

TOXINAS Cry1Ca MODIFICADAS ÚTILES PARA EL CONTROL DE PLAGAS DE

INSECTOS MEMORIA DESCRIPTIVA

CAMPO DE LA DIVULGACIÓN

La presente invención se refiere a la modificación de una toxina plaguicida de *Bacillus thuringiensis*, las secuencias de polinucleótidos que codifican estas toxinas y plantas transgénicas que producen estas toxinas.

ANTECEDENTES DE LA DIVULGACIÓN

Los insectos y otras plagas cuestan a los agricultores miles de millones de dólares anualmente en pérdidas de cultivos y gastos para mantener estas plagas bajo control. Además de las pérdidas en cultivos de campo, las plagas de insectos también son una carga para los productores de verduras y frutas, para los productores de flores ornamentales y para los jardineros caseros. Las pérdidas causadas por las plagas de insectos en los ambientes de producción agrícola incluyen disminución en el rendimiento de los cultivos, calidad disminuida de los cultivos y costos de cosecha aumentados.

Las plagas de insectos son controladas principalmente por aplicaciones intensivas de plaguicidas químicos, que actúan por inhibición del crecimiento de los insectos, prevención de la alimentación o reproducción de los insectos, o bien causan la muerte. Por lo tanto, puede lograrse un buen control de los insectos, pero estos productos químicos a veces pueden afectar a otros insectos beneficiosos. Otro problema resultante del uso extendido de plaguicidas químicos es la aparición de poblaciones de insectos resistentes. Esto ha sido parcialmente paliado por diversas prácticas de manejo de la resistencia, pero existe una necesidad creciente de agentes alternativos para el control de plagas. Agentes de control de plagas biológicos, tales como cepas de *Bacillus thuringiensis* (*B.t.*) que expresan toxinas plaguicidas como las endotoxinas delta, también han sido aplicados a plantas de cultivos con resultados satisfactorios, ofreciendo una alternativa o complemento a los plaguicidas químicos. Los genes que codifican algunas de estas endotoxinas delta han sido aislados, y se ha demostrado que su expresión en huéspedes

heterólogos proporciona otra herramienta para el control de plagas de insectos económicamente importantes. En particular, la expresión de toxinas insecticidas, tales como endotoxinas delta de *Bacillus thuringiensis*, en plantas transgénicas ha proporcionado una protección eficiente contra plagas de insectos seleccionadas, y plantas transgénicas que expresan estas toxinas han sido comercializadas, permitiendo a los agricultores reducir las aplicaciones de agentes de control de insectos químicos.

Los lepidópteros son un grupo importante de plagas agrícolas, hortícolas y domésticas, que causan grandes daños todos los años. Este orden de insectos abarca larvas y adultos que se alimentan de hojas y raíces. Las plagas de insectos lepidópteros incluyen, pero no están limitadas a: *Achoria grisella*, *Acleris gloverana*, *Acleris variana*, *Adoxophyes orana*, *Agrotis ipsilon* (gusano cortador negro "BCW"), *Alabama argillacea*, *Alsophila pometaria*, *Amyelois transitella*, *Anagasta kuehniella*, *Anarsia lineatella*, *Anisota senatoria*, *Antheraea pernyi*, *Anticarsia gemmatilis* (oruga de las leguminosas "VBC"), *Archips* sp., *Argyrotaenia* sp., *Athetis mindara*, *Bombyx mori*, *Bucculatrix thurberiella*, *Cadra cautella*, *Choristoneura* sp., *Cochylis hospes*, *Colias eurytheme*, *Corcyra cephalonica*, *Cydia latiferreanus*, *Cydia pomonella*, *Datana integerrima*, *Dendrolimus sibericus*, *Desmia fernalis*, *Diaphania hyalinata*, *Diaphania nitidalis*, *Diatraea grandiosella* (taladro del maíz del sudoeste "SWCB"), *Diatraea saccharalis*, *Ennomos subsignaria*, *Eoreuma loftini*, *Espehtia elutella*, *Erannis tilaria*, *Estigmene acrea*, *Eulia salubricola*, *Eupocoellia ambiguella*, *Eupoecilia ambiguella*, *Euproctis chrysorrhoea*, *Euxoa messoria*, *Galleria mellonella*, *Grapholita molesta*, *Harrisina americana*, *Helicoverpa subflexa*, *Helicoverpa zea* (gusano de la mazorca del maíz "CEW"), *Heliothis virescens* (cuncunilla del tabaco "TBW"), *Hemileuca oliviae*, *Homoeosoma electellum*, *Hyphantia cunea*, *Keiferia lycopersicella*, *Lambdina fiscellaria fiscellaria*, *Lambdina fiscellaria lugubrosa*, *Leucoma salicis*, *Lobesia botrana*, *Loxostege sticticalis*, *Lymantria dispar*, *Macalla thyrisalis*, *Malacosoma* sp., *Mamestra brassicae*, *Mamestra configurata*, *Manduca quinquemaculata*, *Manduca sexta*, *Maruca testulalis*, *Melanchra picta*, *Operophtera brumata*, *Orgyia* sp., *Ostrinia nubilalis* (taladro del maíz europeo "ECB"), *Paleacrita vernata*, *Papaipema nebris* (barrenador del tallo), *Papilio cresphontes*, *Pectinophora gossypiella*, *Phryganidia californica*,

Phyllonorycter blancardella, *Pieris napi*, *Pieris rapae*, *Plathypena scabra*, *Platynota flouendana*, *Platynota stultana*, *Platyptilia carduidactyla*, *Plodia interpunctella*, *Plutella xylostella* (polilla de la col "DBM"), *Pontia protodice*, *Pseudaletia unipuncta*, *Pseudoplusia includens* (gusano defoliador de la soya "SBL"), *Sabulodes aegrotata*, *Schizura concinna*, *Sitotroga cerealella*, *Spilonta ocellana*, *Spodoptera eridania* (gusano cogollero del sur "SAW"), *Spodoptera frugiperda* (gusano cogollero del maíz "FAW"), *Spodoptera exigua* (gusano cogollero de la betarraga "BAW"), *Thaurnstopoea pityocampa*, *Ensola bisselliella*, *Trichoplusia ni* (oruga de la col "CL"), *Udea rubigalis*, *Xylomyges curiails* e *Yponomeuta padella*. Cualquier género mencionado más arriba (y otros) generalmente también pueden utilizarse como blancos como parte de la presente invención. Cualesquier insectos adicionales en cualquiera de estos géneros (como blancos) también están incluidos dentro del alcance de esta invención.

Bacillus thuringiensis (*B.t.*) es una bacteria del suelo, Gram-positiva y formadora de esporas que produce proteínas cristalinas insecticidas conocidas como endotoxinas delta o proteínas Cry (revisado en Schnepf *et al.*, 1998). Nuevas proteínas cristalinas (Cry) con nuevas propiedades insecticidas se siguen descubriendo a una velocidad creciente, y se ha informado de más de 440 genes de Cry. Actualmente, hay más de 450 proteínas Cry y Citotoxinas (Cyt) singulares clasificadas en 57 categorías de homología primaria. Las proteínas Cry se nombran en base al grado de identidad de secuencias, existiendo límites primario, secundario y terciario aproximadamente a 45%, 78% y 95% de identidad, respectivamente; a los alelos parecidos se les asignan nuevas denominaciones cuaternarias (Crickmore *et al.*, 1998). Una lista extensa de endotoxinas delta es mantenida y actualizada regularmente en http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/intro.html. Actualmente hay más de 73 grupos principales de toxinas "Cry" (Cry1-Cry73), con toxinas Cyt adicionales y toxinas proteínas insecticidas vegetativas (VIP) y similares. Muchos de los grupos numéricos tienen subgrupos con letra mayúscula, y los subgrupos con letra mayúscula tienen sub-subgrupos con letra minúscula. (Cry1 tiene A-L y Cry1A tiene a-i, por ejemplo).

Proteínas de *B.t.* han sido usadas para crear las plantas transgénicas resistentes a insectos que han sido exitosamente registradas o desreguladas y comercializadas hasta la fecha.

Estas incluyen Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1F, Vip3A, Cry34Ab1/Cry35Ab1 y Cry3Bb en maíz, Cry1Ac, Vip3A y Cry2Ab en algodón, y Cry3A en papa. Las toxinas de *B.t.* representan más del 90% del mercado de los bioinsecticidas y esencialmente la fuente total de genes para los cultivos transgénicos que han sido desarrollados para proporcionar resistencia a ser comidos por insectos.

Las proteínas Cry son intoxicantes orales que funcionan actuando sobre células del intestino medio de los insectos susceptibles. Las formas activas de muchas proteínas Cry comprenden tres dominios definidos de la proteína. Las proteínas de *B.t.* más estudiadas son miembros de las endotoxinas delta Cry de tres dominios. Estas proteínas fluctúan en tamaño desde aproximadamente 70 kDa hasta 130 kDa. El análisis de secuencias de la proteína primaria revela cinco bloques de secuencias altamente conservados y un alto grado de variabilidad de secuencias entre los bloques conservados tres y cinco (Schnepf *et al.*, 1998).

Estructuras cristalinas tridimensionales han sido determinadas para *Cry1Aa1*, *Cry2Aa1*, *Cry3Aa1*, *Cry3Bb1*, *Cry4Aa*, *Cry4Ba* y *Cry8Ea1* como ejemplos. Estas estructuras son notablemente similares y están constituidas por tres dominios definidos con las siguientes características (revisado en de Maagd *et al.*, 2003). El dominio I es un haz de siete hélices alfa, donde la hélice cinco está rodeada por seis hélices anfipáticas. Este dominio ha sido implicado en la inserción y formación de poros en las membranas del intestino medio. Comparte homología con otras proteínas formadoras de poros incluyendo hemolisinas y colicinas. El dominio II está constituido por tres láminas beta antiparalelas empacadas juntas en un prisma beta. Este dominio comparte homología con ciertas proteínas que se unen a carbohidratos, incluyendo vitelina y jacalina. Las asas de este dominio tienen roles importantes en la unión a receptores del intestino medio de los insectos. En las proteínas Cry1A, las asas expuestas en la superficie en los ápices de las láminas beta del dominio II están involucradas en la unión a receptores cadherina de los lepidópteros. El dominio III es una estructura de emparedado beta que interactúa con una segunda clase de receptores, ejemplos de los cuales son aminopeptidasa y fosfatasa alcalina en el caso de las proteínas Cry1A (Pigott y Ellar, 2007). Estructuralmente, este dominio está relacionado con dominios de unión a carbohidratos de proteínas tales como glucanasas, galactosa oxidasa, sialidasa y otras. Este dominio se une a ciertas clases de proteínas receptoras y tal vez

participa en la inserción de un pre-poro de toxina oligomérica. Los bloques de secuencias de *B.t.* conservados 2 y 3 mapean cerca del terminal N y el terminal C del dominio 2, respectivamente. Por lo tanto, estos bloques de secuencias conservados 2 y 3 son regiones de límites aproximados entre los tres dominios funcionales. Estas regiones de ADN conservado y homología de proteínas han sido utilizadas para la ingeniería genética de toxinas de *B.t.* recombinantes (patente norteamericana US N° 6.090.931, patentes WO 91/01087, WO 95/06730, WO 1998/022595).

