

PROTEÍNAS INSECTICIDAS VEGETATIVAS ÚTILES PARA CONTROLAR

PLAGAS DE INSECTOS

Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

[0001] La presente solicitud reivindica como prioridad y el beneficio de la solicitud provisional estadounidense 62/014.916, presentada el 20 de junio de 2014. La totalidad del contenido de esta solicitud se incorpora por referencia a la presente solicitud.

Campo de la invención

[0002] La presente invención se refiere en general al campo de la biología molecular. Más específicamente, la invención se relaciona con nuevas toxinas de proteínas insecticidas desarrolladas a partir de una nueva toxina de proteína insecticida vegetativa hallada en *Bacillus thuringiensis* y su uso para el control de insectos.

Antecedentes de la invención

[0003] Los insectos y otras plagas constituyen para los agricultores miles de millones de dólares anuales en pérdidas de cultivos y gastos para mantener estas plagas bajo control. Además de las pérdidas en los cultivos de campo, las plagas de insectos también son una carga para los agricultores de vegetales y frutos, los productores de flores ornamentales y los jardineros. Las pérdidas ocasionadas por las plagas de

insectos en los medioambientes de producción incluyen la disminución en el rendimiento de los cultivos, una menor calidad de los cultivos y mayores costos de cosecha.

[0004] Las plagas de insectos se controlan principalmente mediante aplicaciones intensivas de plaguicidas químicos, que son activos a través de la inhibición del crecimiento de los insectos, la prevención de la alimentación o reproducción de los insectos o bien provocan la muerte. Por ende, se puede lograr un buen control de los insectos pero estos productos químicos a veces pueden afectar también a otros insectos beneficiosos. Otro problema que resulta del amplio uso de plaguicidas químicos es la aparición de poblaciones de insectos resistentes. Esta situación se alivió parcialmente mediante diversas prácticas de manejo, pero existe la necesidad creciente de contar con agentes de control de plagas alternativos. Los agentes de control de plagas biológicos, como, por ejemplo, cepas de *Bacillus thuringiensis* (Bt) que expresan toxinas plaguicidas como las delta-endotoxinas, también se aplicaron a las plantas de cultivo con resultados satisfactorios, con lo cual ofrecen una alternativa o complemento de los plaguicidas químicos. Se aislaron los genes que codifican algunas de estas delta-endotoxinas y se demostró que su expresión en huéspedes heterólogos proveen otra herramienta para el control de plagas de insectos importantes desde el punto de vista económico. En particular, la expresión de toxinas insecticidas, como, por ejemplo, las delta-toxinas

de *Bacillus thuringiensis*, en vegetales transgénicos proporcionaron una protección eficaz contra plagas de insectos seleccionadas y se comercializaron los vegetales transgénicos que expresan tales toxinas, por lo cual los agricultores pudieron reducir las aplicaciones de agentes químicos de control de insectos.

[0005] El microbio del suelo *Bacillus thuringiensis* es una bacteria Gram-positiva, formadora de esporas, caracterizada por inclusiones de proteínas cristalinas paraesporales. *Bacillus thuringiensis* continúa como la fuente principal de proteínas insecticidas novedosas para el desarrollo de plaguicidas incorporados en los vegetales. Mediante el uso de diversas cepas de aislados bacterianos, hemos inventado nuevas toxinas *Bt* que son activas contra las plagas de insectos de importancia comercial. En el mercado estadounidense de resistencia a insectos del maíz, *Spodoptera frugiperda* (gusano del ejército de otoño "FAW"), *Ostrinia nubilalis* Hübner (taladro del maíz europeo "ECB"), y *Helicoverpa zea* Boddie (gusano de la espiga del maíz "CEW") constituyen las plagas clave, aunque existen otras plagas clave de insectos en otras geografías (por ejemplo, *Helicoverpa armigera* (gusano del capullo del algodón "CBW" o gusano de la espiga de maíz "CEW")) y especies de plagas de insectos secundarias adicionales pero también importantes. Las toxinas de *Bt* representan más del 90% del mercado bioinsecticida y esencialmente la totalidad de la fuente de genes para cultivos

transgénicos que se desarrollaron para proporcionar resistencia a la alimentación de los insectos. La bacteria *Bt* produce delta-endotoxinas insecticidas que incluyen las toxinas Cristal (Cry), Citotoxina (Cyt), y la proteína insecticida vegetativa (VIP), según la estructura de la proteína y el gen. Las toxinas Cry se producen durante la formación de esporas como proteínas de cristales insolubles. Las toxinas VIP, por otro lado, se producen como proteínas solubles durante la etapa vegetativa del crecimiento bacteriano de *Bt*. Las proteínas VIP son distintas de las proteínas Cry en cuanto a la estructura, pero comparten la propiedad con las toxinas Cry de ser formadoras de esporas que actúan sobre las células ubicadas en el intestino medio de los insectos (Yu, C.-G., et al., 1997 Appl. Environ. Microbiol. 63:532-536, Lee, M.K., et al., 2003, Appl. Environ. Microbiol. 69: 4648-4657, Shotkoski, F., et al., 2003, Proc. Beltwide Cotton Conf, 89-93). Describimos en la presente la invención de nuevas toxinas VIP que poseen actividad insecticida de amplio espectro, que incluye la actividad insecticida contra ECB, que es única en comparación con las proteínas VIP conocidas actualmente (Yu, C.-G., et al., 1997 Appl. Environ. Microbiol. 63:532-536).

[0006] Los documentos de patentes de invención WO2013/134523, WO 94/21795, WO 96/10083, 5.877.012, 6.107.279, 6.137.033, y 6.291.156, así como también Estruch et al. (1996, Proc. Natl. Acad. Sci. 93:5389-5394) y Yu et al. (1997, Appl.

Environ. Microbiol. 63:532-536), describen una clase de proteínas insecticidas denominadas VIP3. Los genes de VIP3 codifican aproximadamente 88 kDa proteínas que son producidas y secretadas por *Bacillus* durante sus etapas de crecimiento vegetativas. Se informó que estas toxinas son distintas de las delta-toxinas formadoras de cristales. En los documentos mencionados se hace referencia específica a las toxinas denominadas VIP1A(a), VIP1A(b), VIP2A(a), VIP2A(b), VIP3A(a), y VIP3A(b). Véase también Lee et al., *AEM* vol. 69, nro. 8 (agosto de 2003), páginas 4648-4657, para una explicación del mecanismo de acción y truncado de las proteínas VIP.

[0007] La proteína VIP3A posee actividad insecticida contra un amplio espectro de plagas de lepidópteros, que incluyen FAW, CEW, *Agrotis ipsilon* Hufnagel (gusano cortador negro "BCW"), y *Heliothis virescens* Fabricius (gusano de los brotes del tabaco, "TBW"). Más recientemente, se halló que las proteínas VIP son tóxicas para ciertas especies de plagas de insectos hemípteros (Nanasaheb, P. et al, *Toxins* (Basel) vol. 4, nro.6 (Junio de 2012), páginas 405-429, Sattar S. y Maiti M.K., *J. Microbiol. Biotechnol.* 2011, 21:937-946). Por ende, la clase proteínas VIP presentan un espectro único de actividades insecticidas. Otras divulgaciones, WO 98/18932, WO 98/33991, WO 98/00546, y WO 99/57282 han identificado homólogos de la clase de proteínas VIP3.

[0008] El uso continuo de agentes químicos y biológicos para controlar plagas de insectos enfatiza la posibilidad de

que los insectos desarrollen resistencia a tales medidas de control. También, la alta selectividad de agentes de control biológicos con frecuencia resulta en solamente unas pocas plagas de insectos específicas controladas por cada agente. A pesar del éxito del maíz transgénico resistente a ECB, la posibilidad del desarrollo de poblaciones de insectos resistentes amenaza la durabilidad a largo plazo de las proteínas Cry en el control de ECB y crea la necesidad de descubrir y desarrollar nuevos agentes Cry u otros tipos de agentes de control biológicos a los efectos de controlar ECB y otras plagas. La resistencia de los insectos a las proteínas Cry de *Bt* se puede desarrollar a través de varios mecanismos (Heckel et al., 2007, Pigott y Ellar, 2007). Se identificaron múltiples clases de proteínas receptoras para las proteínas Cry dentro de los insectos, y existen múltiples ejemplos dentro de cada clase receptora. La resistencia a una proteína Cry en particular se puede desarrollar, por ejemplo, por medio de una mutación dentro de la porción de unión a toxinas de un dominio de la cadherina de una proteína receptora. Otro medio de resistencia se puede mediar a través de una proteasa de procesamiento de protoxinas. Por ende, la resistencia a las toxinas Cry en especies de lepidópteros posee una base genética compleja, con al menos cuatro genes de resistencia principales distintos. Los insectos lepidópteros resistentes a las proteínas Cry se desarrollaron en el campo dentro de las especies DBM (polilla dorso de diamante) (Tabashnik, 1994),

Trichoplusia ni Hübner (oruga del repollo, "CL"; Janmaat y Myers 2003, 2005), y CEW (Tabashnik et al., 2008). Por lo tanto, el desarrollo y uso de nuevas proteínas plaguicidas de alta potencia incorporadas a los vegetales como, por ejemplo, las aquí descritas, son tanto útiles como así también necesarias.

[0009] Por lo tanto, continúa la necesidad de descubrir nuevos agentes de control de plagas efectivos que provean un beneficio económico a los agricultores y sean aceptables desde el punto de vista ambiental. Se necesitan particularmente los agentes de control que apunten a un amplio espectro de plagas de insectos de importancia económica que controlen eficazmente las poblaciones de insectos que son o podrían tornarse resistentes a los agentes de control de insectos existentes y a aquellos que poseen una potencia igual o mayor en comparación con los agentes de control actuales.

Breve síntesis de la invención

[0010] La presente invención provee toxinas VIP insecticidas, que incluyen la toxina de proteína denominada en la presente DIG-657 así como también variantes de DIG-657, ácidos nucleicos que codifican estas toxinas, métodos para controlar plagas con el uso de las toxinas, métodos para producir las toxinas en células huésped transgénicas, y vegetales transgénicos que expresan las toxinas. La invención además provee constructos de ácidos nucleicos que comprenden

una secuencia de ácidos nucleicos que codifican una proteína insecticida seleccionada del grupo que consta de DIG-657, una variante de DIG-657, y un fragmento de DIG-657. Se describen proteínas insecticidas aisladas seleccionadas del grupo que consta de DIG-657, una variante de DIG-657, un fragmento de DIG-657 y una proteína insecticida que comprende los residuos 206 a 803 de SEQ ID NO:2. Incluso, se describen vegetales, partes de vegetales, y semillas que comprenden una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una proteína seleccionada del grupo que consta de DIG-657, una variante de DIG-657, y un fragmento de DIG-657. Se describe también un método para controlar una población de una plaga de insectos que comprende poner en contacto los individuos de dicha población de plaga con una cantidad efectiva desde el punto de vista plaguicida de un polipéptido que comprende los residuos 206 a 803 de SEQ ID NO:2.

[0011] En una modalidad la invención provee un polipéptido de toxina de insecto DIG-657 aislado que comprende un segmento de toxina núcleo seleccionado del grupo que consta de (a) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de residuos 206 a 803 de SEQ ID NO:2; (b) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que posee al menos 90% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de residuos 206 a 803 de SEQ ID NO:2; (c) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de residuos 206 a 803 de SEQ ID NO:2 con hasta 20 sustituciones, supresiones o

modificaciones de aminoácidos que no afectan perjudicialmente la expresión o actividad de la toxina codificada por la SEQ ID NO:2; o un fragmento activo desde el punto de vista insecticida del mismo.

[0012] En otra modalidad, la invención provee un polipéptido de toxina de insecto DIG-657 aislado que comprende un segmento de toxina núcleo de DIG-657 seleccionado del grupo que consta de (a) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de residuos 1 a 803 de SEQ ID NO:2; (b) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que posee al menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos de residuos 1 a 803 de SEQ ID NO:2; (c) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de residuos 1 a 803 de SEQ ID NO:2 con hasta 20 sustituciones, supresiones o modificaciones de aminoácidos que no afectan perjudicialmente la expresión o actividad de la toxina codificada por la SEQ ID NO:1; o un fragmento del mismo activo desde el punto de vista insecticida; (d) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que posee al menos 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos de residuos 206 a 803 de SEQ ID NO:2 que no afectan perjudicialmente la expresión o actividad de la toxina.

[0013] En otra modalidad, la invención provee plantas fértiles que comprenden una toxina de insecto de DIG-657. La

presente invención además provee un método para producir una planta transgénica tolerante o resistente a los insectos, que comprende introducir una molécula de ácido nucleico de la invención en el vegetal transgénico, donde la molécula de ácido nucleico se puede expresar en el vegetal transgénico en una cantidad efectiva para controlar insectos.

[0014] En otra modalidad, la invención provee un método para controlar una población de plaga que comprende poner en contacto dicha población con una cantidad efectiva desde el punto de vista plaguicida de una toxina de insecto de DIG-657.

[0015] En otra modalidad, la invención provee moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican una toxina de DIG-657 de la invención. Dada una secuencia de aminoácidos para toxinas de DIG-657, las secuencias codificadoras se pueden diseñar mediante traducción inversa de la secuencia de aminoácidos con el uso de codones preferidos por la planta huésped deseada y, posteriormente, el refinamiento de las secuencias con el uso de codones alternativos para retirar las secuencias que podrían ocasionar problemas y proporcionar codones de detención periódicos para eliminar secuencias largas de codificación abierta en los marcos de lectura no codificadores.

