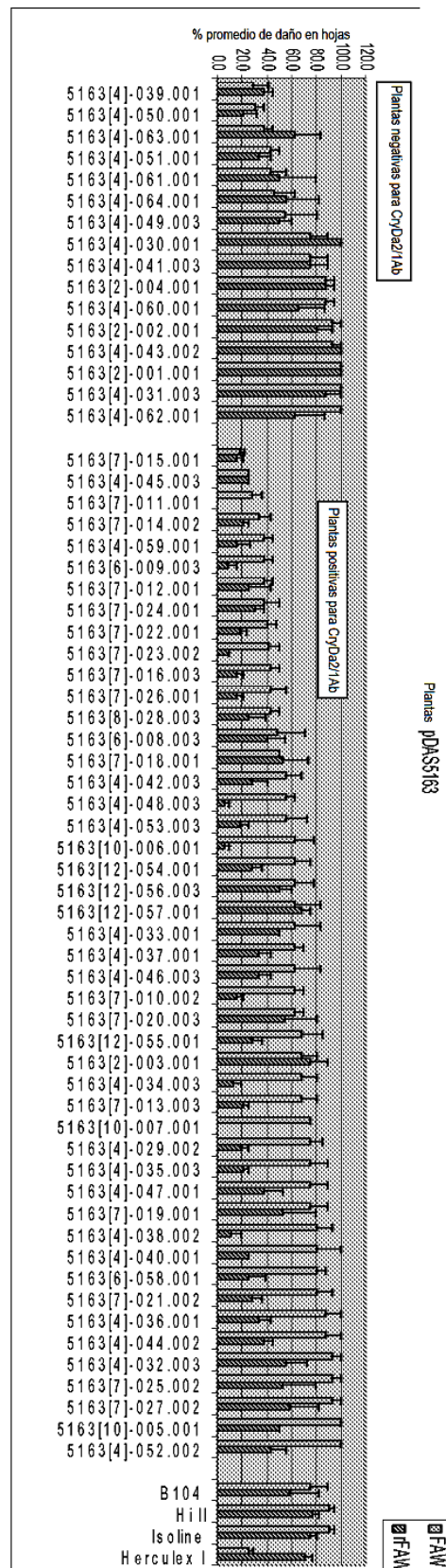


Figura 2. Unión competitiva de BBMV de *Spodoptera frugiperda* mediante la toxina nuclear Cry1Fa y la proteína toxina nuclear Cry1Da marcada con ^{125}I