Un modelo propuesto para el modo de acción de las proteínas Cry se basa en la formación de poros en las membranas del intestino medio de insectos susceptibles (Knowles y Ellar, 1987). En la versión actual de este modelo (Bravo *et al.*, 2007), se requiere la unión a ambos receptores cadherina y aminopeptidasa en las membranas del intestino medio de los lepidópteros para la toxicidad de las proteínas Cry. De acuerdo con el modelo de formación de poros, la intoxicación por proteínas Cry involucra varios pasos: 1) procesamiento proteolítico de protoxina Cry soluble para dar una toxina núcleo activada; 2) unión de la proteína Cry a receptores cadherina en el intestino medio del insecto; 3) nueva escisión proteolítica en el terminal N de la toxina núcleo para remover una región α -helicoidal; 4) oligomerización de la proteína Cry para formar un pre-poro; 5) unión del pre-poro a receptores de membrana del segundo sitio (aminopeptidasas y fosfatasas alcalinas); 6) inserción del pre-poro en la membrana y 7) lisis celular osmótica que lleva a la ruptura del intestino medio y la muerte del insecto.

La extendida adopción de la tecnología de plantas transgénicas resistentes a insectos da lugar a la preocupación de que poblaciones de plagas desarrollen resistencia a las proteínas insecticidas producidas por estas plantas. Se han sugerido varias estrategias para preservar la utilidad de los rasgos de resistencia a insectos basados en *B.t.*, que incluyen desplegar proteínas a alta dosis en combinación con un refugio, y alternancia con, o co-despliegue de, diferentes toxinas (McGaughey *et al.* (1998), "B.t. Resistance Management," Nature Biotechnol. 16:144-146).

La resistencia de los insectos a proteínas Cry de *B.t.* puede desarrollarse a través de varios mecanismos (Heckel *et al.*, 2007, Pigott y Ellar, 2007). Múltiples clases de proteínas receptoras para proteínas Cry han sido identificadas en los insectos, y existen múltiples ejemplos

dentro de cada clase de receptores. La resistencia a una proteína Cry particular puede desarrollarse, por ejemplo, por medio de una mutación dentro de la porción que se une a la toxina de un dominio de cadherina de una proteína receptora. Otro medio de resistencia puede ser mediado a través de una proteasa procesadora de protoxinas. Así, la resistencia a toxinas Cry1A en especies de lepidópteros tiene una base genética compleja, con al menos cuatro genes de resistencia principales distintos. Insectos lepidópteros resistentes a proteínas Cry han sido desarrollados en el campo para *Plutella xylostella* (Tabashnik, 1994), *Trichoplusia ni* (Janmaat y Myers 2003, 2005), *Helicoverpa zea* (Tabashnik *et al.*, 2008) y *Spodoptera frugiperda* (Storer, *et al.*, 2010). El desarrollo de nuevas proteínas Cry de alta potencia proporcionará herramientas adicionales para el manejo de plagas de insectos lepidópteros.

Esta invención proporciona proteínas insecticidas de *B.t.* que son eficaces para controlar insectos que son resistentes a Cry1Ac y Cry1F. Estas proteínas toxinas pueden usarse ventajosamente para proteger cultivos agrícolas del daño por alimentación de insectos. La capacidad de expresar estas toxinas para insectos de una manera tal que suficiente cantidad de la proteína funcionalmente activa esté presente en un cultivo de interés, también es materia de esta invención.

BREVE RESUMEN DE LA INVENCION

Una toxina Cry1Ca modificada que comprende los residuos 2 a 68 de SEQ ID NO:2, donde el residuo de amino ácido 54 es elegido del grupo consistente en Gly y Ala, el residuo de amino ácido 57 es elegido del grupo consistente en Leu y Met, y el residuo de amino ácido 68 es elegido del grupo consistente en Val, Phe e Ile. Una toxina Cry1Ca modificada que comprende los residuos 2 a 628 de SEQ ID NO:210, donde el residuo de amino ácido 54 es elegido del grupo consistente en Gly y Ala, el residuo de amino ácido 57 es elegido del grupo consistente en Leu y Met, el residuo de amino ácido 68 es elegido del grupo consistente en Val, Phe e Ile, el residuo de amino ácido 73 es elegido del grupo consistente en Trp, Ala y Met, el residuo de amino ácido 596 es elegido del grupo consistente en Phe, Met y Ala, y el residuo de amino ácido 620 es elegido del grupo consistente en Leu y Phe. Las toxinas Cry1Ca modificadas

mencionadas más arriba que además comprenden una extensión carboxi terminal consistente en los residuos de amino ácidos 629 a 1164 de SEQ ID NO:36. Las toxinas Cry1Ca modificadas mencionadas más arriba que además comprenden una extensión carboxi terminal consistente en los residuos de amino ácidos 629 a 1164 de SEQ ID NO:36. Las toxinas Cry1Ca modificadas mencionadas más arriba que además comprenden una extensión amino terminal consistente en los residuos de amino ácidos 1 a 74 de SEQ ID NO:40. Las toxinas Cry1Ca modificadas mencionadas más arriba que además comprenden una extensión amino terminal consistente en los residuos de amino ácidos 1 a 74 de SEQ ID NO:40. Las toxinas Cry1Ca modificadas mencionadas más arriba que además comprenden una extensión amino terminal consistente en los residuos de amino ácidos 1 a 74 de SEQ ID NO:40. Las toxinas Cry1Ca modificadas mencionadas más arriba que además comprenden una extensión amino terminal consistente en los residuos de amino ácidos 1 a 74 de SEQ ID NO:40. Las toxinas Cry1Ca modificadas mencionadas más arriba que además comprenden una extensión amino terminal consistente en los residuos de amino ácidos 1 a 74 de SEQ ID NO:40.

ADN que codifica toxinas Cry1Ca modificadas, plantas transgénicas que producen toxinas Cry1Ca modificadas y métodos para controlar plagas de insectos usando las toxinas Cry1Ca modificadas, están incluidos en la invención.

La presente invención se refiere a nuevos materiales y métodos para controlar plagas de artrópodos que son perjudiciales para las plantas y la agricultura. En una modalidad preferida, la presente invención proporciona materiales y métodos para el control de plagas de lepidópteros.

Proteínas Cry de *B.t.* (endotoxinas, toxinas) específicas útiles de acuerdo con la invención incluyen toxinas que pueden obtenerse del aislado de *B.t.* denominado MR-1206. La presente invención también incluye el uso de mutantes del aislado de *B.t.* ejemplificado y toxinas que tienen propiedades activas contra lepidópteros mejoradas, que son resistentes al procesamiento por proteasas o se expresan a altos niveles cuando los genes son transformados en un sistema de expresión heterólogo. Los procedimientos para fabricar mutantes son bien conocidos en el arte de la microbiología. Luz ultravioleta y mutágenos químicos tal como nitrosoguanidina se usan extensamente con este fin.

Las presentes proteínas toxinas pueden ser "aplicadas" o proporcionadas para contactar a los insectos blanco de una variedad de maneras. Por ejemplo, pueden usarse plantas transgénicas (donde la proteína es producida por y está presente en la planta) que son bien conocidas en el arte. La expresión de los genes de las toxinas también puede efectuarse selectivamente en tejidos específicos de las plantas, tales como las raíces, hojas, etc. Esto puede lograrse mediante el uso de promotores con especificidad de tejido, por ejemplo. Las aplicaciones rociables son otro ejemplo y también son conocidas en el arte. Las presentes proteínas pueden ser formuladas apropiadamente para el uso final deseado, y después rociadas (o aplicadas de otra manera) sobre la planta y/o alrededor de la planta y/o a las cercanías de la planta que será protegida, antes de descubrir una infestación, después de descubrir los insectos blanco, tanto antes como después, y similares. La presente proteína también puede ser formulada apropiadamente y aplicada a las semillas como un tratamiento para semillas, que permite que la proteína esté en contacto con la zona radicular de la planta para protegerla de los insectos que se alimentan de las raíces. Gránulos de cebo, por ejemplo, también pueden usarse y son conocidos en el arte.

Las presentes proteínas pueden usarse para proteger prácticamente cualquier tipo de planta contra el daño por un insecto lepidóptero. Los ejemplos de estas plantas incluyen maíz, girasol, soya, algodón, canola, arroz, sorgo, trigo, cebada, verduras, plantas ornamentales, pimentones (incluyendo ajíes), betarragas, frutas y césped, para nombrar solamente unas pocas. Plantas especialmente preferidas son maíz, soya y algodón. Una planta más preferida es el maíz. Otra planta más preferida es la soya. Otra planta más preferida es el algodón.

En una modalidad de la presente invención, las secuencias de polinucleótidos de la presente invención codifican toxinas de aproximadamente 68-71 kDa. Estas toxinas se usan para controlar plagas de lepidópteros, especialmente gusano cogollero del maíz, polilla de la col, taladro del maíz del sudoeste, gusano cogollero del sur, gusano de la mazorca del maíz y taladro del maíz europeo. En una modalidad preferida, la presente invención se refiere a células de plantas transformadas con al menos una secuencia de polinucleótidos de la presente invención, de

tal manera que las células de planta transformadas producen y contienen toxinas plaguicidas de la invención en tejidos consumidos por las plagas blanco.

Alternativamente, el aislado de *B.t.* de la presente invención, o microbios recombinantes que expresan genes que codifican las proteínas toxinas plaguicidas descritas aquí, pueden usarse para controlar plagas de insectos. A este respecto, la invención incluye el tratamiento de células de *B.t.* sustancialmente intactas y/o células recombinantes que contienen las toxinas de la invención, tratadas para prolongar la actividad plaguicida cuando las células sustancialmente intactas son aplicadas al medio ambiente de una plaga blanco. La célula tratada actúa como un recubrimiento protector para la toxina plaguicida. La toxina se vuelve activa al ser ingerida por un insecto blanco.

Un aspecto de la invención se refiere a moléculas de ácidos nucleicos aisladas que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican proteínas plaguicidas y polipéptidos o porciones biológicamente activas de las mismas, y también moléculas de ácidos nucleicos suficientes para el uso como sondas de hibridación para identificar ácidos nucleicos que codifican las toxinas reivindicadas. Como se usa aquí, el término "molécula de ácido nucleico" pretende incluir moléculas de ADN (por ejemplo ADNc o ADN genómico) y moléculas de ARN (por ejemplo ARNm) y análogos del ADN o ARN generados usando análogos de nucleótidos. La molécula de ácido nucleico puede ser de una sola hebra o de doble hebra, pero de preferencia es ADN de doble hebra.

Las secuencias de nucleótidos que codifican las proteínas de la presente invención incluyen las secuencias presentadas en SEQ ID NOs:1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, y complementos de las mismas. "Complemento" significa una secuencia de nucleótidos que es suficientemente complementaria con una secuencia de nucleótidos dada, de tal manera que puede hibridarse con la secuencia de nucleótidos dada para así formar una molécula dúplex (de doble hebra) estable. Las secuencias de amino ácidos correspondientes para las toxinas Cry1Ca modificadas activas como plaguicidas codificadas por estas secuencias de nucleótidos se presentan en SEQ ID NOs:2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38 y 40.