[0016] En otra modalidad, la invención provee constructos de ADN que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica una toxina de insecto de DIG-657 unida operativamente a un promotor que no deriva de *Bt* y es capaz de conducir la

expresión en un vegetal. La invención también provee un vegetal transgénico que comprende el constructo de ADN incorporado en forma estable a su genoma y un método para proteger un vegetal contra una plaga que consiste en introducir el constructo en dicho vegetal.

[0017] En incluso otra modalidad, la invención provee un método para producir un vegetal resistente a los insectos o tolerante a los insectos que comprende el fitomejoramiento de un vegetal no transgénico con un vegetal transgénico que comprende un constructo de ADN extraño, capaz de expresar una toxina de DIG-657, incorporada de manera estable en el genoma del vegetal y la selección de la progenie mediante un análisis para al menos una porción del constructo de ADN extraño que emana del vegetal transgénico.

Descripción del dibujo

[0018] La Figura 1 es una imagen de un SDS-PAGE de DIG-657 purificada. Franja 1: marcador de peso molecular; franja 2: DIG-657 de longitud completa purificada 3 µg; franja 3: productos de reacción de DIG-657 luego del tratamiento con tripsina de la proteína de longitud completa purificada (1:10 peso de DIG-657 peso/peso de tripsina) durante 1 hr.

Descripción de las secuencias

[0019] SEQ ID NO:1: Secuencia de ADN que codifica la toxina de insecto de DIG-658 de longitud completa.

- [0020] SEQ ID NO:2: La secuencia de proteína DIG-657 deducida.
- [0021] SEQ ID NO:3: Secuencia de ADN optimizada de maíz que codifica la variante 1 de DIG-657.
- [0022] SEQ ID NO:4: Variante 2 de DIG-657 con codones optimizados para la expresión en *Pseudomonas fluorescens*.
- [0023] SEQ ID NO:5: DIG-657 v4, alto contenido de GC optimizado de maíz.
- [0024] SEQ ID NO:6: DIG-657 v5, alto contenido de GC optimizado de maíz de 205 AA truncado de DIG-657 de terminal N.
- [0025] SEQ ID NO:7: La secuencia de proteínas deducida de SEQ ID NO:6.
- [0026] SEQ ID NO:8: La versión de DIG-657 de longitud completa de codones optimizados de soja de mayor preferencia.
- [0027] SEQ ID NO:9: La versión de DIG-657 truncada de codones optimizados de mayor preferencia de soja.
- [0028] SEQ ID NO:10: Péptido 4 de tránsito de cloroplasto que codifica ADN (Trap4) fusionado a la versión de DIG-657 de longitud completa de codones optimizados de soja de mayor preferencia.

- [0029] SEQ ID NO:11: Secuencia de proteínas deducida de codón más preferido de soja de longitud completa de DIG-657 TraP4.
- [0030] SEQ ID NO:12: Trap 4 fusionada a la versión de DIG-657 truncada optimizada por codones de soja de mayor preferencia.
- [0031] SEQ ID NO:13: Secuencia de proteínas deducida de la versión truncada de DIG-657 de Trap4.

Descripción detallada de la invención

[0032] La presente invención provee toxinas de proteínas insecticidas y métodos para administrar las toxinas que son funcionalmente activas y efectivas contra muchos órdenes de insectos, con preferencia insectos lepidópteros. "Actividad funcional" (o "activo contra") significa que las proteínas funcionan como agentes de control de insectos o toxinas oralmente activas, que las proteínas poseen un efecto tóxico, o pueden interrumpir o impedir el crecimiento o la alimentación de los insectos. Cuando un insecto toma contacto con una cantidad efectiva de una toxina de la presente invención, administrada por medio de la expresión de un vegetal transgénico, composiciones de proteínas formuladas, composiciones de proteínas atomizables, una matriz de cebo u otro sistema de administración, los resultados son generalmente la muerte del insecto, la inhibición del crecimiento o de la proliferación del insecto, o el

impedimento del insecto para alimentarse de la fuente, con preferencia un vegetal transgénico que hace que las toxinas se hallen disponibles para los insectos. Las proteínas funcionales de la presente invención también pueden actuar juntas o solas para potenciar o mejorar la actividad de una o más de otras proteínas de toxina. Los términos "tóxico", "toxicidad", o "toxina" tienen el fin de indicar que las toxinas tienen actividad funcional de acuerdo con lo definido en la presente.

[0033] Se prefiere la letalidad completa para los insectos que se alimentan pero no se requiere para lograr una actividad funcional. Si un insecto evita la toxina o deja de alimentarse, esa circunstancia de evitar la toxina será útil en algunas aplicaciones, aún cuando los efectos sean subletales o la letalidad sea retrasada o indirecta. Por ejemplo, si se desearan vegetales transgénicos resistentes a los insectos, la renuencia de los insectos a alimentarse de los vegetales es tan útil como la toxicidad letal para los insectos ya que el objetivo final es evitar el daño de los vegetales inducido por los insectos.

[0034] Un ácido nucleico que codifica la DIG-657 se descubrió y aisló de la cepa PS46L de *Bt*. Con el término "aislado", los solicitantes indican que las moléculas de ácido nucleico fueron retirados de su ambiente nativo y colocadas en un medioambiente diferente por la mano del hombre. En virtud de la redundancia del código genético, una diversidad de

secuencias de ADN diferentes puede codificar las secuencias de aminoácidos descritas en la presente. Se halla bien dentro del conocimiento de una persona capacitada en la técnica de crear estas secuencias de ADN alternativas que codifican las mismas, o esencialmente las mismas, toxinas una vez conocidas las secuencias de aminoácidos. Se determinó la secuencia de ácidos nucleicos para la región codificadora de longitud completa de DIG-657 (SEQ ID NO:1) y la secuencia de proteínas de longitud completa de DIG-657 (SEQ ID NO:2) se dedujo de la secuencia de ácidos nucleicos. La secuencia de proteínas DIG-657 se consultó contra bases de datos de GenomeQuest "proteína de platino GQ-Pat" y "proteína GQ-Pat GoldPlus", así como también la base de datos de proteínas no redundantes de GenBank. Los homólogos más cercanos conocidos son XMI335 (94% de identidad, WO2013134523-002) y Vip3Ba (74% de identidad, Acceso Nro. AAV70653, Rang et al).

[0035] Las variantes activas de insectos de la toxina de DIG-657 también se describen en la presente y se mencionan en forma colectiva como toxinas de insectos de DIG-657 o sus variantes e incluyen sus fragmentos y formas truncadas. Las variantes individuales de DIG-657 se pueden identificar mediante nomenclatura de DIG específica. Las toxinas DIG-657 son candidatos ideales para usar en el control de plagas de lepidópteros.

[0036] Una propiedad sorprendente de la DIG-657 y sus toxinas variantes es que se halló que son activas contra poblaciones

de ECB y DBM que son resistentes a las toxinas Cry1F y Cry1A. De acuerdo con lo expuesto, las toxinas de DIG-657 son candidatos ideales para controlar y prevenir poblaciones de plagas de lepidópteros resistentes.

[0037] Las toxinas de DIG-657 de la invención son activas contra insectos lepidópteros, con preferencia, contra DBM, ECB, FAW, CEW, CBW, y TBW. Se espera también la actividad insecticida para BCW, CL, *Spodoptera exigua* (gusano del ejército de la remolacha, "BAW"), *Pectinophora gossypiella* (gusano rosa de capullos), *Cochyles hospes* Walsingham (polilla de bandas del girasol), y *Homoeosoma electellum* (polilla de cabeza del girasol).

[0038] Se demostró que la actividad insecticida de DIG-657 producida en *Pseudomonas fluorescens* es activa en las especies de lepidópteros que incluyen ECB; ECB resistente a cry1F (rECB), DBM, DBM resistente a cry1A (rDBM), CEW, BCW, y TBW. La proteína DIG-657 también se sometió a prueba para determinar la actividad en CBW, FAW y FAW resistente a Cry1F (rFAW).

[0039] Este espectro de actividad biológica contra ambas plagas de insectos del maíz y la soja es en gran medida ventajoso. La toxina truncada de tripsina (SEQ ID NO:7) se sometió a prueba contra ECB en un bioensayo y se demostró que es aproximadamente igual en cuanto a la actividad a la DIG-657 de longitud completa, lo cual indica que los primeros 205

aminoácidos en el terminal N de la proteína no se requieren para la actividad biológica.

[0040] La DIG-657 de longitud completa posee un terminal N intacto y cuando se trata con tripsina (1:10 tripsina/DIG-657), la proteína se escinde en dos bandas, una a aproximadamente 65 kDa y otra, a aproximadamente 18 kDa (Figura 1). Además, también se halló presente una DIG-657 pequeña residual, de longitud completa. El análisis de aminoácidos de terminal N del producto escindido de DIG-657 a 65 kDa indicó que el sitio de escisión de tripsina es (205K/S206).

[0041] Las secuencias de nucleótidos que codifican la DIG-657, sus variantes y formas truncadas y fragmentos, se pueden sintetizar y clonar a vectores de plásmidos estándar mediante medios convencionales, o se pueden obtener mediante manipulación por biología molecular estándar de otros constructos que contienen las secuencias de nucleótidos. Se pueden identificar sitios de restricción únicos internos a una región codificadora de DIG-657 y se pueden sintetizar los fragmentos de ADN que comprenden las secuencias entre los sitios de restricción de la región codificadora de DIG-657, donde cada uno de tales fragmentos codifica una supresión, inserción u otra variación específica de DIG-657. Los fragmentos de ADN que codifican los fragmentos de DIG-657 modificados se pueden unir a otros fragmentos de región codificadora de DIG-657 u otros fragmentos de la región

codificadora de Cry o VIP en los sitios de restricción adecuados para obtener una región codificadora que codifica a la proteína deseada de longitud completa DIG-657, suprimida o proteína DIG-657 variante. Por ejemplo, se puede identificar un sitio de reconocimiento de restricción adecuado en el inicio de una primera región codificadora de DIG-657, y un segundo sitio de restricción interno a la región codificadora de DIG-657. La escisión de esta primera región codificadora de DIG-657 en estos sitios de restricción generaría un fragmento de ADN que comprende parte de la primera región codificadora de DIG-657. Un segundo fragmento de ADN flanqueado por sitios de restricción compatibles situados en forma análoga, específicos para otra región codificadora de DIG-657 u otra región codificadora de VIP3 se puede usar en combinación con el primer fragmento de restricción de ADN para construir una variante.

[0042] Anticuerpos antitoxinas. Los anticuerpos para las toxinas descritas en la presente, o los fragmentos de estas toxinas, se pueden preparar mediante procedimientos estándar muy conocidos en la técnica. Estos anticuerpos son útiles para detectar la presencia de toxinas de DIG-657 en tejidos vegetales y una diversidad de otras sustancias. Estos anticuerpos y antisueros son útiles en diversos métodos para detectar las toxinas de DIG-657 reivindicadas de la invención y sus variantes o fragmentos. Se sabe bien que los anticuerpos etiquetados con un grupo informante se pueden usar para

identificar la presencia de antígenos en una diversidad de medios. Los anticuerpos etiquetados con radioisótopos se usaron en ensayos radioinmunes para identificar con gran precisión y sensibilidad la presencia de antígenos en diversos fluidos biológicos. Más recientemente, se usaron anticuerpos etiquetados con enzimas como sustitutos de anticuerpos radioetiquetados en el ensayo ELISA. Asimismo, los anticuerpos inmunorreactivos para la toxina insecticida de *Bt* de la presente invención se pueden unir a una sustancia inmovilizadora como, por ejemplo, un pocillo o partícula de poliestireno, y usar en inmunoensayos a los efectos de determinar si la toxina de *Bt* se halla presente en una muestra de prueba. Los anticuerpos Anti-DIG-657 también se usan para aislar cantidades de toxinas de DIG-657 de sistemas de producción recombinantes o fuentes naturales.

[0043] Expresión transgénica de DIG-657. Las toxinas de proteínas de la presente se pueden "aplicar" o proporcionar para contactar los insectos objetivo de diversas maneras. Por ejemplo, las toxinas de DIG-657 se pueden usar como protectores incorporados a los vegetales en vegetales transgénicos (producidos por el vegetal y presentes en el vegetal) y son muy conocidos en la técnica. La expresión de los genes de la toxina también puede lograr la selectividad en tejidos específicos de los vegetales, como, por ejemplo, en las raíces, hojas, etc. Ello se puede realizar con el uso de promotores específicos de tejidos muy conocidos en la técnica.