Moléculas de ácidos nucleicos que son fragmentos de las secuencias de nucleótidos que codifican las toxinas reivindicadas también están incluidas en la presente invención. "Fragmento" significa una porción de la secuencia de nucleótidos que codifica un fragmento de una toxina Cry1Ca modificada reivindicada. Un fragmento de una secuencia de nucleótidos puede codificar una porción biológicamente activa de una proteína toxina reivindicada, o puede ser un fragmento que puede usarse como una sonda de hibridación o partidor de PCR usando los métodos que se divulgan más abajo.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS SECUENCIAS

SEQ ID NO:1 secuencia de ADN que codifica DIG-468

SEQ ID NO:2 es la secuencia de la proteína DIG-468

SEQ ID NO:3 secuencia de ADN que codifica DIG-483

SEQ ID NO:4 es la secuencia de la proteína DIG-483

SEQ ID NO:5 secuencia de ADN que codifica DIG-485

SEQ ID NO:6 es la secuencia de la proteína DIG-485

SEQ ID NO:7 secuencia de ADN que codifica DIG-487

SEQ ID NO:8 es la secuencia de la proteína DIG-487

SEQ ID NO:9 secuencia de ADN que codifica DIG-462

SEQ ID NO:10 es la secuencia de la proteína DIG-462

SEQ ID NO:11 secuencia de ADN que codifica DIG-463

SEQ ID NO:12 es la secuencia de la proteína DIG-463

SEQ ID NO:13 secuencia de ADN que codifica DIG-464

SEQ ID NO:14 es la secuencia de la proteína DIG-464

SEQ ID NO:15 secuencia de ADN que codifica DIG-465

SEQ ID NO:16 es la secuencia de la proteína DIG-465

SEQ ID NO:17 secuencia de ADN que codifica DIG-466

SEQ ID NO:18 es la secuencia de la proteína DIG-466

SEQ ID NO:19 secuencia de ADN que codifica DIG-467

SEQ ID NO:20 es la secuencia de la proteína DIG-467

SEQ ID NO:21 secuencia de ADN que codifica DIG-469

SEQ ID NO:22 es la secuencia de la proteína DIG-469

SEQ ID NO:23 secuencia de ADN que codifica DIG-473

SEQ ID NO:24 es la secuencia de la proteína DIG-473

SEQ ID NO:25 secuencia de ADN que codifica DIG-474

SEQ ID NO:26 es la secuencia de la proteína DIG-474

SEQ ID NO:27 secuencia de ADN que codifica DIG-482

SEQ ID NO:28 es la secuencia de la proteína DIG-482

SEQ ID NO:29 secuencia de ADN que codifica el codón de Cry1Ca modificado optimizado para el maíz (IRDIG544.11)

SEQ ID NO:30 es la secuencia de la proteína toxina Cry1Ca modificada (IRDIG544.11)

SEQ ID NO:31 secuencia de ADN que codifica una Cry1Ca modificada, IRDIG544.12, con alta optimización de codones GC

SEQ ID NO:32 secuencia de la proteína toxina para IRDIG544.12

SEQ ID NO:33 una secuencia de ADN optimizada para dicotiledóneas que codifica una Cry1Ca modificada, IRDIG544.9

SEQ ID NO:34 secuencia de la proteína Cry1Ca modificada, IRDIG544.9

SEQ ID NO:35 una secuencia de ADN optimizada para dicotiledóneas que codifica una Cry1Ca modificada, IRDIG544.8

SEQ ID NO:36 codón de la proteína IRDIG544.8 optimizado para dicotiledóneas

SEQ ID NO:37 secuencia de ADN que codifica una toxina Cry1Ca modificada fusionada al segmento de protoxina de Cry1Ab

SEQ ID NO:38 es la secuencia de la proteína toxina producida a partir del ADN de SEQ ID NO:37

SEQ ID NO:39 secuencia de ADN con alta optimización de codones GC que codifica una Cry1Ca modificada, IRDIG544.12, fusionada a TraP12

SEQ ID NO:40 es la toxina Cry1Ca modificada, IRDIG544.12, fusionada a TraP12

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 presenta los niveles de expresión de DIG-465 por la construcción 115752 y DIG-473 por la construcción 115753 en hojas de maíz T₁ muestreadas mediante punzones para hojas.

La Figura 2 es un gráfico de la cantidad de daño a las hojas en el maíz causada por FAW o FAW resistente a Cry1Fa versus el nivel de expresión de DIG-465.

La Figura 3 es un gráfico de la cantidad de daño a las hojas en el maíz causada por FAW o FAW resistente a Cry1Fa versus el nivel de expresión de DIG-473.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Mediante el uso aquí del término "material genético", se pretende incluir todos los genes, ácidos nucleicos, ADN y ARN. Estas secuencias han sido alteradas de manera tal de aumentar la estabilidad de la proteína toxina expresada cuando el gen es transformado en una planta, específicamente maíz y dicotiledóneas. Las proteínas toxinas discutidas aquí se denominan típicamente "insecticidas". Insecticidas significa aquí que las proteínas toxinas tienen una "actividad funcional", como se define adicionalmente aquí, y se usan como agentes de control de insectos.

"Actividad funcional" significa aquí que las proteínas toxinas funcionan como agentes de control de insectos porque las proteínas son activas por vía oral, o tienen un efecto tóxico, o son capaces de alterar o impedir la alimentación, lo que puede o no causar la muerte del insecto. Cuando un insecto entra en contacto con una cantidad eficaz de toxina entregada por expresión en una planta transgénica, una composición o composiciones de proteínas formuladas, una composición o composiciones de proteínas rociables, una matriz de cebo u otro sistema de entrega, los resultados son típicamente la muerte del insecto, o los insectos no se alimentan de la fuente que pone las toxinas a disposición de los insectos.

El uso del término "oligonucleótidos" significa una macromolécula consistente en una cadena corta de nucleótidos ya sea de ARN o ADN. Esta longitud podría ser de al menos un nucleótido, pero típicamente está en el rango de alrededor de 10 a alrededor de 12 nucleótidos. La determinación de la longitud del oligonucleótido está dentro de la capacidad de un experto en el arte y no debería ser una limitación aquí. Por lo tanto, los oligonucleótidos pueden tener menos de 10 o más de 12. La presente invención se refiere no sólo a las secuencias de polinucleótidos que codifican estas clases de toxinas, sino también al uso de estas secuencias de polinucleótidos para producir huéspedes recombinantes que expresan las toxinas.

El término "tóxico" o "toxicidad", como se usa aquí, significa que las toxinas producidas por *Bacillus thuringiensis* tienen "actividad funcional" como se define aquí.

En el uso del término "toxina(s) Cry1Ca modificada(s)", se pretende incluir todas las secuencias de proteínas del Listado de Secuencias y todas las variantes de las mismas descritas aquí.

El uso aquí del término "material genético" pretende incluir todos los genes, ácidos nucleicos, ADN y ARN.

Para la denominación de los residuos de nucleótidos de polinucleótidos, ADN, ARN, oligonucleótidos y partidores, y para la denominación de los residuos de amino ácidos de las proteínas, a través de este documento se emplean las abreviaturas estándar de IUPAC. Las secuencias de ácidos nucleicos se presentan en la dirección estándar de 5' a 3', y las secuencias de proteínas se presentan en la dirección estándar del terminal amino (N) al terminal carboxi (C).

Las toxinas y genes de la presente invención pueden definirse además por sus secuencias de amino ácidos y de nucleótidos, y la secuencia de fragmentos singulares comprendida por las secuencias de amino ácidos y el ADN de longitud completa. Las secuencias de las moléculas dentro de cada clase novedosa pueden definirse aquí en términos de homología con ciertas secuencias ejemplificadas, y también en términos de la capacidad para hibridarse con, o ser amplificadas por, ciertas sondas y partidores ejemplificados. Las clases de toxinas proporcionadas aquí también pueden identificarse en base a su inmunorreactividad con ciertos anticuerpos.

Estructura de la toxina. La toxina de la presente invención también puede caracterizarse en términos de la estructura y la composición de los dominios. La correlación de la variabilidad de secuencias de la proteína con diferencias en el espectro de bioactividad, llevan a la hipótesis temprana de que las regiones "hipervariables" entre los bloques tres y cinco son responsables de las diferencias en especificidad de insecto entre las endotoxinas delta de *B.t.*

Cuando el gen que codifica proteína Cry1Ca de longitud completa nativa fue insertado y expresado en células de maíz, se observaron al menos 5 productos de degradación proteolítica detectables. Se determinó que esos cinco polipéptidos tenían las siguientes longitudes de amino ácidos: 1-1164, 1-628, 29-628, 74-628 y 74-596. De los cinco productos de degradación de Cry1Ca detectados, se encontró que dos de los fragmentos eran inactivos contra las plagas de insectos clave. En la mayoría de los casos, estos dos fragmentos inactivos representaban una porción mayoritaria de las proteínas relacionadas con Cry1Ca detectadas en células de maíz. La expresión del gen de longitud completa nativo para Cry1Ca en maíz dio como resultado plantas que tenían insuficiente actividad funcional contra plagas de insectos clave, tal como *S. frugiperda*.

Cuando el gen que expresa proteína Cry1Ca nativa truncada (aa 1-628) fue insertado y expresado en células de maíz, ocurrió menos procesamiento proteolítico. La mayor parte permaneció no procesada y funcionalmente activa. Por lo tanto, la expresión del gen de Cry1Ca truncada en células de maíz dio como resultado plantas que tenían suficiente actividad funcional contra plagas de insectos clave, debido a una proteólisis reducida en células de maíz.

Una alteración de la secuencia de amino ácidos primaria de Cry1Ca permite una actividad biológica continua contra plagas de insectos clave, y resulta en menos procesamiento proteolítico de la proteína, según se mide *in vitro* usando quimotripsina como la enzima proteasa. Menos procesamiento proteolítico de la proteína Cry1Ca alterada resulta en mayores cantidades de proteína funcionalmente activa acumulándose en las plantas, y resulta en una mayor actividad contra las plagas de insectos blanco.

Variantes sensibles a proteasas. Las proteasas del intestino de los insectos típicamente funcionan ayudando al insecto a obtener los amino ácidos necesarios de la proteína

dietaria. Las proteasas digestivas de los insectos mejor entendidas son las serina proteasas, que parecen ser el tipo más común (Englemann y Geraerts, 1980), particularmente en especies de lepidópteros. Los insectos coleópteros tienen 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 de la papa de Colorado, tienen intestinos medios ligeramente ácidos, y las cisteína proteasas proporcionan la mayor actividad proteolítica (Wolfson y Murdock, 1990). Más precisamente, Thie y Houseman (1990) identificaron y caracterizaron las cisteína proteasas, de tipo catepsina B y de tipo catepsina H, y la aspartil proteasa, de tipo catepsina D, en el escarabajo de la papa de Colorado. Gillikin *et al.* (1992) caracterizaron la actividad proteolítica en los intestinos de larvas del gusano de la raíz del maíz occidental, y encontraron principalmente cisteína proteasas. La patente norteamericana US N° 7.230.167 divulgó que la serina proteasa, catepsina G, existe en el gusano de la raíz del maíz occidental. La diversidad y los diferentes niveles de actividad de las proteasas del intestino de los insectos pueden influir en la sensibilidad de un insecto a una toxina de *B.t.* particular.

En una modalidad, las toxinas tienen cambios específicos en sus secuencias de amino ácidos que reducen significativamente el nivel de procesamiento por proteasas de la proteína expresada, por proteasas que se encuentran naturalmente en plantas de maíz. Los cambios en los amino ácidos dan como resultado niveles más altos de actividad funcional de la proteína cuando se expresa en maíz. Sitios de escisión por proteasas pueden ser introducidos en ubicaciones deseadas por síntesis química de genes o PCR de empalme/superposición (Horton *et al.*, 1989). Secuencias de reconocimiento por serina proteasas, por ejemplo, pueden ser insertadas opcionalmente en sitios específicos en la estructura de la proteína Cry, para efectuar el procesamiento de la proteína en puntos de delección deseados en el intestino medio de ciertas plagas de insectos. Serina proteasas del intestino medio de los lepidópteros, tales como tripsina o enzimas de tipo tripsina, quimotripsina, elastasa, etc. (Christeller *et al.*, 1992) pueden utilizarse para la activación de proteínas Cry, introduciendo por ingeniería genética secuencias de reconocimiento para proteasas en sitios de procesamiento deseados. Igualmente, serina proteasas de coleópteros tales como tripsina, quimotripsina y proteasa parecida a catepsina G pueden

utilizarse de manera similar, introduciendo por ingeniería genética secuencias de reconocimiento en sitios de procesamiento deseados. Además, cisteína proteasas de coleópteros tales como catepsinas (proteasas similares a catepsina B, similares a catepsina L, similares a catepsina O y similares a catepsina K) (Koiwa *et al.*, 2000 y Bown *et al.*, 2004), metaloproteasas tal como ADAM10 (Ochoa-Campuzano *et al.*, 2007) y proteasas de ácido aspártico tales como similares a catepsina D y similares a catepsina E, pepsina, plasmepsina y quimosina, pueden utilizarse introduciendo por ingeniería genética secuencias de reconocimiento en sitios de procesamiento deseados.

El alcance de esta invención incluye proteínas insecticidas Cry1Ca variantes que son producidas manipulando la secuencia de codificación para las presentes proteínas insecticidas por introducción o eliminación de sitios de procesamiento por proteasas en posiciones apropiadas para permitir, o eliminar, la escisión proteolítica de una proteína variante más grande por proteasas de insectos, plantas o microorganismos. El resultado final de esta manipulación es la generación de moléculas de toxinas que tienen una actividad igual o mejor que la proteína toxina nativa intacta (de longitud completa).

A diferencia de la alta especificidad de secuencia asociada con las endonucleasas de restricción de Tipo II en el reconocimiento y escisión de sus sustratos de ADN, las enzimas proteolíticas son más inespecíficas en la secuencia de amino ácidos que comprende el sitio de reconocimiento y escisión. Se han descubierto algunas generalidades con respecto a las estructuras de amino ácidos que comprenden algunos sitios de escisión por proteasas, en particular, catepsina G en comparación con catepsinas B, K, L y S (Bown *et al.*, 2004). En la nomenclatura de los sitios de escisión por proteasas en las ilustraciones que siguen, los residuos de amino ácidos aguas arriba (o sea, hacia el terminal N) desde el sitio de escisión se numeran P1, P2, P3, P4, P5, etc., estando el residuo P1 inmediatamente adyacente al sitio de escisión, y siendo el residuo P5 el quinto más distal desde el sitio de escisión en la dirección N-terminal. Los residuos de amino ácidos aguas abajo (o sea, hacia el terminal C) desde el sitio de escisión se numeran P1', P2', P3', P4', P5' etc., estando el residuo P1' inmediatamente adyacente al sitio de escisión, y siendo el residuo P5' el quinto más distal desde el sitio de escisión en la dirección C-

terminal. Se sabe que catepsina G presenta una escisión preferencial después de los residuos P1 glutamina, lisina, triptófano o fenilalanina, donde los residuos P2, P3, P4, P5, etc., y P1', P2', P3', P4', P5', etc. pueden ser cualquiera de los 20 amino ácidos que normalmente se encuentran en las proteínas naturales. Una especificidad de secuencia del sitio de escisión algo aumentada demuestran las catepsinas B, K, L y S, donde la cadena lateral del amino ácido P2 se ajusta dentro de un sitio de unión al sustrato S2 de la catepsina. El sitio S2 de estas catepsinas de preferencia interactúa con amino ácidos P2 que tienen grandes cadenas laterales hidrofóbicas (por ejemplo, como las que se encuentran en valina, leucina, isoleucina, fenilalanina, triptófano y tirosina), y no favorece la interacción con residuos P2 que tienen cadenas laterales cargadas (excepto que las catepsinas B y L aceptan la gran cadena lateral cargada hidrofílica de arginina en la posición P2). Algo de especificidad se ve en la identidad del amino ácido en la posición P3. Por ejemplo, catepsina L escinde preferentemente después de arginina en la posición P1, cuando fenilalanina o arginina ocupan la posición P2. El amino ácido P3 puede ser ya sea de tipo aromático (por ejemplo fenilalanina, triptófano, histidina o tirosina) o de tipo hidrofóbico (por ejemplo alanina, valina, leucina, isoleucina, fenilalanina, triptófano o tirosina). Las posiciones P4, P5, etc. y P1', P2', P3', P4', P5', etc. pueden ser cualquiera de los 20 amino ácidos que normalmente se encuentran en las proteínas naturales.

La escisión proteolítica también es dependiente de la disponibilidad de la secuencia de escisión sujeta para la proteasa respectiva; el secuestro del sitio de escisión potencial dentro de la estructura tridimensional de la proteína puede volver a la proteína resistente a la escisión por la proteasa particular. Se piensa que la diversidad y los diferentes niveles de actividad de las proteasas del intestino de los insectos, pueden influir en la sensibilidad de un insecto a una toxina de *B.t.* particular. Un experto en las artes de la bioquímica y la biología molecular puede examinar las características bioquímicas (incluyendo, pero no limitadas a, determinación de las secuencias de los amino ácidos que constituyen el terminal N y el terminal C del polipéptido) de los fragmentos de proteína insecticida generados por escisión por proteasas/activación de proteínas más grandes por las proteasas del intestino de insectos susceptibles. También se puede caracterizar el régimen de proteasas de los intestinos de insectos

no susceptibles o de plantas huéspedes, e introducir por ingeniería genética, en lugares apropiados dentro de la secuencia de codificación para la proteína insecticida de *B.t.*, secuencias que pueden ser escindidas por las proteasas del intestino de insectos no susceptibles o de posibles plantas huéspedes en las cuales la proteína insecticida de *B.t.* será producida en forma transgénica. Se entiende que estos análisis y manipulaciones de presente proteína insecticida de *B.t.* están dentro del alcance de esta invención.

En otra modalidad, las toxinas tienen cambios específicos en sus secuencias de amino ácidos que aumentan significativamente el nivel de expresión de las proteínas, cuando se expresan en una variedad de diferentes sistemas de expresión incluyendo plantas y bacterias. El resultado de la expresión aumentada de la proteína es una actividad funcional aumentada en el sistema de expresión. Esto es ventajoso para proporcionar una alta dosis de la toxina al insecto, lo que puede prevenir que ocurra resistencia en los insectos a las toxinas debido a la supervivencia de pequeñas poblaciones de insectos que reciben una dosis subletal de la proteína toxina.

Genes y toxinas. Las moléculas de proteínas de las presentes modalidades comprenden secuencias de amino ácidos que son homólogas a proteínas plaguicidas conocidas, particularmente proteínas Cry de *B.t.*, más particularmente proteína Cry1Ca (Genbank N° de acceso AAA22343). Las secuencias de amino ácidos pronosticadas codificadas por secuencias de nucleótidos de las modalidades se divulgan como SEQ ID NOs:2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38 y 40.

Las secuencias de las toxinas de la presente invención se divulgan como SEQ ID NOs:2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38 y 40. En una modalidad preferida, las toxinas de la presente invención tienen al menos una de las siguientes características:

(a) dicha toxina es codificada por una secuencia de nucleótidos que se hibrida bajo condiciones rigurosas con una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo consistente en SEQ ID NOs:1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, o sus secuencias complementarias,

(b) dicha toxina es inmunorreactiva con un anticuerpo producido contra una toxina plaguicida de aproximadamente 68-71 kDa, o un fragmento de la misma, a partir de un aislado de *Bacillus thuringiensis*,

(c) dicha toxina es codificada por una secuencia de nucleótidos donde una porción de dicha secuencia de nucleótidos puede ser amplificada por PCR, usando un par de partidores para producir un fragmento de alrededor de 25-40 bp,

(d) dicha toxina comprende una porción plaguicida de las secuencias de amino ácidos mostradas en SEQ ID NOs:2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38 y 40,

(e) dicha toxina comprende una secuencia de amino ácidos que tiene al menos alrededor de (90%) de homología con una porción plaguicida de una secuencia de amino ácidos seleccionada del grupo consistente en SEQ ID NOs:2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38 y 40,

(f) dicha toxina es codificada por una secuencia de nucleótidos que se hibrida bajo condiciones rigurosas con una porción insecticida de una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo consistente en ADN que codifica SEQ ID NOs:2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38 y 40,

(g) dicha toxina es inmunorreactiva con un anticuerpo contra una toxina plaguicida de aproximadamente 68 kDa o 130 kDa, o un fragmento de la misma, de un aislado de *Bacillus thuringiensis*, MR-1206,

(h) dicha toxina comprende una secuencia de amino ácidos que tiene al menos alrededor de (90%) de homología con una secuencia de amino ácidos seleccionada del grupo consistente en SEQ ID NOs:2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38 y 40 y porciones plaguicidas de SEQ ID NOs:2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38 y 40.

Los genes específicos ejemplificados aquí, variaciones de estos genes, y fragmentos de estos genes también pueden obtenerse, por ejemplo, mediante construcción

sintética por métodos actualmente practicados por cualquiera de varios proveedores comerciales (véase por ejemplo la patente norteamericana US N° 7.482.119). Estos genes, o porciones o variantes de los mismos, también pueden construirse sintéticamente, por ejemplo mediante el uso de un sintetizador de genes y los métodos, por ejemplo, de la patente norteamericana US N° 5.380.831. Alternativamente, variaciones de genes sintéticos o que existen en la naturaleza pueden construirse fácilmente usando técnicas estándar de biología molecular para efectuar mutaciones de punto. También pueden fabricarse fragmentos de estos genes usando exonucleasas o endonucleasas disponibles en el comercio, de acuerdo con procedimientos estándar. Por ejemplo, enzimas tal como Bal31 o mutagénesis dirigida a un sitio pueden usarse para cortar sistemáticamente nucleótidos desde los extremos de estos genes. También, fragmentos de genes que codifican fragmentos de toxina activos pueden obtenerse usando una variedad de enzimas de restricción.

Moléculas de ácidos nucleicos que son fragmentos de una secuencia de nucleótidos que codifica una toxina reivindicada, comprenden al menos alrededor de 15, 20, 30, 40, 50, 60, 75, 100, 200, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1.000, 1.100, 1.200, 1.300, 1.400, 1.500, 1.600, 1.700, 1.800, 1.900, 2.000, 2.100, 2.200, 2.300, 2.400, 2.500, 3.000, 3.500 nucleótidos, o hasta el número de nucleótidos presentes en una secuencia de nucleótidos que codifica una toxina insecticida reivindicada de longitud completa divulgada aquí (por ejemplo, 1.878 nucleótidos para SEQ ID NO:1; 3.495 nucleótidos para SEQ ID NO:37), dependiendo del uso proyectado. Un fragmento de una secuencia de nucleótidos que codifica una porción biológicamente activa de una proteína reivindicada de la invención codificará al menos alrededor de 15, 25, 30, 40, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 800, 900, 1.000, 1.100 ó 1.200 amino ácidos contiguos, o hasta el número total de amino ácidos presentes en una proteína insecticida de longitud completa de la invención (por ejemplo, 625 amino ácidos para SEQ ID NO:2 o 1.164 amino ácidos para SEQ ID NO:38).

Huéspedes recombinantes. Los genes que codifican toxinas de la presente invención pueden ser introducidos en una amplia variedad de huéspedes microbianos o plantas.

La expresión del gen de la toxina resulta, directa o indirectamente, en la producción intracelular y mantención de la proteína plaguicida. Con huéspedes microbianos adecuados, por ejemplo *Pseudomonas*, los microbios pueden ser aplicados al medio ambiente de la plaga, donde proliferarán y pueden ser ingeridos. El resultado es el control de la plaga. Alternativamente, el microbio que hospeda al gen de la toxina puede ser tratado bajo condiciones que prolongan la actividad de la toxina y estabilizan la célula. La célula tratada, que retiene la actividad tóxica, puede ser aplicada después al medio ambiente de la plaga blanco.