[0044] Una modalidad preferida de la presente invención es la transformación de los vegetales con genes que codifican la proteína insecticida de la presente o sus variantes. Los vegetales transformados son resistentes al ataque de una plaga de insectos objetivo en virtud de la presencia de cantidades controladoras de la proteína insecticida de la presente o de sus variantes en las células del vegetal transformado. Mediante la incorporación y expresión de material genético que codifica una toxina de DIG-657 en el genoma de un vegetal consumido por una plaga de insectos en particular, el adulto o las larvas morirán luego de haber consumido el alimento vegetal. Se han transformado muchos miembros de las clasificaciones de monocotiledóneas y dicotiledóneas. Los cultivos agrícolas transgénicos así como también los frutos y vegetales son de interés comercial. Estos cultivos incluyen, en forma no taxativa, maíz, arroz, soja, canola, girasol, alfalfa, sorgo, trigo, algodón, maní, tomates, papas, y similares. Existen numerosas técnicas muy conocidas para introducir material genético extraño en células de vegetales monocotiledóneos o dicotiledóneos y para obtener vegetales fértiles que mantienen y expresan de manera estable el gen introducido.

[0045] En una modalidad preferida, se administra oralmente la DIG-657 o una variante a través de un vegetal transgénico que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que expresa una toxina de la presente invención. La presente invención provee

un método para producir un vegetal transgénico resistente a los insectos, que comprende introducir una molécula de ácido nucleico de la invención en el vegetal, en donde la toxina se puede expresar en el vegetal transgénico en una cantidad efectiva para controlar un insecto. En un ejemplo no taxativo, una estrategia básica de clonación puede ser la subclonación de secuencias codificadoras de DIG-657 de longitud completa o modificada en un plásmido de expresión vegetal en los sitios de restricción de *NcoI* y *SacI*. Las casetes de expresión de vegetal resultantes que contienen la región codificadora adecuada de DIG-657 bajo el control de los elementos de expresión del vegetal (por ejemplo, promotores expresables en plantas, terminación de la transcripción de terminal 3', determinantes de la adición de poliadenilato, y similares) se subclonan en un plásmido de vector binario, con el uso, por ejemplo, de tecnología Gateway® o procedimientos estándar de clonación de fragmentos de enzimas de restricción. Se puede usar, por ejemplo, LR Clonase™ (Invitrogen, Carlsbad, CA) para recombinar las casetes de expresión vegetal de genes modificados y de longitud completa en un plásmido binario de transformación de vegetales si se utiliza la tecnología Gateway®. Es conveniente emplear un vector binario de transformación de vegetales que aloja un gen bacteriano que otorga resistencia al antibiótico espectinomycin cuando el plásmido se halla presente en las células de *E. coli* y *Agrobacterium*. Es conveniente incluso emplear un plásmido

binario de vector que contiene un gen marcador seleccionable expresable en vegetales que es funcional en los vegetales huésped deseados. Los ejemplos de genes marcadores seleccionables, expresables en vegetales, incluyen, en forma no taxativa, aquellos que codifican el gen de aminoglucósido fosfotransferasa (*aphII*) de transposón Tn5, que otorga resistencia al antibiótico kanamicina, neomicina y G418, así como también aquellos que codifican la resistencia o tolerancia a los herbicidas glifosato; higromicina; metotrexato; fosfinotricina (Bialaphos), imidazolinonas, sulfonilureas y triazolopirimidina, como, por ejemplo, clorosulfuron, bromoxinil, dalapon y similares.

[0046] Alternativamente, la estructura de plásmido del vector binario de transformación de vegetales que contiene al gen de la DIG-657 inserto se realiza mediante mapeo de huellas digitales de digestión de restricción del ADN de plásmido preparado a partir de aislados de *Agrobacterium* candidato mediante métodos de biología molecular estándar muy conocidos por los expertos en la técnica de la manipulación de *Agrobacterium*.

[0047] Los expertos en la técnica de obtención de vegetales transformados con métodos de transformación mediada por *Agrobacterium* entenderán que es posible utilizar otras cepas de *Agrobacterium* además de la Z707S y que la elección de la cepa puede depender de la identidad de la especie vegetal huésped que se desee transformar.

[0048] Bioensayos de *Arabidopsis* transgénica de insectos. Se pueden usar proteínas DIG-657 modificadas que expresan líneas transgénicas de *Arabidopsis* para demostrar la actividad contra especies de insectos sensibles en ensayos de superposición de dietas artificiales. La proteína extraída de líneas transgénicas y no transgénicas de *Arabidopsis* se puede cuantificar mediante métodos adecuados y volúmenes de muestra ajustados para normalizar la concentración de proteínas. Los bioensayos se realizan entonces sobre una dieta artificial de acuerdo con lo descrito a continuación. Se deberían incluir en los ensayos como tratamientos de control antecedentes *Arabidopsis* no transgénica y/o tampón y agua.

[0049] Bioensayos para maíz transgénico. La bioactividad de las toxinas de DIG-657 y las variantes producidas en células vegetales también se puede demostrar mediante métodos de bioensayos convencionales (véase, por ejemplo, Huang *et al.*, 2006). La eficacia se puede probar mediante la alimentación de diversos tejidos vegetales o trozos de tejido derivados de un vegetal que produce una toxina de DIG-657 a los insectos objetivo en un medioambiente de alimentación controlada. Alternativamente, se pueden preparar extractos de proteínas a partir de diversos tejidos vegetales derivados de un vegetal que produce la toxina de DIG-657 y se pueden incorporar las proteínas extraídas en un bioensayo de dieta artificial. Ha de entenderse que los resultados de estos ensayos de alimentación se deberán comparar con bioensayos realizados de manera

similar que emplean tejidos de control adecuados de vegetales huésped que no producen la proteína DIG-657 o sus variantes, o con otras muestras de control.

[0050] Toxinas de DIG-657 y variantes activas desde el punto de vista insecticida. Además de la toxina de DIG-657 de longitud completa de SEQ ID NO:2, la invención comprende variantes activas en cuanto al punto de vista insecticida de SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:11, o SEQ ID NO:13. Con el término "variante", los solicitantes pretenden incluir ciertos mutantes de inserción, sustitución y supresión. Un fragmento de DIG-657 es cualquier secuencia de proteínas que se halla en la SEQ ID NO:2, que es inferior a la secuencia de aminoácidos de DIG-657 de longitud completa y que posee propiedades insecticidas. Los fragmentos de variantes de DIG-657 también se contemplan como parte de la invención y se definen como fragmentos de la DIG-657 que contienen ciertos mutantes de supresión, sustitución e inserción descritos en la presente y que poseen actividad insecticida. Como prefacio de la descripción de las variantes de las toxinas de DIG-657 que se incluyen en la invención, será útil revisar brevemente la arquitectura de las toxinas de proteínas DIG-657.

[0051] Variantes de DIG-657 creadas mediante una cantidad limitada de supresiones, sustituciones, o adiciones de aminoácidos. Las supresiones, sustituciones y adiciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2 se pueden realizar fácilmente de manera secuencial y los efectos

de esas variaciones sobre la actividad insecticida se puede someter a prueba con un bioensayo. Siempre que la cantidad de cambios sea limitada, la prueba no comprende una experimentación irrazonable. La invención incluye también variantes activas desde el punto de vista insecticida del segmento de la toxina núcleo (aminoácidos 206-803 de SEQ ID NO:2, o en el que se han realizado hasta 10, 15, o 20 adiciones, supresiones o sustituciones de aminoácidos independientes).

[0052] Las variantes se pueden realizar produciendo mutaciones aleatorias o se pueden diseñar las variantes. En el caso de mutantes diseñados, existe una alta probabilidad de generar variantes con actividad similar a la toxina nativa cuando la identidad de los aminoácidos se mantiene en regiones esenciales de la toxina que dan cuenta de la actividad biológica o están comprendidas en la determinación de la configuración tridimensional que finalmente es responsable de la actividad biológica. Una alta probabilidad de retención de la actividad se producirá también si las sustituciones son conservadoras. Los aminoácidos se pueden colocar en las siguientes clases: no polar, polar no cargada, básica, y ácida. Las sustituciones conservadoras mediante las cuales un aminoácido de una clase se reemplaza con otro aminoácido del mismo tipo son menos probables de alterar materialmente la actividad biológica de la variante. La Tabla 1 provee un

listado de ejemplos de aminoácidos que pertenecen a cada clase.

Tabla 1

Clase de aminoácido	Ejemplos de aminoácidos
Cadenas laterales no polares	Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Met (M), Phe (F), Trp (W)
Cadenas laterales polares, no cargadas	Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q)
Cadenas laterales ácidas	Asp (D), Glu (E)
Cadenas laterales básicas	Lys (K), Arg (R), His (H)
Cadenas laterales beta-ramificadas	Thr, Val, Ile
Cadenas laterales aromáticas	Tyr, Phe, Trp, His

[0053] Las proteínas plaguicidas de la presente invención están codificadas por una secuencia de nucleótidos lo suficientemente idéntica a la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:1, o las proteínas plaguicidas son suficientemente idénticas a la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO:2. "Suficientemente idéntico" se refiere a una secuencia de aminoácidos o nucleótidos que posee al menos aproximadamente 60% o 65% de identidad de secuencia, aproximadamente 70% o 75% de identidad de secuencia, aproximadamente 80% o 85% de identidad de secuencia, aproximadamente 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad de secuencia en comparación con una secuencia de referencia con el uso de uno de los programas de alineamiento descritos en la presente con parámetros estándar. Un experto en la técnica reconocerá que estos

valores se pueden ajustar de manera adecuada para determinar la identidad correspondiente de proteínas codificadas por dos secuencias de nucleótidos tomando en cuenta la degeneración de codones, la similitud de aminoácidos, el posicionamiento del marco de lectura, y similares.

[0054] A los efectos de determinar el porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos o de dos ácidos nucleicos, las secuencias se alinean para fines de comparación óptima. El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función de la cantidad de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, porcentaje de identidad = cantidad de posiciones idénticas/cantidad total de posiciones (por ejemplo, posiciones superpuestas) x 100). En una modalidad, las dos secuencias tienen la misma longitud. En otra modalidad, el porcentaje de identidad se calcula a través de toda la secuencia de referencia. El porcentaje de identidad entre dos secuencias se puede determinar con técnicas similares a las descritas a continuación, con o sin la posibilidad de espacios. Cuando se calcula el porcentaje de identidad, generalmente se cuentan las coincidencias exactas. Un espacio, (una posición en un alineamiento en donde un residuo se halla presente en una secuencia pero no se halla presente en la otra) se considera como una posición con residuos no idénticos.

[0055] La determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias se puede realizar con el uso de un algoritmo

matemático. Un ejemplo no limitativo de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de dos secuencias es el algoritmo de Karlin y Altschul (1990) *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 87:2264, modificado como en Karlin y Altschul (1993) *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 90:5873-5877. Este algoritmo se incorpora en los programas BLASTN y BLASTX de Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403. Las búsquedas BLAST de nucleótidos se pueden realizar con el programa BLASTN, puntaje = 100, longitud de palabra = 12, para obtener secuencias de nucleótidos homólogas a las moléculas de ácido nucleico tipo plaguicidas de la invención. Las búsquedas de proteínas BLAST se pueden realizar con el programa BLASTX, puntaje = 50, longitud de palabra = 3, para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a las moléculas de proteínas plaguicidas de la invención. A los efectos de obtener alineamientos con espacios para fines comparativos, se puede utilizar Gapped BLAST (BLAST con espacios) (en BLAST 2.0) de acuerdo con lo descrito en Altschul et al. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389. Alternativamente, se puede usar PSI-Blast para realizar una búsqueda iterada que detecta relaciones distantes entre moléculas. Véase Altschul et al. (1997) *supra*. Cuando se utilizan los programas BLAST, Gapped BLAST, y PSI-Blast, se pueden usar los parámetros predeterminados de los programas respectivos (por ejemplo, BLASTX y BLASTN). El alineamiento se puede realizar también manualmente mediante inspección.

[0056] Otro ejemplo no limitativo de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de secuencias es el algoritmo ClustalW (Higgins et al. (1994) *Nucleic Acids Res.* 22:4673-4680). ClustalW compara secuencias y alinea la totalidad de la secuencia de aminoácidos o ADN y, de este modo, puede proporcionar datos sobre la conservación de secuencias de toda la secuencia de aminoácidos. El algoritmo ClustalW se utiliza en varios paquetes de software de análisis de ADN/aminoácidos disponibles en el comercio, como, por ejemplo, el módulo ALIGNX de la suite de programas Vector NTI Program Suite (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA). Luego del alineamiento de secuencias de aminoácidos con ClustalW, es posible estimar el porcentaje de identidad de aminoácidos. Un ejemplo no limitativo de un programa de software útil para el análisis de los alineamientos ClustalW es GENEDOC™. GENEDOC™ (Karl Nicholas) permite estimar la similitud e identidad de los aminoácidos (o ADN) entre múltiples proteínas. Otro ejemplo no limitativo de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de secuencias es el algoritmo de Myers y Miller (1988) *CABIOS* 4(1):11-17. Este algoritmo se halla incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0), que es parte del paquete de software de GCG Wisconsin Genetics, Versión 10 (disponible de Accelrys, Inc., San Diego, CA, Estados Unidos). Cuando se utiliza el programa ALIGN para comparar secuencias de aminoácidos, se puede usar una tabla de residuos de peso PAM120, una penalidad de longitud de espacio de 12, y una

penalidad de espacio de 4. A menos que se indique otra cosa, la versión 10 de GAP, que usa el algoritmo de Needleman y Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48(3):443-453, se usará para determinar la identidad o similitud de secuencias con el uso de los siguientes parámetros: % de identidad y % de similitud para una secuencia de nucleótidos con el uso de un peso de GAP (espacio) de 50 y un peso de longitud de 3, y la matriz de puntuación nwsgapdna.cmp; % de identidad o % de similitud para una secuencia de aminoácidos con el uso de un peso de GAP de 8 y un peso de longitud de 2, y el programa de puntuación BLOSUM62. Se pueden usar programas equivalentes. Con la expresión "programa equivalente" se pretende indicar cualquier programa de comparación de secuencias que, para dos secuencias cualesquiera en cuestión, genera un alineamiento que posee coincidencias idénticas de residuos de nucleótidos y un porcentaje idéntico de identidad de secuencia cuando se compara con el alineamiento correspondiente generado por GAP, versión 10.