Cuando el gen de la toxina es introducido mediante un vector adecuado en un huésped microbiano, y dicho huésped es aplicado al medio ambiente en un estado vivo, es esencial que se usen ciertos microbios huéspedes. Se seleccionan microorganismos huéspedes que se sabe que ocupan la "fitosfera" (filoplano, filosfera, rizosfera y/o rizoplano) de uno o más cultivos de interés. Estos microorganismos se seleccionan para que sean capaces de competir exitosamente en el medio ambiente particular (cultivo y otros hábitats de insectos) con los microorganismos autóctonos de tipo silvestre, permitir una mantención y expresión estable del gen que expresa el polipéptido plaguicida y, convenientemente, proporcionar una protección mejorada al plaguicida contra la degradación medioambiental e inactivación.

Esporas de *B.t.* o células huéspedes recombinantes también pueden ser tratadas antes de ser aplicadas o formuladas para aplicación a plantas. Por ejemplo, esporas de *B.t.* aisladas y/o cristales de toxinas pueden ser tratados químicamente para prolongar la actividad insecticida y así incluir un polipéptido tratado de la invención (patente norteamericana US N° 4.695.462 y Gaertner *et al.*, 1993).

Se conoce un gran número de microorganismos que habitan en el filoplano (la superficie de las hojas de las plantas) y/o en la rizosfera (el suelo que rodea a las raíces de las plantas) de una amplia variedad de importantes cultivos. Estos microorganismos incluyen bacterias, algas y hongos. De particular interés son los microorganismos, tales como bacterias, por ejemplo los géneros *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Serratia*, *Klebsiella*, *Xanthomonas*, *Streptomyces*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Rhodopseudomonas*, *Methylophilus*, *Agrobacterium*, *Acetobacter*, *Lactobacillus*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Leuconostoc* y *Alcaligenes*; y hongos,

particularmente levaduras, por ejemplo los géneros *Saccharomyces*, *Cryptococcus*, *Kluyveromyces*, *Sporobolomyces*, *Rhodotorula* y *Aureobasidium*. De particular interés son las especies bacterianas de la fitosfera, como *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas fluorescens*, *Serratia marcescens*, *Acetobacter xylinum*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Agrobacterium radiobacter*, *Rhodopseudomonas spheroides*, *Xanthomonas campestris*, *Sinorhizobium meliloti* (anteriormente *Rhizobium meliloti*), *Alcaligenes eutrophus* y *Azotobacter vinelandii*; y especies de levaduras de la fitosfera tales como *Rhodotorula rubra*, *R. glutinis*, *R. marina*, *R. aurantiaca*, *Cryptococcus albidus*, *C. diffluens*, *C. laurentii*, *Saccharomyces rosei*, *S. pretoriensis*, *S. cerevisiae*, *Sporobolomyces roseus*, *S. odoratus*, *Kluyveromyces veronae* y *Aureobasidium pollulans*. De particular interés son los microorganismos pigmentados.

Una modalidad preferida de la presente invención es la transformación de plantas con genes que codifican la presente proteína insecticida o sus variantes. Las plantas transformadas son resistentes al ataque por una plaga de insectos blanco, en virtud de la presencia de cantidades controladoras de la presente proteína insecticida o sus variantes en las células de la planta transformada. Incorporando material genético que codifica las propiedades insecticidas de las toxinas insecticidas de *B.t.* dentro del genoma de una planta ingerida por una plaga de insectos particular, los adultos o larvas morirán después de consumir la planta de alimento. Numerosos miembros de las clasificaciones monocotiledónea y dicotiledónea han sido transformados. Cultivos agrícolas al igual que frutas y verduras transgénicos tienen interés comercial. Estos cultivos incluyen, pero no están limitados a, maíz, arroz, soya, canola, girasol, alfalfa, sorgo, trigo, algodón, maní, tomates, papas y similares. Existen varias técnicas para introducir material genético foráneo en células de plantas monocotiledóneas o dicotiledóneas, y para obtener plantas fértiles que mantengan y expresen en forma estable el gen introducido. Estas técnicas incluyen aceleración de material genético recubierto sobre micropartículas directamente dentro de las células (patentes norteamericanas US 4.945.050 y US 5.141.131). Las plantas pueden ser transformadas usando tecnología de *Agrobacterium*, véase la patente norteamericana US 5.177.010, patente norteamericana US 5.104.310, solicitud de patente europea 0131624 B1, solicitud de patente europea 120516, solicitud de patente europea 159418 B, solicitud de patente

europea 176112, patente norteamericana US 5.149.645, patente norteamericana US 5.469.976, patente norteamericana US 5.464.763, patente norteamericana US 4.940.838, patente norteamericana US 4.693.976, solicitud de patente europea 116718, solicitud de patente europea 290799, solicitud de patente europea 320500, solicitud de patente europea 604662, solicitud de patente europea 627752, solicitud de patente europea 0267159, solicitud de patente europea 0292435, patente norteamericana US 5.231.019, patente norteamericana US 5.463.174, patente norteamericana US 4.762.785, patente norteamericana US 5.004.863 y patente norteamericana US 5.159.135. Otra tecnología de transformación incluye la tecnología WHISKERS®, véase la patente norteamericana US 5.302.523 y la patente norteamericana US 5.464.765. Tecnología de electroporación también ha sido usada para transformar plantas, véase la patente WO 87/06614, patente norteamericana US 5.472.869, patente norteamericana US 5.384.253 y las patentes WO 9209696 y WO 9321335. Todas estas patentes y publicaciones de transformación se incorporan por referencia. Además de las numerosas tecnologías para transformar plantas, el tipo de tejido que se pone en contacto con los genes foráneos también puede variar. Estos tejidos incluirán, pero no estarán limitados a, tejido embriogénico, tejido de callo tipo I y II, hipocotilo, meristema y similares. Casi todos los tejidos de plantas pueden ser transformados durante la dediferenciación, usando técnicas apropiadas que están dentro de la capacidad de un experto en el arte.

Genes que codifican toxinas insecticidas Cry1Ca modificadas pueden ser insertados en células de plantas usando una variedad de técnicas que son bien conocidas en el arte, como se divulgó más arriba. Por ejemplo, un gran número de vectores de clonación que comprenden un marcador que permite la selección de las células microbianas transformadas y un sistema de replicación funcional en *E. coli*, están disponibles para la preparación y modificación de genes foráneos para su inserción en plantas superiores. Estas manipulaciones pueden incluir, por ejemplo, la inserción de mutaciones, truncamientos, adiciones, deleciones o sustituciones, según se desee para el uso proyectado. Los vectores comprenden, por ejemplo, pBR322, serie pUC, serie M13mp, pACYC184, etc. En consecuencia, la secuencia que codifica la proteína Cry o variantes puede ser insertada dentro del vector en un sitio de restricción adecuado. El plásmido

resultante se usa para la transformación de *E. coli*, cuyas células son cultivadas en un medio nutriente adecuado, y después cosechadas y lisadas de manera que se recuperen cantidades utilizables del plásmido. Análisis de secuencias, análisis de fragmentos de restricción, electroforesis y otros métodos bioquímicos y de biología molecular se llevan a cabo generalmente como métodos de análisis. Después de cada manipulación, la secuencia de ADN usada puede ser escindida y unida a la secuencia de ADN siguiente. Cada secuencia de ADN manipulada puede ser clonada en el mismo o en otros plásmidos.

Dependiendo del método de transformación de plantas, pueden ser necesarias secuencias de ADN auxiliares. Si, por ejemplo, un plásmido Ti o Ri se usa para la transformación de la célula de planta, entonces al menos una repetición del borde derecho del ADN-T, pero frecuentemente tanto la repetición del borde derecho como la repetición del borde izquierdo del plásmido Ti o Ri, serán unidas como la región flanqueadora de los genes que se desea insertar en la célula de planta. El uso de vectores que contienen ADN-T para la transformación de células de plantas ha sido investigado intensivamente y descrito suficientemente en la patente europea 120516; Lee y Gelvin (2008), Fraley *et al.* (1986) y An *et al.* (1985), y está bien establecido en el área.

Una vez que el ADN insertado ha sido integrado en el genoma de la planta, es relativamente estable por las generaciones subsiguientes. El vector usado para transformar la célula de planta normalmente contiene un gen marcador seleccionable que codifica una proteína que confiere a las células de planta transformadas, tolerancia a un herbicida o un antibiótico, tal como bialafos, kanamicina, G418, bleomicina o higromicina, entre otros. En consecuencia, el gen marcador seleccionable empleado individualmente debería permitir la selección de las células transformadas, en tanto que el crecimiento de las células que no contienen el ADN insertado es reprimido por el compuesto selectivo.

Un gran número de técnicas están disponibles para insertar ADN en una célula de planta huésped. Esas técnicas incluyen transformación con ADN-T entregado por *Agrobacterium tumefaciens* o *Agrobacterium rhizogenes* como el agente de transformación. Adicionalmente, puede emplearse fusión de protoplastos de planta con liposomas que contienen el ADN que será

entregado, inyección directa del ADN, transformación biolística (bombardeo de micropartículas) o electroporación, al igual que otros métodos posibles. Un experto en el campo de la transformación de plantas entenderá que hay disponibles múltiples metodologías para la producción de plantas transformadas, y las mismas pueden ser modificadas y especializadas para adaptarse a las diferencias biológicas entre diversas especies de plantas huéspedes.

Si se usan cepas de *Agrobacterium* para la transformación, el ADN que será insertado será clonado dentro de plásmidos especiales, a saber ya sea en un vector (transportador ("shuttle")) intermediario o en un vector binario. Los vectores intermediarios pueden ser integrados en el plásmido Ti o Ri o derivados de los mismos por recombinación homóloga, debido a secuencias que son homólogas entre el plásmido Ti o Ri y el plásmido intermediario. El plásmido Ti o Ri también comprende la región vir que comprende genes vir necesarios para la transferencia del ADN-T. Los vectores intermediarios no pueden replicarse en *Agrobacteria*. El vector intermediario puede ser transferido a *Agrobacterium tumefaciens* mediante un plásmido ayudante (vía conjugación bacteriana), por electroporación, por introducción directa de ADN, transformación mediada químicamente, o por otras metodologías. Los vectores binarios pueden replicarse autónomamente en células tanto de *E. coli* como de *Agrobacterium*. Comprenden secuencias, enmarcadas por las regiones de repetición de los bordes derecho e izquierdo del ADN-T, que pueden incluir un gen marcador seleccionable funcional para la selección de células de plantas transformadas, un enlazador de clonación, un polienlazador de clonación, u otra secuencia que pueda funcionar como un sitio de introducción para genes destinados a la transformación de células de plantas. Ellas pueden ser transformadas directamente dentro de células de *Agrobacterium* (Holsters *et al.*, (1978)) por electroporación, o por introducción directa de ADN, transformación mediada químicamente, o introducidas por conjugación bacteriana, o por otras metodologías. El *Agrobacterium* usado como célula huésped comprenderá un plásmido que lleva una región vir. La región vir es necesaria para la transferencia del ADN-T a la célula de planta. Regiones de ADN-T adicionales, además de aquella que contiene el gen que codifica la proteína toxina insecticida de *B.t.* o sus variantes, pueden estar presentes en la célula huésped de *Agrobacterium*. Las células bacterianas así transformadas se usan para la transformación de

células de plantas. Explantes de plantas (por ejemplo, trozos de hoja, segmentos de tallo, raíces, pero también protoplastos o células cultivadas en suspensión) pueden cultivarse ventajosamente con *Agrobacterium tumefaciens* o *Agrobacterium rhizogenes* para la transferencia del ADN a la célula de planta. Luego, plantas completas pueden ser regeneradas a partir del material de planta infectado, después de colocarlo en adecuadas condiciones de crecimiento y medio de cultivo, que puede contener antibióticos o herbicidas para la selección de las células de plantas transformadas. Enseguida, las plantas así obtenidas pueden analizarse en cuanto a la presencia del ADN insertado.