[0057] Variantes de la sensibilidad de proteasa. Las proteínas VIP3, que incluyen DIG-657, se pueden truncar proteolíticamente desde aproximadamente 88 kDa de tamaño a un producto de aproximadamente 66 kDa de tamaño. La proteína de 66 kDa comprende los residuos de aminoácidos 206-803. Las proteasas del intestino de los insectos generalmente funcionan ayudando al insecto a obtener los aminoácidos necesarios de una proteína dietética. Las proteasas digestivas de insectos

que mejor se entienden son las serina proteasas, que surgen como el tipo más común (Englemann y Geraerts (1980), particularmente en las especies de lepidópteros. Los insectos coleópteros poseen intestinos que son más neutros a ácidos que los intestinos de los lepidópteros. La mayoría de las larvas y adultos de coleópteros, por ejemplo, el escarabajo la papa del Colorado (CPB), poseen intestinos medios levemente ácidos, y las cisteína proteasas proveen la principal actividad proteolítica (Wolfson y Murdock, 1990). Más precisamente, Thie y Houseman (1990) identificaron y caracterizaron las cisteína proteasas, tipo catepsina B y tipo catepsina H, y la aspartil proteasa, tipo catepsina D, en CPB. Gillikin *et al.* (1992) caracterizó la actividad proteolítica en los intestinos de las larvas de WCR y halló principalmente cisteína proteasas. La patente de invención estadounidense nro. 7.230.167 divulgó que una actividad de proteasa atribuida a la catepsina G existe en WCR. La diversidad y los diferentes niveles de actividad de las proteasas de los intestinos de los insectos pueden influir en la sensibilidad del insecto a una toxina de *Bt* en particular.

[0058] En otra modalidad de la invención, se pueden diseñar sitios de escisión de proteasas en ubicaciones deseados para afectar el procesamiento de las proteínas dentro del intestino medio de larvas susceptibles de ciertas plagas de insectos. Estos sitios de escisión de proteasas se pueden introducir mediante métodos como, por ejemplo, síntesis química de genes

o PCR de superposición de empalmes (Horton *et al.*, 1989). Las secuencias de reconocimiento de serina proteasas, por ejemplo, se pueden insertar opcionalmente en sitios específicos en la estructura de proteína de Cry para afectar el procesamiento de las proteínas en puntos de supresión deseados dentro del intestino medio de las larvas susceptibles. Las serina proteasas que se pueden explotar de ese modo incluyen las serina proteasas del intestino medio de los lepidópteros como, por ejemplo, las enzimas tripsina o tipo tripsina, quimotripsina, elastasa, etc. (Christeller *et al.*, 1992). Además, los sitios de supresión identificados empíricamente mediante la secuenciación de productos de digestión de proteínas Cry generados con preparaciones de proteasas del intestino medio de larvas no fraccionadas o mediante la unión a vesículas de la membrana limítrofe en forma de cepillo se pueden diseñar para efectuar la activación de las proteínas. Las proteínas Cry o VIP3 modificadas, se generaron mediante una supresión génica o la introducción de sitios de escisión de proteasas que poseen una actividad mejorada sobre plagas de lepidópteros, que incluyen ECB, CEW, CBW, BCW, FAW, BAW, *Diatraea grandiosella*, *Diatraea saccharalis*, *Loxagrotis albicosta*, y otras plagas objetivo.

[0059] Las serina proteasas de lepidópteros y coleópteros como, por ejemplo, tripsina, quimotripsina y proteasa tipo catepsina G, las cisteína proteasas de lepidópteros y coleópteros como, por ejemplo, catepsinas (proteasas tipo B,

tipo L, tipo O, y tipo K) (Koiwa *et al.*, (2000) y Bown *et al.*, (2004)), metaloproteasas de lepidópteros y coleópteros como, por ejemplo, ADAM10 (Ochoa-Campuzano *et al.*, (2007)), y las proteasas de ácido aspártico de lepidópteros y coleópteros como, por ejemplo, tipo catepsinas D y tipo E, pepsina, plasmepsina, y quimosina se pueden explotar más aún mediante el diseño de secuencias de reconocimiento adecuadas en sitios de procesamiento deseados para afectar el procesamiento de las proteínas Cry en el intestino medio de las larvas susceptibles de ciertas plagas de insectos y, quizá también funcionen para proporcionar actividad contra plagas de insectos no susceptibles.

[0060] Las variantes de DIG-657 producidas mediante la introducción o eliminación de sitios de procesamiento de las proteasas en porciones adecuadas en la secuencia codificadora para permitir o eliminar la escisión proteolítica de una proteína variante más grande por las proteasas de insectos, vegetales o microorganismos se hallan dentro del alcance de la invención. Se entiende que el resultado final de esa manipulación es la generación de moléculas de fragmentos de toxinas que poseen la misma actividad o una mejor actividad que la de la proteína de toxina intacta (de longitud completa).

[0061] Las aplicaciones de atomización constituyen otro ejemplo y también se conocen en la técnica. Las proteínas de la presente se pueden formular adecuadamente para el uso final

deseado y luego atomizarse (o aplicarse de otro modo) sobre el vegetal y/o alrededor del vegetal y/o en las cercanías del vegetal que se desea proteger, antes de descubrir la infestación, luego de haberse descubierto a los insectos objetivo, tanto antes como después de tal descubrimiento, y similares. Es posible utilizar incluso, por ejemplo, gránulos de cebos y son conocidos en la técnica.

[0062] Cuando un insecto entra en contacto con una cantidad efectiva de toxina administrada mediante la expresión de un vegetal transgénico, composiciones formuladas de proteínas, composiciones atomizables de proteínas, una matriz de cebos u otro sistema de administración, generalmente los resultados son la muerte del insecto o los insectos no se alimentan de la fuente que torna disponible las toxinas para los insectos.

[0063] Con huéspedes microbianos adecuados, por ejemplo, *Pseudomonas*, los microbios se pueden aplicar al medioambiente de la plaga, en el que proliferarán y serán ingeridos. El resultado es el control de la plaga. Alternativamente, el microbio que hospeda al gen de toxina se puede tratar en condiciones que prolonguen la actividad de la toxina y estabilicen la célula. La célula tratada, que retiene la actividad tóxica, se puede aplicar luego al medioambiente de la plaga objetivo.

[0064] Desarrollo de sondas de oligonucleótidos. Otro método para identificar las toxinas y los genes de la presente invención es a través del uso de sondas de oligonucleótidos.

Estas sondas son secuencias de nucleótidos detectables. Estas secuencias se pueden hacer detectables en virtud de una etiqueta radioactiva adecuada o se pueden hacer inherentemente fluorescentes de acuerdo con lo descrito, por ejemplo, en la patente de invención estadounidense Nro. 6.268.132. Tal como es de conocimiento en la técnica, si la muestra de ácido nucleico y la molécula de sonda hibridan mediante la formación de fuertes enlaces de apareamiento de bases entre las dos moléculas, se puede asumir razonablemente que la sonda y la muestra poseen una homología sustancial de secuencias. Preferentemente, la hibridación se realiza en condiciones rigurosas mediante técnicas muy conocidas en el arte, de acuerdo con lo descrito, por ejemplo, por Keller y Manak (1993). La detección de la sonda provee un medio para determinar de manera conocida si se produjo la hibridación. Este análisis de la sonda provee un método rápido de identificación de genes codificadores de toxinas de la presente invención. Los segmentos de nucleótidos que se utilizan como sondas de acuerdo con la invención se pueden sintetizar con un sintetizador de ADN y procedimientos estándar. Estas secuencias de nucleótidos también se pueden usar como cebadores de PCR para amplificar los genes de la presente invención.

[0065] Hibridación de ácidos nucleicos. Tal como se halla bien dentro del conocimiento de los expertos en biología molecular, la similitud de dos ácidos nucleicos se pueden

caracterizar por su tendencia a hibridarse. De acuerdo con su uso en la presente, los términos "condiciones rigurosas" o "condiciones de hibridación rigurosas" se refieren a las condiciones en las que una sonda se hibridará (apareará) a su secuencia objetivo hasta un grado detectablemente mayor que otras secuencias (por ejemplo, al menos 2 veces respecto del antecedente). Las condiciones rigurosas son dependientes de la secuencia y serán diferentes en diferentes circunstancias. Al controlar la rigurosidad de las condiciones de hibridación y/o lavado, es posible identificar las secuencias objetivo que tienen un 100% de complementariedad con la sonda (sondeo homólogo). Alternativamente, las condiciones rigurosas se pueden ajustar de manera que permitan alguna falta de coincidencia en las secuencias para que se puedan detectar grados inferiores de similitud (sondeo heterólogo). Generalmente, una sonda tiene menos de aproximadamente 1000 nucleótidos de longitud, con preferencia menos de 500 nucleótidos de longitud.

[0066] Generalmente, las condiciones rigurosas serán aquellas en las que la concentración salina sea inferior a aproximadamente 1,5 M de ión de Na, generalmente de alrededor de 0,01 a 1,0 M de concentración de iones de Na (u otras sales) a pH 7,0 a pH 8,3 y la temperatura sea de al menos aproximadamente 30°C para las sondas cortas (por ejemplo, 10 a 50 nucleótidos) y al menos aproximadamente 60°C para las sondas largas (por ejemplo, de más de 50 nucleótidos). Las

condiciones rigurosas se pueden lograr también con la adición de agentes desestabilizantes como, por ejemplo, formamida. Las condiciones de baja rigurosidad ejemplares incluyen la hibridación con una solución amortiguante de 30% a 35% de formamida, 1 M de NaCl, 1% de SDS (dodecilsulfato de sodio) a 37°C y un lavado en 1X a 2X de SSC (20X SSC = 3,0 M de NaCl/0,3 M de citrato de trisodio) a una temperatura de 50°C a 55°C. Las condiciones de rigurosidad moderada ejemplares incluyen la hibridación en 40% a 45% de formamida, 1,0 M de NaCl, 1% de SDS a 37°C y un lavado en 0,5X a 1X de SSC a una temperatura de 55°C a 60°C. Las condiciones de alta rigurosidad ejemplares incluyen la hibridación en 50% de formamida, 1 M de NaCl, 1% de SDS a 37°C y un lavado en 0,1X de SSC a una temperatura de 60°C a 65°C. Opcionalmente, los tampones de lavado pueden comprender aproximadamente 0,1% a aproximadamente 1% de SDS. La duración de la hibridación es generalmente inferior a aproximadamente 24 horas, generalmente alrededor de 4 a 12 horas.

[0067] La especificidad es generalmente la función de los lavados poshibridación, y los factores esenciales son la fuerza iónica y la temperatura de la solución de lavado final. Para el ADN/híbridos de ADN, el punto de fusión térmica (T_m) es la temperatura (bajo una fuerza iónica definida y pH definido) a la que el 50% de la secuencia objetivo complementaria hibrida a una sonda perfectamente coincidente. El T_m se reduce en aproximadamente 1°C para cada 1% de falta de coincidencia o

apareamiento imperfecto; por ende, el T_m , las condiciones de hibridación y/o las condiciones de lavado se pueden ajustar para facilitar el apareamiento de las secuencias de la identidad deseada. Por ejemplo, si se pretenden secuencias con >90% de identidad, el T_m se puede disminuir 10°C. Generalmente, las condiciones rigurosas se seleccionan de manera que sean aproximadamente 5°C menores que el T_m para la secuencia específica y su complemento a una fuerza iónica definida y pH definido. Sin embargo, las condiciones altamente rigurosas pueden utilizar una hibridación y/o un lavado a 1°C, 2°C, 3°C, o 4°C menos que el T_m ; las condiciones moderadamente rigurosas pueden utilizar una hibridación y/o un lavado a 6°C, 7°C, 8°C, 9°C, o 10°C menos que el T_m , y las condiciones de baja rigurosidad pueden utilizar una hibridación y/o un lavado a 11°C, 12°C, 13°C, 14°C, 15°C, o 20°C menos que el T_m .

[0068] El T_m (en °C) se puede determinar experimentalmente o se puede aproximar mediante un cálculo. Para el ADN-híbridos de ADN, el T_m se puede aproximar a partir de la ecuación de Meinkoth y Wahl (1984): $T_m(^{\circ}\text{C}) = 81,5^{\circ}\text{C} + 16,6(\log M) + 0,41(\% \text{GC}) - 0,61(\% \text{ de formamida}) - 500/L$; donde M es la molaridad de cationes monovalentes, % de GC es el porcentaje de nucleótidos de citosina y guanosina en el ADN, % de formamida es el porcentaje de formamida en la solución de hibridación, y L es la longitud del híbrido en pares de base. Alternativamente, el T_m se describe mediante la siguiente fórmula (Beltz et al., 1983): $T_m(^{\circ}\text{C}) = 81,5^{\circ}\text{C} +$

$16,6(\log[\text{Na}^+]) + 0,41(\%GC) - 0,61(\% \text{ de formamida}) - 600/L$,
donde $[\text{Na}^+]$ es la molaridad de los iones de sodio, % de GC es el porcentaje de nucleótidos de guanosina y citosina en el ADN, % de formamida es el porcentaje de formamida en la solución de hibridación, y L es la longitud del híbrido en pares de bases.

[0069] Con el uso de las ecuaciones, las composiciones de hibridación y lavado y el T_m deseado, aquellas personas de conocimiento común entenderán que se hallan descriptas en forma inherente variaciones en la rigurosidad de las soluciones de hibridación y/o lavado. Si el grado deseado de apareamiento imperfecto resulta en un T_m de menos de 45°C (solución acuosa) o 32°C (solución de formamida), se prefiere aumentar la concentración de SSC de manera que se pueda usar una mayor temperatura. Una guía extensiva para la hibridación de ácidos nucleicos se halla en *Hybridization with Nucleic Acid Probes* (Hibridación con Sondas de Ácido Nucleico), Tomo 1, de P. Tijssen (1993, ISBN-10: 0444898840, ISBN-13: 9780444898845 Hardcover) y Ausubel *et al.* (1995). Véase también Sambrook *et al.* (1989).

EJEMPLOS

EJEMPLO 1

[0070] Construcción de plásmidos de expresión que codifican la toxina insecticida DIG-657 y expresión en huéspedes bacterianos. Se usaron métodos de clonación estándar en la

construcción de plásmidos de expresión de *Pseudomonas fluorescens* (Pf) diseñados para producir proteínas DIG-657 de longitud completa codificadas por secuencias codificadoras optimizadas de vegetales. Se obtuvieron endonucleasas de restricción y ligasa de ADN T4 de New England BioLabs (NEB; Ipswich, MA) para la digestión de restricción y ligamiento de ADN, respectivamente. Las preparaciones de los plásmidos se realizaron con el conjunto de plásmidos NucleoSpin® (Macherey-Nagel Inc, Bethlehem, PA) de acuerdo con las instrucciones de los proveedores para la purificación de plásmidos de copia baja. Los fragmentos de ADN se purificaron con un conjunto de extracción con gel QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen, Venio, Limburg) luego de una electroforesis de gel de Tris-acetato de agarosa.

[0071] El gen que codifica la DIG-657 se amplificó a partir de la cepa progenitora de *Bt* PS46L/DBt11889 con el uso de cebadores específicos de genes que contenían sitios de restricción específicos para la clonación. El producto resultante de la reacción en cadena de polimerasa de DIG-657 (PCR) se clonó luego a un vector de expresión de *Pseudomonas fluorescens* pDOW1169 mediante un método de clonación por ligamiento tradicional.

[0072] La estrategia de clonación básica comprendió la subclonación de la secuencia codificadora de la toxina de DIG-657 (CDS, por sus siglas en inglés) (SEQ ID NO:1) a pDOW1169 en los sitios de restricción de *SpeI* y *SalI*, mediante lo cual

se coloca bajo el control de la expresión del promotor de *Ptac* y el terminador de *rrnBT1T2* del plásmido pKK223-3 (PL Pharmacia, Milwaukee, WI). pDOW1169 es un plásmido de copia media con el origen de replicación de RSF1010, un gen *pyrF*, y un sitio de unión a ribosomas que precede a los sitios de reconocimiento de enzimas de restricción en los que se pueden introducir los fragmentos de ADN que contienen regiones codificadoras de proteínas (Solicitud estadounidense 20080193974). El plásmido de expresión, denominado pDOW1169, se transformó mediante electroporación en DC454 (una cepa cercana de tipo silvestre de *P. fluorescens* que posee mutaciones *deltapyrF* y *lsc::lacI^{QI}*), o sus derivados, recuperado en un medio de hidrolizado de SOC-Soja, y se colocó en una placa en el medio selectivo (uracilo carente de M9 glucosa de agar, Sambrook *et al.*, *supra*). Los detalles de las manipulaciones microbiológicas se hallan disponibles en Squires *et al.*, (2004), solicitud de patente de invención estadounidense 20060008877, solicitud de patente de invención estadounidense 20080193974, y solicitud de patente de invención estadounidense 20080058262, incorporadas a la presente por referencia. Las colonias se cribaron primero por digestión de restricción del ADN de plásmido miniprep. El ADN de plásmido de clones seleccionados que contenían la toxina de DIG-657 se digirió con cuatro enzimas de restricción y la secuencia se verificó para validar más aún la presencia del inserto.

EJEMPLO 2

[0073] Análisis del crecimiento y la expresión en matraces de agitación. La producción de la toxina de DIG-657 para el bioensayo de caracterización e insectos se realizó mediante constructos de expresión (pDOW1169) que hospedan a las cepas de *P. fluorescens* que crecieron en matraces de agitación. Se inoculó un acervo de glicero de cultivo de DIG-657 (0,5 mL) en 50 mL de medio de producción definido con 9,5% de glicerol (catálogo de Teknova Nro. 3D7426, Hollister, CA). La expresión del gen de toxina de DIG-657 mediante el promotor de *Ptac* se indujo con la adición de isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosida (IPTG) luego de una incubación inicial de 24 horas a 30°C con agitación. Los cultivos se muestrearon en el momento de la inducción y en diversos momentos luego de la inducción. La densidad celular se midió por densidad óptica a 600 nm (OD₆₀₀). Es posible también utilizar otros medios de cultivo adecuados para el crecimiento de *Pseudomonas fluorescens*, por ejemplo, de acuerdo con lo descrito por Huang *et al.* (2007) y en la solicitud de patente de invención estadounidense 20060008877.

EJEMPLO 3

[0074] Transformación por *Agrobacterium*. Se usaron métodos de clonación estándar en la construcción de plásmidos binarios de expresión y transformación de vegetales. Las endonucleasas de restricción y la ligasa de ADN T4 se obtuvieron de NEB. Las preparaciones de los plásmidos se realizaron con el conjunto

de preparación de plásmidos NucleoSpin® o el conjunto NucleoBond® AX Xtra Midi (ambos de Macherey-Nagel, Duren, Alemania), de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes. Los fragmentos de ADN se purificaron con un conjunto de purificación por PCR QIAquick® o el conjunto de extracción de gel QIAEX II® (ambos de Qiagen Venio, Limburg) luego del aislamiento del gel.

[0075] Las células electrocompetentes de la cepa Z707S de *Agrobacterium tumefaciens* (un derivado de la Z707 resistente a la estreptomycin; Hepburn *et al.*, 1985) se prepararon y transformaron por electroporación (Weigel y Glazebrook, 2002). Luego de la electroporación, se agregaron 1 mL de caldo de peptona de extracto de levadura (YEP, por sus siglas en inglés) (10 gm/L de extracto de levadura, 10 gm/L de peptona, y 5 gm/L de NaCl) a la cubeta y la suspensión de célula-YEP se transfirió a un tubo de cultivo de 15 mL para la incubación a 28°C en un baño de agua con agitación constante durante 4 horas. Las células se colocaron en placas sobre YEP más agar (25 gm/L) con espectinomicina (200 µg/mL) y estreptomycin (250 µg/mL) y las placas se incubaron durante 2-4 días a 28°C. Se seleccionaron colonias individuales separadas de los pocillos y se colocaron formando bandas sobre placas nuevas de YEP + agar con espectinomicina y estreptomycin como se describió anteriormente y se incubaron a 28°C durante 1-3 días.

[0076] La presencia del inserto de gen de DIG-657 en el vector binario de transformación de vegetal se determinó mediante un análisis por PCR con cebadores específicos de vectores con ADN de plásmido de plantilla preparado a partir de colonias seleccionadas de *Agrobacterium*. La pella celular de una fracción de 4 mL de un cultivo de 15 mL que creció durante la noche en YEP con espectinomicina y estreptomicina como se indicó anteriormente, se extrajo con el uso de minipreparaciones Spin® de Qiagen (Venlo, Limburg, Holanda), realizadas de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ADN de plásmido del vector binario utilizado en la transformación por electroporación de *Agrobacterium* se incluyó como control. La reacción de PCR se completó con el uso de ADN polimerasa Taq de Invitrogen (Carlsbad, CA) según las instrucciones del fabricante a concentraciones de 0,5X. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un ciclador térmico de MJ Research Peltier, programado con las siguientes condiciones: Paso 1) 94°C durante 3 minutos; Paso 2) 94°C durante 45 segundos; Paso 3) 55°C durante 30 segundos; Paso 4) 72°C durante 1 minuto por kb de longitud de producto extraído; Paso 5) 29 veces hasta el paso 2; Paso 6) 72°C durante 10 minutos. La reacción se mantuvo a 4°C luego del ciclado. Los productos de la amplificación se analizaron con una electroforesis de gel de agarosa (por ejemplo, 0,7% a 1% de agarosa, p/v) y se visualizaron mediante un manchado con

bromuro de etidio. Se seleccionó una colonia cuyo producto de PCR fue idéntico al control de plásmido.

EJEMPLO 4

[0077] Producción de DIG-657. Las células de cepas de *P. fluorescens* que crecieron en matraces de agitación que hospedaban constructos de expresión (pDOW1169) se aislaron mediante centrifugación y las pellas celulares resultantes se congelaron a -80°C . Las fracciones solubles e insolubles de muestras de pellas celulares congeladas de los matraces de agitación se generaron con la solución de extracción de proteínas bacterianas EasyLyse™ (EPICENTRE® Biotechnologies, Madison, WI). Cada pella celular se suspendió en 1 mL de solución EasyLyse™ y se diluyeron más aún en tampón de lisis 1:4 y se incubaron 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 fracción soluble. La pella (fracción insoluble) se suspendió luego en un volumen equivalente de solución salina tamponada con fosfato (PBS; 11,9 mM de Na_2HPO_4 , 137 mM de NaCl, 2,7 mM de KCl, pH 7,4).

[0078] Las muestras se mezclaron 1:1 con 2X de tampón de la muestra Laemmli que contenía β -mercaptoetanol (Sambrook et al., supra.) y se dejaron bullir durante 5 minutos antes de cargarse en geles al 12% de Bis-Tris Criterion XT® (Bio-Rad Inc., Hercules, CA). Se realizó una electroforesis en el

tampón de XT MOPS recomendado. Los geles se mancharon con una mancha de Bio-Safe Coomassie (Bio-Rad, Richmond, CA) de acuerdo con el protocolo del fabricante y se analizaron por imágenes con el uso del sistema Alpha Innotech Imaging system (San Leandro, CA).

EJEMPLO 5

[0079] Preparación del cuerpo de inclusión. La DIG-657 se ubicó generalmente en la fracción soluble de células de *P. fluorescens* que contenían el gen para DIG-657. En algunos casos, un porcentaje variable de la proteína DIG-657 se halló ubicada en las preparaciones del cuerpo de inclusión de proteínas (IB, por sus siglas en inglés), de acuerdo con lo demostrado mediante SDS-PAGE y MALDI-MS (Espectrometría de masa por ionización/desorción de láser asistida por matriz). A los efectos de aislar esta proteína de esta fracción, se descongelaron las pellas de fermentación de *P. fluorescens* en un baño de agua a 37°C. Las células resuspendidas hasta un 25% p/v en tampón de lisis (50 mM de Tris, pH 7,5, 200 mM de NaCl, 20 mM de sal de disodio de EDTA (ácido etilendiamintetraacético), 1% de Triton X-100, y 5 mM de Ditiotreititol (DTT)); 5 mL/L de cóctel inhibidor de proteasa bacteriana (P8465 Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) se agregaron justo antes de usar. Las células se resuspendieron con un homogenizador manual en la configuración más baja (Tissue Tearor, BioSpec Products, Inc., Bartlesville, OK). Se agregó

lisozima (25 mg de Sigma, St. Louis, MO, L7651 de clara de huevo de pollo) a la suspensión celular mediante mezcla con una espátula de metal y la suspensión se incubó a temperatura ambiente durante una hora. La suspensión se enfrió en hielo durante 15 minutos, luego se sonicó con un sonificador Branson (Danbury, CT) 250 (dos sesiones de 1 minuto cada una, a 50% de ciclo de trabajo, rendimiento del 30%). Se revisó la lisis celular con un microscopio. Se agregaron otros 25 mg adicionales de lisozima si era necesario y se repitieron los pasos de incubación y sonicación. Cuando se confirmó la lisis celular con un microscopio, el lisado se centrifugó a 11.500 x g durante 25 minutos (4°C) para formar la pella de IB, y el sobrenadante se desechó. La pella de IB se resuspendió con 100 mL de tampón de lisis, se homogenizó con el mezclador manual y se centrifugó del modo indicado anteriormente. La pella de IB se lavó repetidamente mediante resuspensión (en 50 mL de tampón de lisis), homogenización, sonicación, y centrifugación hasta que el sobrenadante se tornó incoloro y la pella de IB se tornó firme y de apariencia blancuzca. Para el lavado final, la pella de IB se resuspendió en agua destilada filtrada estéril (0,22 µm) que contenía 2 mM de EDTA, y se centrifugó. La pella final se resuspendió en agua destilada filtrada estéril que contenía 2 mM de EDTA, y se almacenó en fracciones de 1 mL a -80°C.