Las células transformadas crecen dentro de las plantas de la manera habitual. Pueden formar células germinales y transmitir el o los rasgos transformados a plantas de prole. Estas plantas pueden cultivarse de manera normal y ser cruzadas con plantas que tienen los mismos factores hereditarios transformados u otros factores hereditarios. Los individuos híbridos resultantes tienen las propiedades fenotípicas correspondientes, por ejemplo, la capacidad de controlar la alimentación de insectos plaga de las plantas.

No se hacen exigencias especiales en la construcción de los plásmidos en el caso de aquellos usados para inyección y electroporación. Es posible usar plásmidos normales, por ejemplo derivados de pUC apropiadamente modificados para contener todos los genes que se desea transferir a las células de plantas.

La actividad de los polinucleótidos recombinantes insertados en células de plantas puede ser dependiente de la influencia del ADN de planta endógeno adyacente al inserto. Así, otra opción es aprovechar los eventos que se sabe que son excelentes ubicaciones en un genoma de planta para inserciones. Véase por ejemplo la patente WO 2005/103266 A1, referente a eventos de Cry1F y Cry1Ac en algodón; el gen de presente la toxina insecticida de *B.t.* puede ser sustituido en esos loci genómicos en lugar de los insertos de Cry1F o Cry1Ac. Recombinación homóloga direccional, por ejemplo, puede usarse de acuerdo con la presente invención. Este tipo de tecnología es la materia, por ejemplo, de la patente WO 03/080809 y la solicitud norteamericana publicada correspondiente (USPA 2003/0232410), relativas al uso de dedos de

zinc para recombinación direccional. El uso de recombinasas (cre-lox y flp-*frt*, por ejemplo) también es conocido en el arte.

En una modalidad preferida de la presente invención, las plantas serán transformadas con genes donde el uso de codones de la región codificadora de la proteína ha sido optimizado para plantas. Véase por ejemplo la patente norteamericana US N° 5.380.831, que se incorpora aquí por referencia. También se usarán ventajosamente plantas que codifican una toxina trunca. La toxina trunca típicamente codificará de alrededor del 55% a alrededor del 80% de la toxina de longitud completa. Los métodos para crear genes de *B.t.* sintéticos para el uso en plantas son conocidos en el arte (Stewart, 2007).

Otra variable es la elección de un marcador seleccionable. La preferencia por un marcador particular es a discreción del experto en el arte, pero puede usarse cualquiera de los siguientes marcadores seleccionables junto con cualquier otro gen no mencionado aquí que pudiera funcionar como un marcador seleccionable. Estos marcadores seleccionables incluyen pero no están limitados al gen de aminoglicósido fosfotransferasa del transposón Tn5 (Aph II) que codifica resistencia a los antibióticos kanamicina, neomicina y G418, y también aquellos genes que codifican tolerancia a herbicidas de glifosato; higromicina; metotrexato; fosfinitricina (bialafos), imidazolinonas, sulfonilureas y triazolopirimidinas, tales como clorosulfurona, bromoxinil, dalapón y similares. Ejemplos de estos genes se proporcionan en Merlo (2002), que se incorpora aquí por referencia.

Además de un marcador seleccionable, puede ser deseable usar un gen reportero. En algunos casos, puede usarse un gen reportero sin un marcador seleccionable. Los genes reporteros son genes que típicamente no proporcionan una ventaja de crecimiento al organismo o tejido que los recibe. El gen reportero típicamente codifica una proteína que proporciona algún cambio fenotípico o propiedad enzimática. Un gen reportero preferido es el gen de glucuronidasa (GUS). Otros ejemplos de genes reporteros se proporcionan en Merlo (2002).

Independientemente de la técnica de transformación, el gen preferentemente es incorporado en un vector de transferencia de genes adaptado para expresar los genes de las toxinas insecticidas de *B.t.* y variantes en la célula de planta, incluyendo en el vector un promotor

de planta. Además de los promotores de plantas, promotores provenientes de una variedad de fuentes pueden usarse eficientemente en células de plantas para expresar genes foráneos. Por ejemplo, pueden usarse promotores de origen bacteriano, tales como el promotor de octopina sintasa, el promotor de nopalina sintasa, el promotor de manopina sintasa; promotores de origen viral, tales como los promotores 35S y 19S del virus de mosaico de coliflor, y similares. Los promotores de plantas incluyen, pero no están limitados a, la subunidad pequeña (ssu) de ribulosa-1,6-bisfosfato (RUBP) carboxilasa, promotor de beta-conglicina, promotor de faseolina, promotor de ADH (alcohol deshidrogenasa), promotores de choque térmico, promotor de ADF (factor de despolimerización de actina) y promotores con especificidad de tejido. Los promotores también pueden contener ciertos elementos de secuencias potenciadoras que pueden mejorar la eficiencia de la transcripción. Los potenciadores típicos incluyen, pero no están limitados a, ADH1-intrón 1 y ADH1-intrón 6. Pueden usarse promotores constitutivos. Los promotores constitutivos dirigen la expresión génica continua en casi todos los tipos de células y en casi todos los momentos (por ejemplo, actina, ubiquitina, CaMV 35S). Los promotores con especificidad de tejido son responsables de la expresión génica en tipos específicos de células o tejidos, tales como las hojas o semillas (por ejemplo, zeína, oleosina, napina, ACP (Proteína portadora de acilo)), y estos promotores también pueden usarse. También pueden usarse promotores que son activos durante una cierta etapa del desarrollo de las plantas, y también activos en tejidos y órganos específicos de las plantas. Los ejemplos de estos promotores incluyen, pero no están limitados a, promotores que son específicos para la raíz, específicos para el polen, específicos para el embrión, específicos para el pelo de choclo, específicos para la fibra de algodón, específicos para el endosperma de la semilla, específicos para el floema, y similares.

Bajo ciertas circunstancias, puede ser deseable usar un promotor inducible. Un promotor inducible es responsable de la expresión de genes en respuesta a una señal específica, tal como: estímulo físico (por ejemplo, genes de choque térmico); luz (por ejemplo, RUBP carboxilasa); hormona (por ejemplo, glucocorticoide); antibiótico (por ejemplo, tetraciclina); metabolitos; y estrés (por ejemplo, sequía). Pueden usarse otros elementos de transcripción y traducción deseables que funcionan en plantas, tales como secuencias líder no traducidas en 5',

secuencias de terminación de la transcripción de ARN y secuencias de señal de adición de poliadenilato. Numerosos vectores de transferencia de genes con especificidad de planta son conocidos en el arte.

La presente invención incluye células de plantas que no son totipotentes (no totipotentes), células de plantas que no son material de propagación (por ejemplo, células de hojas en algunas modalidades; las células de semillas están excluidas de algunas modalidades) y son incapaces de diferenciarse a plantas completas. La presente invención incluye células de plantas que tienen otros usos distintos de regenerarse a una planta completa. Por ejemplo, dichas células de plantas pueden usarse para producir una proteína (tal como una proteína DIG-465 de la presente invención). Por lo tanto, las células de plantas de la presente invención incluyen aquellas que tienen otros usos distintos de la totipotencia (o sea, algunas células de la presente invención no son regenerables a una planta completa). Sin embargo, algunas modalidades sí incluyen células de semillas y células de plantas que pueden regenerarse a una planta completa.

Otro método para identificar las toxinas y genes de la presente invención es mediante el uso de sondas de oligonucleótidos. Estas sondas son secuencias de nucleótidos detectables. Estas secuencias pueden volverse detectables en virtud de un marcador radioactivo apropiado, o pueden volverse inherentemente fluorescentes como se describe en la patente norteamericana US N° 6.268.132. Como es bien conocido en el arte, si la molécula de sonda y la muestra de ácido nucleico se hibridan por formación de fuertes enlaces de apareamiento de bases entre las dos moléculas, puede suponerse razonablemente que la sonda y la muestra tienen una homología de secuencia sustancial. De preferencia, la hibridación se efectúa bajo condiciones rigurosas por técnicas bien conocidas en el arte, como se describe por ejemplo en Keller y Manak (1993). La detección de la sonda proporciona un medio para determinar, de una manera conocida, si ha ocurrido la hibridación. Este análisis con sonda proporciona un método rápido para identificar genes que codifican toxinas de la presente invención. Los segmentos de nucleótidos que se usan como sondas de acuerdo con la invención pueden sintetizarse usando un sintetizador de ADN y procedimientos estándar. Estas secuencias de nucleótidos también pueden usarse como partidores de PCR para amplificar genes de la presente invención.

Como se usan aquí, los términos "condiciones rigurosas" o "condiciones de hibridación rigurosas" pretenden referirse a condiciones bajo las cuales una sonda se hibridará (apareará) con su secuencia blanco hasta un grado detectablemente mayor que con otras secuencias (por ejemplo, al menos 2 veces por sobre el valor de referencia). Las condiciones rigurosas son dependientes de la secuencia y serán diferentes en diferentes circunstancias. Controlando la rigurosidad de las condiciones de la hibridación y/o del lavado, pueden identificarse secuencias blanco que son 100% complementarias a la sonda (sondeo homólogo). Alternativamente, las condiciones de rigurosidad pueden ajustarse para permitir alguna desigualdad en las secuencias, de manera que se detecten grados más bajos de similaridad (sondeo heterólogo). Generalmente, una sonda tiene menos de alrededor de 1.000 nucleótidos de longitud, preferentemente menos de 500 nucleótidos de longitud.

Típicamente, condiciones rigurosas serán aquéllas en las cuales la concentración de sal es menos de alrededor de 1,5 M de ion Na, típicamente una concentración de alrededor de 0,01 a 1,0 M de ion Na (u otras sales) a entre pH 7,0 y pH 8,3, y la temperatura es al menos alrededor de 30°C para sondas cortas (por ejemplo 10 a 50 nucleótidos) y al menos alrededor de 60°C para sondas largas (por ejemplo más de 50 nucleótidos). También pueden lograrse condiciones rigurosas con la adición de agentes desestabilizadores, tal como formamida. Los ejemplos de condiciones de rigurosidad baja incluyen hibridación con una solución tampón de 30% a 35% de formamida, 1 M de NaCl, 1% de SDS (dodecilsulfato de sodio) a 37°C, y un lavado en SSC 1x a 2x (SSC 20x = 3,0 M de NaCl/0,3 M de citrato trisódico) a entre 50°C y 55°C. Los ejemplos de condiciones de rigurosidad moderada incluyen hibridación en 40% a 45% de formamida, 1,0 M de NaCl, 1% de SDS a 37°C, y un lavado en SSC 0,5x a 1x a entre 55°C y 60°C. Los ejemplos de condiciones de rigurosidad alta incluyen hibridación en 50% de formamida, 1 M de NaCl, 1% de SDS a 37°C, y un lavado en SSC 0,1x a entre 60°C y 65°C. Opcionalmente, los tampones de lavado pueden comprender de alrededor de 0,1% a alrededor de 1% de SDS. La duración de la hibridación generalmente es menos de alrededor de 24 horas, habitualmente de alrededor de 4 a alrededor de 12 horas.