[0080] El análisis SDS-PAGE y la cuantificación de la proteína en las preparaciones de IB se realizaron mediante el

descongelamiento de una fracción de 1 mL de pella de IB y la dilución de 1:20 con agua destilada filtrada estéril. La muestra diluida se hizo bullir luego con 4X de tampón de muestra reductor [250 mM de Tris, pH 68, 40% de glicerol (v/v), 0,4% de bromofenol azul (p/v), 8% SDS (p/v) y 8% de β -Mercapto-etanol (v/v)] y se cargó en un gel de pocillo 12+2, de 4-20% de Tris-glicina Novex® 4-20% (Invitrogen, Carlsbad, CA) ejecutado con 1X de tampón de Tris/Glicina/SDS (BioRad, Richmond, CA). El gel se ejecutó durante 60 min a 200 voltios, luego se manchó con Coomassie Blue (50% G-250/50% R-250 en 45% de metanol, 10% de ácido acético), y se desmanchó con 7% de ácido acético, 5% de metanol en agua destilada. La cuantificación de bandas objetivo se realizó comparando valores densitométricos para las bandas contra muestras de albúmina de suero bovino (BSA) ejecutadas sobre el mismo gel para generar una curva estándar.

EJEMPLO 6

[0081] Solubilización de cuerpos de inclusión. Se centrifugaron seis mL de suspensión de cuerpo de inclusión (que contenía 32 mg/mL de proteína DIG-657) en la configuración más alta de un microfugo Eppendorf, modelo 5415C (aproximadamente 14.000 x g) para formar pellas de las inclusiones. El sobrenadante de tampón de almacenamiento se retiró y 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 con una pipeta y se sometió a un vórtice para que se mezclara completamente. El tubo se colocó en una plataforma de balanceo suave a 4°C durante la noche para extraer la proteína objetivo. El extracto se centrifugó a 30.000 x g durante 30 min a 4°C, y el sobrenadante resultante se concentró a 5 veces con el uso de un dispositivo filtrador centrífugo de celulosa regenerada Amicon Ultra-15 (corte de peso molecular 30.000; Millipore, Billerica, MA). El tampón de la muestra se cambió luego a 10 mM de CAPS [ácido 3-(ciclohexamino)1-propansulfónico] pH 10, con columnas PD-10 desechables (GE Healthcare, Piscataway, NJ).

EJEMPLO 7

[0082] Electroforesis de gel. El extracto concentrado se preparó para la electroforesis diluyendo 1:50 en tampón de muestra de LDS NuPAGE® (Invitrogen, Carlsbad, CA) que contenía 5 mM de ditiotreitól como agente reductor y se calentó a 95°C durante 4 minutos. La muestra se cargó en franjas duplicadas de un gel NuPAGE® al 4-12% junto con cinco estándares de BSA que oscilaban de 0,2 a 2 µg/franja (para la generación de la curva estándar). Se aplicó voltaje a 200V con un tampón de ejecución de MOPS SDS (Invitrogen, Carlsbad, CA) hasta que la tintura de rastreo llegó a la parte inferior del gel. El gel se manchó con 0,2% de Coomassie Blue G-250 en metanol al 45%, 10% de ácido acético, y se destiñó, primero brevemente con metanol al 45%, 10% de ácido acético y, luego, a una longitud

con 7% de ácido acético, metanol al 5%, hasta que se aclaró el fondo. Luego del desteñido, el gel se sometió a un barrido con un analizador de imágenes Biorad Fluor-S MultiImager. Se usó el software Quantity One v.4.5.2 del instrumento para obtener volúmenes sin el fondo de las bandas de proteínas manchadas y generar la curva estándar de BSA que se usó para calcular la concentración de proteína DIG-657 en la solución madre.

EJEMPLO 8

[0083] Purificación de la DIG-657. La purificación de la DIG-657 se realizó de manera similar a VIP3 de acuerdo con lo descrito por Lee, M.K., et al (2003), donde las células de *Pf* transformadas con el gen de la DIG-657 se descongelaron, se suspendieron en un tampón de extracción (10 mM de Tris-HCl, 2 mM de EDTA, 2 mM de DTT) en presencia de 0,5 ml de cóctel inhibidor de proteasa (Sigma, St. Louis, MO) y se sonicó cinco veces durante un minuto por vez, con un descanso sobre hielo durante 1 minuto entre cada ciclo de sonicación. La solución se centrifugó a 20.000 x g durante 10 min. y el sobrenadante se recogió y aplicó a una columna de intercambio de iones MonoQ (1 cm de diámetro X 10 cm de largo). La purificación de la proteína se logró mediante cromatografía secuencial en una cromatografía hidrófoba de intercambio de iones (MonoQ 1010, GE Healthcare, Piscataway, NJ) y una cromatografía de exclusión de tamaño. La preparación final mostró una única

banda de proteína que migraba a un peso molecular aparente de aproximadamente 90 kDa.

EJEMPLO 9

[0084] Preparación de la muestra y bioensayos. Las preparaciones purificadas de la DIG-657 se diluyeron aproximadamente en 10 mM de CAPS, pH 10, y todos los bioensayos contenían un tratamiento de control que costaba de este tampón, que sirvió como control antecedente para la mortalidad y/o inhibición del crecimiento. Las concentraciones de proteínas en el tampón del bioensayo se estimaron mediante electroforesis de gel con albúmina de suero bovino (BSA, por sus siglas en inglés) para crear una curva estándar para la densitometría de gel, que se midió con un sistema de análisis de imágenes BioRad (Richmond, CA) (Fluor-S MultiImager con el software Quantity One, versión 4.5.2). Las proteínas en la matriz de gel se mancharon con una mancha a base de Coomassie Blue y se destiñó antes de la lectura.

[0085] Las proteínas purificadas se sometieron a prueba para determinar la actividad insecticida en los bioensayos realizados con larvas de lepidópteros neonatos de 1-2 días de edad con una dieta artificial para insectos. Las larvas de CEW, SBL, DBM, VBC, ECB, FAW y TBW emergieron de los huevos obtenidos de una colonia mantenida por un insectario comercial (Benzon Research Inc., Carlisle, PA). Las larvas de rECB y

rFAW emergieron de huevos cosechados de colonias patentadas privadas (Dow AgroSciences LLC, Indianapolis, IN).

[0086] Los bioensayos se realizaron en bandejas de plástico de 128 pocillos, diseñadas específicamente para los bioensayos de insectos (C-D International, Pitman, NJ). Cada pocillo contenía 2,0 mL de una dieta para lepidópteros de múltiples especies (Southland Products, Lake Village, AR). Se administró una fracción de 40 μ L de la muestra de proteína con una pipeta sobre la superficie de la dieta de 2,0 cm^2 de cada pocillo (20 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$). Las concentraciones dietéticas se calcularon como la cantidad (ng) de proteína DIG-657 por centímetro cuadrado (cm^2) de área superficial en el pocillo. Se uso un rango de concentración de 9 dosis de 9.000 a 3 ng/cm^2 con 16 larvas sometidas a prueba por dosis. Las bandejas tratadas se mantuvieron en una campana de humo hasta que el líquido que se hallaba sobre la superficie de la dieta se evaporó o absorbió en la dieta.

[0087] Dentro de las 24-48 horas de eclosión, se tomaron las larvas individuales con un cepillo de pelo de camello humedecido y se depositaron en la dieta tratada, una larva por pocillo. Los pocillos infestados se sellaron luego con láminas adhesivas de plástico claro y se ventilaron para permitir el intercambio gaseoso (C-D International, Pitman, NJ). Las bandejas de bioensayo se mantuvieron bajo condiciones ambientales controladas (28°C, ~60% de humedad relativa, 16:8 [Luz:oscuridad]) durante 5 días, luego de lo cual se

registraron la cantidad total de insectos expuestos a cada muestra de proteína, la cantidad de insectos muertos y el peso de insectos sobrevivientes. Se procedió luego a calcular el porcentaje de mortalidad y el porcentaje de inhibición del crecimiento para cada tratamiento. La inhibición del crecimiento (GI) se calculó con la siguiente fórmula:

$$GI = [1 - (TWIT/TNIT)/(TWIBC/TNIBC)]$$

en la que TWIT es el peso total de los insectos en el tratamiento, TNIT es la cantidad total de insectos en el tratamiento, TWIBC es el peso total de insectos en el control de antecedente (control de tampón), y TNIBC es la cantidad total de insectos en el control de antecedente (control de tampón).

[0088] Se determinó que el GI_{50} era la concentración de proteína DIG-657 en la dieta en la que el valor de GI fue del 50%. La concentración letal de 50% (LC_{50}) se registró como la concentración de proteína DIG-657 en la dieta en la que se mató un total del 50% de los insectos de la prueba. Se determinaron las curvas de concentración-respuesta de inhibición del crecimiento con el uso de un software, versión 9.0.3, de logística no lineal, de 3 parámetros a través de JMP Pro, (SAS Institute Inc., Cary, NC). Las curvas de concentración letal-respuesta se analizaron mediante análisis Probit (Finney, 1971) de los datos reunidos sobre la mortalidad y se realizaron con el uso de POLO-PC (software LeOra).

[0089] La Tabla 2 presenta los resultados de las pruebas de bioensayo de la proteína DIG-657 en ECB, rECB, TBW, *Pseudoplusia includens* (Walker) (oruga de la soja, "SBL"), *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (oruga del yute, "VBC"), CEW, FAW, rFAW, y DBM. Un hallazgo inesperado y sorprendente es que los insectos de la prueba de rECB fueron tan susceptibles si no más a la acción de la proteína DIG-657 que la cepa susceptible de insectos ECB.

Tabla 2

Eficacia de la DIG-657 purificada contra múltiples especies de insectos probada en un bioensayo de superposición de dietas artificiales (ng/cm²).

Insecto	LC₅₀ (CI 95%) (ng/cm²)	GI₅₀ (CI 95%) (ng/cm²)
ECB	281 (166-470)	8,6 (6,6-11,1)
rECB	37 (17-74)	8,1 (4,2-15,9)
TBW	608 (311-1,432)	12,9 (5,9-28,1)
SBL	80 (50-120)	5,4 (4,3-6,7)
VBC	66 (45-95)	18,9 (12,2-29,3)
CEW	>9.000	17,5 (10,9-28,2)
FAW	>9.000	563 (398-796)
rFAW	~9.000	2.651 (1.030-6.822)
DBM	6,3 (1,6-11,8)	3,7 (3,0-4,6)

[0090] Se realizaron bioensayos de *Helicoverpa armigera* mediante la contaminación de la superficie, con larvas neonatas. Las pruebas de toxicidad se realizaron en bandejas de 128 celdas 128, donde cada celda era de 2 cm². Se usaron concentraciones de 25 y 2500 ng/cm² para determinar el porcentaje de mortalidad, con un control de tampón solamente (Tabla 3). Las pruebas para determinar los valores de LC₅₀ se realizaron con 6 concentraciones diferentes de protoxinas purificadas, con un control de tampón solamente (Tabla 4). La mortalidad y detención se estimaron luego de 7 días a 25°C con condiciones de 16:8 de luz:oscuridad. La "mortalidad funcional" se obtuvo puntuando las larvas muertas y detenidas L1. Los resultados mostraron una actividad de DIG-657 contra *Helicoverpa armigera*.

Tabla 3

Porcentaje de mortalidad de DIG-657 contra *Helicoverpa armigera* probado en un bioensayo de dieta artificial.

	% de mortalidad		% de mortalidad funcional	
	25 ng/cm ²	2500 ng/ cm ²	25 ng/cm ²	2500 ng/ cm ²
CryIAc	28	92	33	100
CryIFa	6	21	6	21
DIG-657	38	79	38	93

Tabla 4

LC₅₀ (ng/cm²) de DIG-657 contra *Helicoverpa armigera* probada en un bioensayo de dieta artificial.

Toxina	Reps	Mortalidad		Mortalidad funcional	
		LC ₅₀ *	Pendiente	LC ₅₀ *	Pendiente
Cry1Ac	3	13,6 (0,3-44,9)	0,65 ± 0,12	5,05 (0,02-19,27)	0,87 ± 0,16
DIG-657	5	3389 (963-79246)	0,56 ± 0,08	301 (183-541)	0,84 ± 0,08

*Los valores entre () son límites de confianza de 0,95

EJEMPLO 10

Producción de proteínas insecticidas DIG-657 de *Bt* y variantes en plantas dicotiledóneas.

[0091] Transformación por *Arabidopsis*. Se transforma la Col-01 de *Arabidopsis thaliana* con el método de inmersión floral (Weigel y Glazebrook, 2002). La colonia seleccionada de *Agrobacterium* se utiliza para inocular cultivos de 1 mL a 15 mL de caldo de YEP que contienen antibióticos adecuados para la selección. El cultivo se incuba durante la noche a 28°C con agitación constante a 220 rpm. Cada cultivo se usó para inocular dos cultivos de 500 mL de caldo de YEP que contenía antibióticos adecuados para la selección y los nuevos cultivos se incuban durante la noche a 28°C con agitación constante. Las células se forman en pellas a aproximadamente 8700 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente y el sobrenadante resultante se desecha. La pella celular se resuspende suavemente en un medio de infiltración de 500 mL que contenía: 1/2x de sales Murashige y Skoog (Sigma-Aldrich)/vitaminas B5 de Gamborg (Gold BioTechnology, St. Louis, MO), 10% (p/v) de sucrosa, 0,044 µM de

bencilaminopurina (10 µL/L de acervo de 1 mg/mL en DMSO) y 300 µL/L de Silwet L-77. Las plantas de aproximadamente 1 mes de edad se sumergen en el medio durante 15 segundos, con cuidado para asegurarse del sumergimiento de la inflorescencia más reciente. Las plantas se mantienen luego tendidas sobre sus lados y se cubren (transparente u opaca) durante 24 horas, se lavan con agua y se colocan erguidas. Las plantas se dejan crecer a 22°C, con un fotoperíodo de 16:8 de luz:oscuridad. A aproximadamente 4 semanas luego de la inmersión, se cosechan las semillas.