La especificidad es típicamente la función de los lavados post-hibridación, siendo los factores críticos la fuerza iónica y la temperatura de la solución de lavado final. Para híbridos ADN/ADN, el punto de fusión térmico (T_m) es la temperatura (bajo fuerza iónica y pH definidos) a la cual el 50% de una secuencia blanco complementaria se hibrida con una sonda perfectamente igualada. El T_m disminuye en alrededor de 1°C por cada 1% de desigualdad; así, el T_m , las condiciones de hibridación y/o las condiciones de lavado pueden ajustarse para facilitar el apareamiento de secuencias de la identidad deseada. Por ejemplo, si se buscan secuencias con $>90\%$ de identidad, el T_m puede disminuirse en 10°C . Generalmente, las condiciones rigurosas se seleccionan para que sean alrededor de 5°C por debajo del T_m para la secuencia específica y su complemento, a una fuerza iónica y pH definidos. Sin embargo, las condiciones altamente rigurosas pueden utilizar una hibridación y/o lavado a 1°C , 2°C , 3°C o 4°C por debajo del T_m ; las condiciones moderadamente rigurosas pueden utilizar una hibridación y/o lavado a 6°C , 7°C , 8°C , 9°C o 10°C por debajo del T_m , y las condiciones de baja rigurosidad pueden utilizar una hibridación y/o lavado a 11°C , 12°C , 13°C , 14°C , 15°C o 20°C por debajo del T_m .

El T_m (en $^\circ\text{C}$) puede determinarse experimentalmente o puede aproximarse por cálculo. Para híbridos ADN-ADN, el T_m puede aproximarse a partir de la ecuación de Meinkoth y Wahl (1984):

$$T_m(^{\circ}\text{C}) = 81,5^{\circ}\text{C} + 16,6(\log M) + 0,41(\% \text{ GC}) - 0,61(\% \text{ formamida}) - 500/L;$$

donde M es la molaridad de los cationes monovalentes, % GC es el porcentaje de los nucleótidos guanosina y citosina en el ADN, % formamida es el porcentaje de formamida en la solución de hibridación, y L es la longitud del híbrido en pares de bases.

Alternativamente, el T_m se describe mediante la siguiente fórmula (Beltz *et al.*, 1983).

$$T_m(^{\circ}\text{C}) = 81,5^{\circ}\text{C} + 16,6(\log[\text{Na}^+]) + 0,41(\% \text{ GC}) - 0,61(\% \text{ formamida}) - 600/L;$$

donde $[Na^+]$ es la molaridad de los iones sodio, % GC es el porcentaje de los nucleótidos guanosina y citosina en el ADN, % formamida es el porcentaje de formamida en la solución de hibridación, y L es la longitud del híbrido en pares de bases.

Usando las ecuaciones, las composiciones de hibridación y de lavado, y el T_m deseado, los técnicos de nivel medio entenderán que las variaciones en la rigurosidad de las soluciones de hibridación y/o lavado están descritas inherentemente. Si el grado deseado de desigualdad da como resultado un T_m de menos de 45°C (solución acuosa) o 32°C (solución en formamida), es preferible aumentar la concentración de SSC de manera que pueda usarse una temperatura más alta. Una guía exhaustiva para la hibridación de ácidos nucleicos se encuentra en Tijssen (1993) y Ausubel *et al.* (1995). Véase también Sambrook *et al.* (1989).

La hibridación de ADN inmovilizado en inmunotransferencias "Southern blot" con sondas con especificidad de gen marcadas radioactivamente, puede efectuarse por métodos estándar (Sambrook *et al.*, *supra.*). Los isótopos radioactivos usados para marcar sondas de polinucleótidos pueden incluir ^{32}P , ^{33}P , ^{14}C o 3H . La incorporación de isótopos radioactivos en moléculas de sondas de polinucleótidos puede efectuarse por cualquiera de varios métodos bien conocidos para los expertos en el campo de la biología molecular. (Véase, por ejemplo Sambrook *et al.*, *supra.*). En general, la hibridación y los lavados subsiguientes pueden llevarse a cabo bajo condiciones rigurosas que permiten la detección de secuencias blanco con homología con los genes que codifican las toxinas reivindicadas. Para sondas de genes de ADN de doble hebra, la hibridación puede llevarse a cabo durante la noche a 20-25°C por debajo del T_m del híbrido de ADN en SSPE 6x, solución de Denhardt 5x, 0,1% de SDS, 0,1 mg/ml de ADN desnaturalizado [SSPE 20x es 3 M de NaCl, 0,2 M de $NaHPO_4$ y 0,02 M de EDTA (sal sódica del ácido etilendiamino tetraacético); solución de Denhardt 100x es 20 g/l de polivinilpirrolidona, 20 g/l de Ficoll tipo 400 y 20 g/l de albúmina de suero de bovino (fracción V)].

Los lavados pueden efectuarse típicamente como sigue:

- (1) Dos veces a temperatura ambiente por 15 minutos en SSPE 1x, 0,1% de SDS (lavado de baja rigurosidad).

(2) Una vez a $T_m - 20^{\circ}\text{C}$ por 15 minutos en SSPE 0,2x, 0,1% de SDS (lavado de rigurosidad moderada).

Para sondas de oligonucleótidos, la hibridación puede efectuarse durante la noche a $10-20^{\circ}\text{C}$ por debajo del T_m del híbrido en SSPE 6x, solución de Denhardt 5x, 0,1% de SDS, 0,1 mg/ml de ADN desnaturalizado. El T_m para sondas de oligonucleótidos puede determinarse por la siguiente fórmula (Suggs *et al.*, 1981).

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

Los lavados pueden efectuarse típicamente como sigue:

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

Un experto en el arte sabrá que las moléculas de la sonda para hibridación y las moléculas del híbrido formado entre la sonda y moléculas blanco pueden volverse detectables por medios distintos de la marcación radioactiva.

Toxinas variantes. Los genes y toxinas útiles de acuerdo con la presente invención incluyen no sólo las secuencias truncadas divulgadas, sino también secuencias de longitud completa, fragmentos de estas secuencias, variantes, mutantes, y proteínas de fusión que retienen la actividad plaguicida característica de las toxinas específicamente ejemplificadas aquí. Como se usan aquí, los términos "variantes" o "variaciones" de genes se refieren a secuencias de nucleótidos que codifican las mismas toxinas o que codifican toxinas equivalentes que tienen actividad plaguicida. Además como se usa aquí, el término "toxinas equivalentes" se refiere a toxinas que tienen la misma o esencialmente la misma actividad biológica contra las plagas blanco que las toxinas reivindicadas. Así, las variantes o variaciones de las toxinas reivindicadas tendrán al menos alrededor del 30%, de preferencia al menos alrededor del 50%, de mayor

preferencia al menos alrededor del 70%, de mayor preferencia aún al menos alrededor del 80% de la actividad de las toxinas reivindicadas. Los métodos para medir actividad plaguicida son bien conocidos en el arte y están ejemplificados aquí. El término "variantes" pretende incluir aquí proteínas o polipéptidos que tienen una secuencia de amino ácidos que es al menos alrededor de 60%, 65%, de preferencia alrededor de 70%, 75%, de mayor preferencia alrededor de 80%, 85%, de máxima preferencia alrededor de 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NOs:2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38 y 40. Las variantes también incluyen polipéptidos codificados por una molécula de ácido nucleico que se hibrida con la molécula de ácido nucleico de SEQ ID NOs:1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37 ó 39, o un complemento de la misma, bajo condiciones rigurosas. Estas variantes generalmente retendrán la actividad reivindicada. Las variantes incluyen polipéptidos que difieren en secuencia de amino ácidos debido a mutagénesis. Las proteínas variantes abarcadas por la presente invención son activas como insecticidas.

También pueden diseñarse proteínas variantes que difieren a nivel de secuencia de amino ácidos primaria y que retienen, igual o similar, la estructura tridimensional esencial general, la distribución de cargas en la superficie, y otras. Véase por ejemplo la patente norteamericana US N° 7.058.515; Larson *et al.* (2002); Cramer *et al.* (1997); Stemmer, W. P. C. (1994a); Stemmer, W. P. C. (1994b), Stemmer, W. P. C. (1995); Cramer *et al.*, (1996a); y Cramer *et al.* (1996b).

Ciertas toxinas de la presente invención han sido específicamente ejemplificadas aquí. Debido a que estas toxinas son solamente ejemplos de las toxinas de la presente invención, debería ser evidente que la presente invención comprende toxinas variantes o equivalentes (y secuencias de nucleótidos que codifican toxinas equivalentes) que tienen una actividad plaguicida igual o similar que la toxina ejemplificada. Toxinas equivalentes tendrán homología de amino ácidos con una toxina ejemplificada. La identidad de amino ácidos será típicamente mayor que 60%, de preferencia mayor que 75%, de mayor preferencia mayor que 80%, de mayor preferencia mayor que 90%, y puede ser mayor que 95%. La homología de amino ácidos será máxima en

regiones críticas de la toxina que dan cuenta de la actividad biológica o están involucradas en la determinación de la configuración tridimensional que finalmente es responsable de la actividad biológica. Con respecto a esto, ciertas sustituciones de amino ácidos son aceptables y pueden esperarse si estas sustituciones están en regiones que no son críticas para la actividad o son sustituciones de amino ácidos conservadoras que no afectan la configuración tridimensional de la molécula. Por ejemplo, los amino ácidos pueden ubicarse en las siguientes clases: no polares, polares no cargados, básicos y ácidos. Las sustituciones conservadoras donde un amino ácido de una clase es reemplazado por otro amino ácido del mismo tipo, caen dentro del alcance de la presente invención, siempre que la sustitución no altere considerablemente la actividad biológica del compuesto. La Tabla 1 proporciona un listado de ejemplos de amino ácidos pertenecientes a cada clase.

Tabla 1

Clases de amino ácidos y ejemplos

Clase de amino ácido	Ejemplos de amino ácidos
Cadenas laterales no polares	Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Met, Phe, Trp
Cadenas laterales polares no cargadas	Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Gln
Cadenas laterales ácidas	Asp, Glu
Cadenas laterales básicas	Lys, Arg, His
Cadenas laterales con ramificaciones beta	Thr, Val, Ile
Cadenas laterales aromáticas	Tyr, Phe, Trp, His

En algunos casos, también pueden efectuarse sustituciones no conservadoras. El factor crítico es que estas sustituciones no deben disminuir significativamente la actividad biológica de la toxina.

Las proteínas toxinas insecticidas preferidas de la presente invención son codificadas por una secuencia de nucleótidos suficientemente idéntica a las secuencias de

nucleótidos de SEQ ID NOs:1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37 ó 39. "Suficientemente idéntica" pretende significar una secuencia de amino ácidos o de nucleótidos que tiene al menos alrededor de 60% o 65% de identidad de secuencia, de preferencia alrededor de 70% o 75% de identidad de secuencia, de mayor preferencia alrededor de 80% u 85% de identidad de secuencia, de máxima preferencia alrededor de 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia en comparación con una secuencia de referencia, según se determina por uno de los programas de alineamiento descritos aquí, empleando parámetros estándar. Un experto en el arte reconocerá que estos valores pueden ajustarse apropiadamente para determinar la identidad correspondiente de proteínas codificadas por dos secuencias de nucleótidos, tomando en cuenta la degeneración de codones, similaridad de amino ácidos, ubicación de los marcos de lectura, y similares.