[0092] Crecimiento y selección de *Arabidopsis*. Las semillas T1 recién cosechadas se dejan secar durante al menos 7 días a temperatura ambiente en presencia de un disecante. Las semillas se suspenden en una solución de 0,1% de agar/agua (Sigma-Aldrich) y se estratifica luego a 4°C durante 2 días. A los efectos de preparar la plantación, una mezcla Sunshine Mix LP5 (Sun Gro Horticulture Inc., Bellevue, WA) en bandejas de germinación de 10,5 pulgadas x 21 pulgadas (T.O. Plastics Inc., Clearwater, MN) se cubre con vermiculita fina, se subirriga con una solución de Hoagland (Hoagland y Arnon, 1950) hasta que se humedecen, y se dejan drenar durante 24 horas. Las semillas estratificadas se siembran sobre la vermiculita y se cubren con domos de humedad (KORD Products, Bramalea, Ontario, Canadá) durante 7 días. Las semillas germinan y las plantas crecen en un Conviron (Modelos CMP4030 o CMP3244; Controlled Environments Limited, Winnipeg,

Manitoba, Canadá) en condiciones de días prolongados (fotoperíodo de 16:8 de luz:oscuridad) a una intensidad lumínica de 120-150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{seg}$ bajo una temperatura constante (22°C) y humedad (40-50%). Las plantas se riegan inicialmente con una solución de Hoagland y, posteriormente, con agua desionizada para mantener el la humedad del suelo, pero sin mojarse.

[0093] Los domos se retiran a los 5-6 días luego de la siembra y las plantas se rocían con un agente químico de selección para matar las plantas germinadas de las semillas no transformadas. Por ejemplo, si el gen marcador seleccionable, expresable en el vegetal provisto por el vector binario de transformación de vegetales es un gen *pat* o *bar* (Wehrmann et al., 1996), se pueden seleccionar las plantas transformadas mediante la atomización con una 1000 X de solución de Finale (5,78% de glufosinato amonio, Farnam Companies Inc., Phoenix, AZ.). Se realizan dos atomizaciones posteriores en intervalos de 5-7 días. Las plantas sobrevivientes (plantas que crecen activamente) se identifican a los 7-10 días luego de la atomización final y se transplantan en macetas preparadas con mezcla Sunshine Mix LP5. Las plantas transplantadas se cubren con un domo de humedad durante 3-4 días y se colocan en un Conviron en las condiciones de crecimiento mencionadas anteriormente.

[0094] Los expertos en la técnica de transformación de vegetales dicotiledóneos entenderán que se hallan disponibles

otros métodos de selección de vegetales transformados cuando se utilizan otros genes marcadores seleccionables, expresables en vegetales (por ejemplo, genes de tolerancia a herbicidas).

EJEMPLO 11

[0095] *Glycine max* transgénica que comprende DIG-657. Diez a 20 plantas transgénicas de *Glycine max* T₀ que hospedan vectores de expresión para ácidos nucleicos que comprenden la DIG-657 se generan de acuerdo con el conocimiento en el arte, que incluye, por ejemplo, la transformación mediada por *Agrobacterium*. Las semillas maduras de soja (*Glycine max*) se esterilizan durante la noche con gas de cloro durante dieciséis horas. Luego de la esterilización con gas de cloro, las semillas se colocan en un recipiente abierto en una campana de flujo LAMINAR™ para esparcir el gas de cloro. A continuación, las semillas esterilizadas se embeben con H₂O estéril durante dieciséis horas en la oscuridad con el uso de una caja negra a 24°C.

[0096] Preparación de porotos de soja de semillas divididas. Las semillas de soja divididas que comprenden una parte de un protocolo de eje embrionario requieren la preparación del material de semillas de soja que se corta longitudinalmente, con el uso de una hoja de cortar nro. 10 fijada a un escalpelo, a lo largo del hilio de la semilla para separar y retirar el recubrimiento de la semilla y dividir la semilla en dos secciones de cotiledones. Se presta especial

atención para retirar parcialmente el eje embrionario, en donde aproximadamente 1/2 - 1/3 del eje embrionario permanece fijado al extremo nodal del cotiledón.

[0097] Inoculación. Las semillas divididas de soja que comprenden una parte parcial del eje embrionario se sumergen luego durante aproximadamente 30 minutos en una solución de *Agrobacterium tumefaciens* (por ejemplo, cepa EHA 101 o EHA 105) que contiene un plásmido binario que comprende la DIG-657. La solución de *Agrobacterium tumefaciens* se diluye hasta una concentración final de $\lambda=0,6$ OD₆₅₀ antes de sumergir los cotiledones que comprenden el eje del embrión.

[0098] Cocultivo. Luego de la inoculación, la semilla dividida de soja se deja cocultivar con la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* durante 5 días en un medio de cocultivo (Wang, Kan. *Agrobacterium Protocols*. 2. 1. Nueva Jersey: Humana Press, 2006. Print.) en una placa Petri cubierta con una pieza de papel filtro.

[0099] Inducción de los brotes. Luego de 5 días de cocultivo, las semillas divididas de soja se lavan en un medio líquido de inducción de brotes (SI, por sus siglas en inglés) que consta de sales B5, vitaminas B5, 28 mg/L ferrosos, 38 mg/L de Na₂EDTA, 30 g/L de sucrosa, 0,6 g/L de MES, 1,11 mg/L de BAP, 100 mg/L de TIMENTIN™, 200 mg/L de cefotaxima, y 50 mg/L de vancomicina (pH 5,7). Las semillas divididas de soja se cultivan luego en un medio de inducción de brotes I (SI I) que consta de sales B5, vitaminas B5, 7 g/L de agar Noble, 28

mg/L ferrosos, 38 mg/L de Na₂EDTA, 30 g/L de sucrosa, 0,6 g/L de MES, 1,11 mg/L de BAP, 50 mg/L de TIMENTIN™, 200 mg/L de cefotaxima, 50 mg/L de vancomicina (pH 5,7), con el lado plano del cotiledón hacia arriba y el extremo nodal del cotiledón embebido en el medio. Luego de 2 semanas de cultivo, los explantos de la semilla de soja dividida y transformada se transfieren al medio de inducción de brotes II (SI II) que contenía un medio de SI I complementado con 6 mg/L de glufosinato (LIBERTY®).

[00100] Estiramiento del brote. Luego de 2 semanas de cultivo en el medio de SI II, se retiran los cotiledones de los explantos y una almohadilla de brotes nivelada que contiene el eje embrionario se escinde mediante un corte en la base del cotiledón. La almohadilla de brotes aislada del cotiledón se transfiere a un medio de estiramiento de brotes (SE, por sus siglas en inglés). El medio de SE consta de sales MS, 28 mg/L ferrosos, 38 mg/L de Na₂EDTA, 30 g/L de sucrosa y 0,6 g/L de MES, 50 mg/L de asparagina, 100 mg/L de ácido L-piroglutámico, 0,1 mg/L de IAA, 0,5 mg/L de GA3, 1 mg/L de ribósido de zeatina, 50 mg/L de TIMENTIN™, 200 mg/L de cefotaxima, 50 mg/L de vancomicina, 6 mg/L de glufosinato, 7 g/L de agar Noble, (pH 5,7). Los cultivos se transfieren a un nuevo medio de SE cada 2 semanas. Los cultivos se dejan crecer en una cámara de crecimiento CONVIRON™ a 24°C con un fotoperíodo de 18 h a una intensidad lumínica de 80-90 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{seg}$.

[00101] Enraizamiento. Los brotes estirados que se desarrollaron a partir de la almohadilla de brote de cotiledón se aíslan mediante un corte del brote estirado en la base de la almohadilla de brote de cotiledón, y se sumerge el brote elongado en 1 mg/L de IBA (ácido indol 3-butírico) durante 1-3 minutos para promover el enraizamiento. A continuación, los brotes elongados se transfieren a un medio de enraizamiento (sales de MS, vitaminas B5, 28 mg/L ferrosos, 38 mg/L de Na₂EDTA, 20 g/L de sucrosa y 0,59 g/L de MES, 50 mg/L de asparagina, 100 mg/L de ácido L-piroglutámico, 7 g/L de agar Noble, pH 5,6) en bandejas fita.

[00102] Cultivo. Luego del cultivo en una cámara de crecimiento CONVIRON™ a 24°C, un fotoperíodo de 18 horas, durante 1-2 semanas, los brotes que desarrollaron raíces se transfieren a una mezcla de suelo en una copa de sundae cubierta y se coloca en una cámara de crecimiento CONVIRON™ (modelos CMP4030 y CMP3244, Controlled Environments Limited, Winnipeg, Manitoba, Canadá) en condiciones de día prolongado (16 horas de luz/8 horas de oscuridad) a una intensidad lumínica de 120-150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{seg}$ a una temperatura constante (22°C) y humedad constante (40-50%) para la aclimatación de las plántulas. Las plántulas enraizadas se aclimatan en copas de sundae durante varias semanas antes de transferirse al invernadero para otra aclimatación y el establecimiento de plantas de soja transgénicas fuertes.

[00103] Las características de desarrollo y morfológicas de las líneas transgénicas se comparan con plantas no transformadas. Se comparan las características de las raíces del vegetal, los brotes, el follaje y reproducción. No existe ninguna diferencia observable en la longitud de las raíces y en los patrones de crecimiento de las plantas transgénicas y no transformadas. Las características de los brotes de las plantas como, por ejemplo, la altura, la cantidad y el tamaño de las hojas, el tiempo de florecimiento, el tamaño floral y la apariencia son similares. En general, no existen diferencias morfológicas observables entre las líneas transgénicas y aquellas sin la expresión de proteínas DIG cuando se cultivan in vitro y en el suelo en el invernadero.

EJEMPLO 12

Producción de proteínas insecticidas DIG-657 de *Bt* y variantes en plantas monocotiledóneas.

[00104] Transformación del maíz mediada por *Agrobacterium*. Las semillas de una cruz F_1 de High II o B-104 (Armstrong *et al.*, 1991) se sembraron en macetas de 5 galones que contenían 95% de una mezcla de un medio de crecimiento sin suelo Metro-Mix 360 (Sun Gro Horticulture, Bellevue, WA) y 5% de suelo de arcilla/limo. Las plantas se dejaron crecer en un invernadero con una combinación de lámparas de haluro de metal y sodio de alta presión con un fotoperíodo de 16:8 horas de luz:oscuridad. A los efectos de obtener embriones inmaduros de

F₂ para la transformación, se realizaron polinizaciones entre hermanas. Los embriones inmaduros se aislaron a los 8-10 días luego de la polinización cuando los embriones tenían un tamaño de aproximadamente 1,0 a 2,0 mm.

[00105] Infección y cocultivo. Se esterilizaron las superficies de espigas de maíz para lo cual se fregaron con jabón líquido, se sumergieron en etanol al 70% durante 2 minutos, para luego sumergir en 20% de lejía comercial (0,1% de hipoclorito de sodio) durante 30 minutos antes de enjuagar con agua estéril. Se preparó una suspensión de células de *Agrobacterium* que contenía un vector superbinario mediante la transferencia de 1-2 bucles de bacterias que crecieron en un medio sólido de YEP que contenía 100 mg/L de espectinomicina, 10 mg/L de tetraciclina, y 250 mg/L de estreptomicina a 28°C durante 2-3 días en 5 mL de un medio de infección líquido (medio basal de LS (Linsmaier y Skoog, 1965), vitaminas N6 (Chu et al., 1975), 1,5 mg/L de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), 68,5 gm/L de sucrosa, 36,0 gm/L de glucosa, 6 mM de L-prolina, pH 5,2) que contenía 100 µM de acetosiringona. La solución se sometió a un vórtice hasta que se logró una suspensión uniforme, y la concentración se ajustó a una densidad final de aproximadamente 200 unidades Klett, con un colorímetro de Klett-Summerson con un filtro púrpura, o una densidad óptica de aproximadamente 0,4 a 550 nm. Se aislaron embriones inmaduros directamente en un tubo microcentrífugo que contenía 2 mL del medio de infección. El medio se retiró y

colocó con 1 mL de la solución de *Agrobacterium* con una densidad de 200 unidades Klett, y la solución de *Agrobacterium* y embriones se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente y se transfirió luego a un medio de cocultivo (medio basal de LS, (que contenía vitaminas N6, 1,5 mg/L de 2,4-D, 30,0 gm/L de sucrosa, 6 mM de L-prolina, 0,85 mg/L de AgNO₃, 100 µM de acetosiringona, y 3,0 gm/L de goma Gellan (*PhytoTechnology Laboratories.*, Lenexa, KS), pH 5,8) durante 5 días a 25°C en condiciones de oscuridad.

[00106] Luego del cocultivo, los embriones se transfirieron a un medio selectivo luego de lo cual se obtuvieron aislados transformados durante el transcurso de aproximadamente 8 semanas. Para la selección de tejidos de maíz transformados con un plásmido superbinario que contenía un gen marcador seleccionable *pat* o *bar* expresable en vegetales, un medio basado en LS (medio basal de LS, con 1X de vitaminas N6, 1,5 mg/L de 2,4-D, 0,5 gm/L de MES (monohidrato del ácido 2-(N-morfolino)etansulfónico; *PhytoTechnology Laboratories.*, Lenexa, KS), 30,0 gm/L de sucrosa, 6 mM de L-prolina, 1,0 mg/L de AgNO₃, 250 mg/L de cefotaxima, 2,5 gm/L de goma Gellan, pH 5,7) se usó con Bialaphos (Gold BioTechnology, St. Louis, MO). Los embriones se transfirieron a un medio de selección que contenía 3 mg/L de Bialaphos hasta que se obtuvieron aislados embriogénicos. Los aislados recuperados se voluminizaron mediante la transferencia a un nuevo medio de selección en intervalos de 2 semanas para la regeneración y más análisis.

Los expertos en la técnica de la transformación del maíz entenderán que otros métodos de selección de vegetales transformados se hallan disponibles cuando se usan otros genes marcadores seleccionables, expresables en vegetales (por ejemplo, genes de tolerancia a herbicidas).

[00107] Se transfirieron a maíz, dos constructos diferentes de DIG-657 contenidos en los plásmidos pDAB114534 y pDAB114535 (SEQ ID NO:5 y SEQ ID NO:6) (Tabla 5). Se regeneraron plantas T0 y se sometieron a prueba para determinar su capacidad para controlar las plagas de insectos objetivo. El constructo pDAB115782 es un plásmido que contiene el gen para una YFP (proteína fluorescente amarilla) utilizada como control negativo para un vegetal transformado con un gen no insecticida.

Tabla 5

Descripción de plásmidos que contienen diferentes constructos de DIG-657 transformados en plantas de maíz.

Plásmido:	Descripción:	Característica
pDAB114534	LímiteB::ZmUbi1/IRDIG9931.4/ZmPer5::ZCZ018::SCB V(MAM)/AAD-1/ZmLip::3x Límite A	DIG-657 longitud completa (SEQ ID NO:5)
pDAB114535	LímiteB::ZmUbi1/IRDIG9931.5/ZmPer5::ZCZ018::SCB V(MAM)/AAD-1/ZmLip::3x Límite A	DIG-657 Truncada (SEQ ID NO:6)
pDAB115782	LímiteB::ZmUbi1/PhiYFP v3/ZmPer5::ZCZ018::SCBV(MAM)/AAD-1/ZmLip::3x Límite A	PhiYFP

[00108] Se tomó un corte de hoja de 1,0 X 0,5 pulgadas cuadradas por duplicado de la hoja V3 o V4 de plantas transgénicas T₀ V5. Para cada prueba, se muestrearon tejidos de hojas de plantas tipo silvestres en primer lugar para evitar la contaminación cruzada de toxinas de *Bt* en los bordes de las hojas, seguido por las plantas transformadas. En cada pocillo de las bandejas de bioensayo (bandejas de 32 pocillos y tapas, CD International, Pitman, NJ), se colocó 1 corte de hoja en 2% de agua-agar (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ) y eso se replicó 2 veces por especie de insecto, por evento y por constructo. Cada pocillo se infestó con diez neonatos de ECB o *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (taladro de la caña de azúcar "SCB") (24-48 horas de edad) y se selló cada pocillo con una tapa de plástico perforada par permitir el intercambio de aire. Las bandejas se colocaron a 28°C (16:8 hr de luz:oscuridad, 40% de RH) y luego de 3 días, se clasificaron para determinar el porcentaje de daño de la hoja. Se analizaron los datos del porcentaje de daños de las hojas con ANOVA y las separaciones medias con la prueba de Tukey-Kramer cuando las varianzas fueron homogéneas con el uso de JMP® Pro 9.0.1 (2010 SAS Institute Inc., Cary, NC). El nivel observado de daño de las hojas causado por cada especie de insecto en el material vegetal transgénico se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6

Porcentaje medio del daño de las hojas ocasionado por larvas de ECB o SCB que se alimentan de tejidos de hojas de maíz T₀ de los constructos 114534, 114535 o 115782

Constructo	% promedio de daño en las hojas producido por ECB	Desv. est.	% promedio del daño en las hojas producido por SCB	Desv. est..
pDAB114534 (FL DIG-657)	14,4	15,3	8,7	2,9
pDAB114535 (Tr DIG-657)	71,8	26,9	93,3	9,3
115782 (YFP)	90,8	8,5	98,8	3,1

*Desvío estándar (n=10)

[00109] Ambos constructos 114534 y 114535 resultaron en un daño medio menor en comparación con el constructo de control negativo de YFP (115782). El constructo 114534 que expresaba la proteína DIG-657 de longitud completa presentó una mayor actividad del insecto con respecto al constructo 114535 que expresaba la proteína DIG-657 truncada.

EJEMPLO 13

[00110] Regeneración y producción de semillas. Para la regeneración, los cultivos se transfirieron a un medio de inducción "28" (sales de MS y vitaminas, 30 gm/L de sucrosa, 5 mg/L de bencilaminopurina, 0,25 mg/L de 2,4-D, 3 mg/L de Bialaphos, 250 mg/L de cefotaxima, 2,5 gm/L de goma Gellan, pH 5,7) durante 1 semana en condiciones luz baja ($14 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$), luego 1 semana en condiciones de luz alta (aproximadamente $89 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$). Los tejidos se transfirieron posteriormente a un medio de regeneración "36" (igual al medio de inducción

excepto que carecía de reguladores del crecimiento de vegetales). Las plántulas de 3-5 cm de longitud se transfirieron a tubos de cultivo de vidrio que contenían un medio de SHGA (sales y vitaminas de Schenk y Hildebrandt (1972); PhytoTechnology Laboratories., Lenexa, KS), 1,0 gm/L de *myo*-inositol, 10 gm/L de sucrosa y 2,0 gm/L de goma Gellan, pH 5,8) para permitir un mayor crecimiento y desarrollo de brotes y raíces. Las plantas se transplantaron a la misma mezcla de suelo que la descrita anteriormente en la presente y se dejaron crecer hasta que florecieron en el invernadero. Se realizaron polinizaciones controladas para la producción de semillas.

EJEMPLO 14

Diseño de una versión optimizada de vegetal de la secuencia codificadora para la proteína insecticida DIG-657 de *Bt*. Se diseñó una secuencia de ADN que poseía un sesgo de codón de vegetal y se sintetizó para producir la proteína DIG-657 en plantas transgénicas monocotiledóneas y dicotiledóneas. Se calculó una tabla de uso de codones para el maíz (*Zea mays* L.) a partir de 706 secuencias codificadoras de la proteína (CD, por sus siglas en inglés) obtenidas de secuencias depositadas en GenBank. Las tablas de uso de codones para tabaco (*Nicotiana tabacum*, 1268 CDs), canola (*Brassica napus*, 530 CDs), algodón (*Gossypium hirsutum*, 197 CDs), y soja (*Glycine max*; ca. 1000 CDs) se descargaron de los datos del sitio de

la Web <http://www.kazusa.or.jp/codon/>. Un conjunto de codones sesgados que comprende codones ampliamente usados, comunes tanto para conjuntos de datos de maíz como también de dicotiledóneas, en cantidades promedio relativas, ponderadas, adecuadas, se calculó luego de omitir todo codón redundante utilizado inferior a aproximadamente el 10% de usos de codones totales para ese aminoácido en cualquiera de los dos tipos de vegetales. A los efectos de derivar una secuencia optimizada de vegetal que codifica la proteína DIG-657, se realizaron sustituciones de codones en la secuencia de ADN de DIG-657 determinada experimentalmente de manera que la secuencia de ADN resultante tuviera la composición general de codón de la tabla de sesgo de codones de vegetal optimizado. Se realizaron otros refinamientos de la secuencia para eliminar los sitios no deseables de reconocimiento de enzimas de restricción, los sitios de empalme de vegetales potenciales no deseables, las largas corridas de residuos de A/T o C/G, y otros motivos que podrían interferir con la estabilidad del ARN, la transcripción, o la traducción de la región codificadora en las células vegetales. Se realizaron otros cambios para introducir sitios de reconocimiento de enzimas de restricción deseados y eliminar los marcos internos, largos, de lectura abierta (marcos que no son de +1). Estos cambios se realizaron todos dentro de las restricciones de retención de la composición de codones sesgados de vegetales. La síntesis de la secuencia diseñada fue realizada por un proveedor comercial

(DNA2.0, Menlo Park, CA). Se puede hallar una guía adicional sobre la producción de genes sintéticos, por ejemplo, en WO 97/13402 y en la patente de invención estadounidense Nro. 5.380.831.

Una secuencia de ADN optimizada de maíz que codifica la variante 1 de DIG-657 se provee en la SEQ ID NO:3. Una secuencia de ADN optimizada de *Pseudomonas fluorescens* que codifica la variante 2 de DIG-657 se provee en la SEQ ID NO:4. Una secuencia de ADN de alto contenido de GC optimizada de maíz que codifica la DIG-657 se provee en la SEQ ID NO:5. Una secuencia de ADN con alto contenido de GC optimizada de maíz que codifica el gen de DIG-657, truncado 204 aa, del terminal N, se provee en la SEQ ID NO:6. Una secuencia de ADN optimizada de una dicotiledónea que codifica la DIG-657 de longitud completa se encuentra descripta como SEQ ID NO:8. Una secuencia de ADN optimizada de dicotiledónea que codifica la DIG-657 truncada se encuentra descripta como SEQ ID NO:9.

[00111] La hibridación del ADN inmovilizado en Southern blots con sondas específicas de genes etiquetadas radioactivamente se realiza mediante métodos estándar (Sambrook *et al.*, *supra.*). Los isótopos radioactivos usados para etiquetar sondas de polinucleótidos incluyen ³²P, ³³P, ¹⁴C, o ³H. La incorporación de isótopos radioactivos en moléculas de sondas de polinucleótidos se realiza mediante cualquiera de varios métodos muy conocidos por los expertos en el campo de la biología molecular. (Véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*,

supra). En general, la hibridación y los lavados posteriores se realizan en condiciones rigurosas que permiten la detección de secuencias objetivo con homología con los genes que codifican la toxina reivindicada. Para las sondas de genes de ADN de doble hebra, la hibridación se realiza durante la noche a 20°C a 25°C por debajo del T_m del híbrido de ADN en 6X de SSPE, 5X de solución de Denhardt, 0,1% de SDS, 0,1 mg/mL de ADN desnaturalizado [20X de SSPE es 3M NaCl, 0,2 M NaHPO_4 , y 0,02M EDTA (sal de sodio del ácido etilendiamintetra acético); 100X de solución de Denhardt (20 gm/L de polivinilpirrolidona, 20 gm/L de Ficoll tipo 400 y 20 gm/L de fracción V de BSA).

[00112] Los lavados se realizan generalmente de la siguiente manera:

- a. Dos veces a temperatura ambiente durante 15 minutos en 1X de SSPE, 0,1% de SDS (lavado de baja rigurosidad).
- b. Una vez a 20°C por debajo de la temperatura del T_m durante 15 minutos en 0,2X de SSPE, 0,1% de SDS (lavado de rigurosidad moderada).

[00113] Para las sondas de oligonucleótidos, la hibridación se puede realizar durante la noche a 10°C a 20°C por debajo del T_m del híbrido en 6X de SSPE, 5X de solución de Denhardt, 0,1% de SDS, 0,1 mg/mL de ADN desnaturalizado. El T_m para las sondas de oligonucleótidos se puede determinar con la siguiente fórmula (Suggs *et al.*, 1981).

$$T_m(^{\circ}\text{C}) = 2(\text{cantidad de pares de base de T/A}) + 4$$

$$(\text{cantidad de pares de base de G/C})$$

[00114] Los lavados se realizan generalmente de la siguiente manera:

- a. Dos veces a temperatura ambiente durante 15 minutos en 1X de SSPE, 0,1% de SDS (lavado de baja rigurosidad).
- b. Una vez en la temperatura de hibridación durante 15 minutos en 1X de SSPE, 0,1% de SDS (lavado de rigurosidad moderada).

[00115] Las moléculas de sondas para hibridación y las moléculas híbridas formadas entre las moléculas de sondas y moléculas objetivo se pueden tornar detectables por medio de otro etiquetado radioactivo. Se pretende que estos métodos alternativos se hallen dentro del alcance de la presente invención.

[00116] Mientras la presente descripción puede ser objeto de diversas modificaciones y formas alternativas, las modalidades específicas se describieron a modo de ejemplo en forma detallada en la presente. Sin embargo, ha de entenderse que no se pretende que la presente descripción se limite a las formas particulares descriptas. En cambio, la presente descripción ha de cubrir todas las modificaciones, los equivalentes y las alternativas que queden comprendidas en el alcance de la presente descripción de acuerdo con lo definido por las

siguientes reivindicaciones adjuntas y sus equivalentes legales.