Para determinar el porcentaje de identidad de dos secuencias de amino ácidos o de dos secuencias de ácidos nucleicos, las secuencias son alineadas para propósitos de una comparación óptima. El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (o sea, porcentaje de identidad = número de posiciones idénticas/número total de posiciones (por ejemplo, posiciones superpuestas) x100). En una modalidad, las dos secuencias tienen la misma longitud. El porcentaje de identidad entre dos secuencias puede determinarse usando técnicas similares a las que se describen más abajo, permitiendo o no permitiendo huecos. Para calcular el porcentaje de identidad, típicamente se cuentan las igualdades exactas.

La determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias puede efectuarse usando un algoritmo matemático. Un ejemplo no limitante de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de dos secuencias es el algoritmo de Karlin y Altschul (1990), modificado como en Karlin y Altschul (1993). Este algoritmo está incorporado en los programas BLASTN y BLASTX de Altschul *et al.* (1990). Búsquedas BLAST pueden usarse convenientemente para identificar secuencias homólogas (similares) a una secuencia problema ("query sequence") en bases de datos de ácidos nucleicos o proteínas. Pueden efectuarse búsquedas de nucleótidos BLAST con el programa BLASTN, puntaje = 100, longitud de palabra

= 12, para identificar secuencias de nucleótidos que tienen homología con las moléculas de ácidos nucleicos reivindicadas de la invención. Pueden efectuarse búsquedas de proteínas BLAST con el programa BLASTX, puntaje = 50, longitud de palabra = 3, para identificar secuencias de amino ácidos que tienen homología con las moléculas de proteínas insecticidas reivindicadas de la invención.

Para obtener alineamientos con huecos para propósitos de comparación, puede utilizarse Gapped BLAST como se describe en Altschul *et al.* (1997). Alternativamente, puede usarse PSI-Blast para efectuar una búsqueda repetida que detecta relaciones distantes entre moléculas, Altschul *et al.* (1997). Cuando se utilizan los programas BLAST, Gapped BLAST y PSI-Blast, pueden usarse los parámetros por defecto de los respectivos programas (por ejemplo BLASTX y BLASTN). Véase www.ncbi.nlm.nih.gov. El alineamiento también puede efectuarse manualmente por inspección.

Un ejemplo no limitante de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de secuencias es el algoritmo ClustalW (Thompson *et al.*, 1994). ClustalW compara secuencias y alinea la totalidad de la secuencia de amino ácidos o ADN, y así puede proporcionar datos acerca de la conservación de secuencia de la secuencia de amino ácidos o secuencia de nucleótidos completa. El algoritmo ClustalW se usa en varios paquetes de software de análisis de ADN/amino ácidos disponibles en el comercio, tal como el módulo ALIGNX del Vector NTI Program Suite (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA). Cuando se alinean secuencias de amino ácidos con ALIGNX, pueden usarse convenientemente los valores fijados por defecto con una penalización por abertura del hueco de 10, una penalización por extensión del hueco de 0,1 y la matriz de comparación blosum63mt2. Después de alinear dos secuencias de proteínas con ALIGNX, puede evaluarse el porcentaje de similitud (consenso) o identidad de amino ácidos entre las dos secuencias. Cuando se alinean dos secuencias de ADN con ALIGNX, pueden usarse convenientemente los valores fijados por defecto con una penalización por abertura del hueco de 15, una penalización por extensión del hueco de 6,6 y la matriz de comparación swgapdnamt. Después de alinear dos secuencias de ADN con ALIGNX, puede determinarse el porcentaje de identidad entre las dos secuencias.

Un segundo ejemplo no limitante de un programa de software útil para el análisis de alineamientos ClustalW es GeneDoc® (desarrollado por Karl Nicholas, <http://iubio.bio.indiana.edu/soft/molbio/ibmpc/genedoc-readme.html>). GeneDoc® permite evaluar la similaridad e identidad de amino ácidos (o ADN) entre múltiples proteínas.

Otro ejemplo no limitante de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de secuencias es el algoritmo de Myers y Miller (1988). Este algoritmo está incorporado en el programa wSTRETCHER, que es parte del paquete de software de alineamiento de secuencias wEMBOSS (disponible en <http://emboss.sourceforge.net/>). STRETCHER calcula un alineamiento global óptimo de dos secuencias, usando una modificación del algoritmo clásico de programación dinámica que usa espacio lineal. El resultado es un archivo de alineamiento estándar. La matriz de sustitución, la penalización por inserción de hueco y las penalizaciones por extensión del hueco usadas para calcular el alineamiento pueden ser especificadas. Cuando se utiliza el programa STRETCHER para comparar secuencias de nucleótidos, puede usarse una penalización por abertura del hueco de 16 y una penalización por extensión del hueco de 4. El archivo de matriz de puntajes para comparar secuencias de ADN es EDNAFULL. Cuando se usa para comparar secuencias de amino ácidos, puede usarse una penalización por abertura del hueco de 12 y una penalización por extensión del hueco de 2. El archivo de matriz de puntajes para comparar secuencias de proteínas es EBLOSUM62.

Otro ejemplo no limitante de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de secuencias es el algoritmo de Needleman y Wunsch (1970), que está incorporado en los paquetes de software de alineamiento de secuencias GAP Versión 10 y wNEEDLE (<http://emboss.sourceforge.net/>). GAP versión 10 puede usarse para determinar identidad o similaridad de secuencias usando los siguientes parámetros: para una secuencia de nucleótidos, el porcentaje de identidad y el porcentaje de similaridad se encuentran usando un peso del hueco de 50 y un peso de longitud ("lengthweight") de 3, y la matriz de puntajes nwsgapdna.cmp. Para la comparación de secuencias de amino ácidos, el porcentaje de identidad o el porcentaje de similaridad se determinan usando un peso del hueco de 8 y un peso de longitud ("lengthweight")

de 2, y el programa de puntajes BLOSUM62. wNEEDLE lee dos secuencias de entrada, encuentra el alineamiento óptimo (incluyendo huecos) a lo largo de toda su longitud, y escribe su alineamiento de secuencias global óptimo en un archivo. El algoritmo usa un método de programación dinámica para asegurar que el alineamiento sea óptimo, explorando todos los alineamientos posibles y eligiendo el mejor. Se lee una matriz de puntajes que contiene valores para todas las posibles igualdades de residuos o nucleótidos. wNEEDLE encuentra el alineamiento con el máximo puntaje posible, donde el puntaje de un alineamiento es igual a la suma de las igualdades tomadas de la matriz de puntajes, menos las penalizaciones que surgen de la abertura y extensión de los huecos en las secuencias alineadas. La matriz de sustitución y las penalizaciones por abertura y extensión de los huecos son especificadas por el usuario. Cuando se comparan secuencias de amino ácidos, se usa una penalización por abertura del hueco por defecto de 10, una penalización por extensión del hueco de 0,5, y la matriz de comparación EBLOSUM62. Cuando se comparan secuencias de ADN usando wNEEDLE, se usa una penalización por abertura del hueco de 10, una penalización por extensión del hueco de 0,5, y la matriz de comparación EDNAFULL.

También pueden usarse programas equivalentes. El término "programa equivalente" significa cualquier programa de comparación de secuencias que, para cualesquier dos secuencias en cuestión, genera un alineamiento que tiene igualdades idénticas de residuos de nucleótidos y un porcentaje de identidad de secuencia idéntico cuando se compara con el alineamiento correspondiente generado por ALIGNX, wNEEDLE o wSTRETCHER. El porcentaje de identidad es el porcentaje de igualdades idénticas entre las dos secuencias por toda la región alineada informada (incluyendo cualesquier huecos en la longitud), y el porcentaje de similaridad es el porcentaje de igualdades entre las dos secuencias por toda la región alineada informada (incluyendo cualesquier huecos en la longitud).

Fragmentos y equivalentes de las toxinas. Fragmentos y equivalentes que retienen la actividad plaguicida de las toxinas ejemplificadas estarán dentro del alcance de la presente invención. También, debido a la redundancia del código genético, una variedad de diferentes secuencias de ADN pueden codificar las secuencias de amino ácidos divulgadas aquí. Está

dentro de la capacidad de una persona entrenada en el arte, crear estas secuencias de ADN alternativas que codifican las mismas, o esencialmente las mismas, toxinas. Estas secuencias de ADN variantes están dentro del alcance de la presente invención. Como se usa aquí, la referencia a "esencialmente las mismas" secuencias se refiere a secuencias que tienen sustituciones, deleciones, adiciones o inserciones de amino ácidos que no afectan sustancialmente la actividad plaguicida. Fragmentos que retienen la actividad plaguicida también están incluidos en esta definición.

Pueden hacerse alteraciones en el terminal amino o carboxi de las proteínas insecticidas y variantes de la invención, que dan como resultado polipéptidos que retienen la actividad biológica. Fragmentos o porciones biológicamente activas incluyen fragmentos de polipéptidos que comprenden secuencias de amino ácidos suficientemente idénticas a la secuencia de amino ácidos presentada en SEQ ID NOs:2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38 y 40. Una porción biológicamente activa de una proteína endotoxina delta puede ser un polipéptido que tiene, por ejemplo, 10, 25, 50, 100 o más amino ácidos de longitud. Estas porciones biológicamente activas pueden prepararse por técnicas de ingeniería genética de proteínas recombinantes bien conocidas en el arte, y pueden ser evaluadas en cuanto a su actividad insecticida. Los métodos para medir la actividad plaguicida son bien conocidos en el arte. Como se usa aquí, un fragmento abarca al menos 8 amino ácidos contiguos de SEQ ID NOs:2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38 y 40. La invención abarca otros fragmentos, sin embargo, tal como cualquier fragmento en la proteína de más de alrededor de 10, 20, 30, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1.000, 1.050, 1.100, 1.150 ó 1.200 amino ácidos, hasta la longitud completa de las proteínas insecticidas o proteínas variantes de SEQ ID NOs:2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38 y 40.

Fragmentos con actividad biológica o espectro de plagas mejorados, o la capacidad para controlar poblaciones de insectos resistentes, también se proporcionan en la presente invención. Pueden hacerse modificaciones a las proteínas Cry para producir fragmentos con formación de poros, y por lo tanto actividad plaguicida, mejoradas. En el caso de proteínas

Cry de tres dominios, el dominio 1 está constituido por siete hélices α involucradas en la formación de poros en el intestino medio de insectos susceptibles. Pueden diseñarse proteínas DIG modificadas con actividad mejorada que tengan deleciones N-terminales en regiones con homología de estructura secundaria putativa con la hélice α 1 y la hélice α 2 del dominio 1.

Pueden usarse proteasas para obtener directamente fragmentos activos de estas toxinas. Un fragmento de una toxina insecticida reivindicada comprenderá al menos alrededor de 15, 25, 30, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 800, 900, 1.000, 1.100 ó 1.200 amino ácidos contiguos, o hasta el número total de amino ácidos presentes en una toxina insecticida de longitud completa de la invención (por ejemplo, 625 amino ácidos para SEQ ID NO:2, o 625 amino ácidos para SEQ ID NO:4).

Toxina núcleo y quimeras de protoxina. Una mayoría de las moléculas de proteínas cristalinas endotoxinas delta de *Bacillus thuringiensis* están compuestas de dos segmentos funcionales. La toxina núcleo resistente a proteasas es el primer segmento y corresponde aproximadamente a la primera mitad de la molécula de proteína. Aproximadamente la mitad C terminal de la molécula es el segundo segmento. Para los propósitos de esta solicitud, este segundo segmento será denominado aquí "segmento de protoxina". Se cree que el segmento de protoxina participa en la formación de los cristales de toxina (Arvidson *et al.* (1989)). La molécula de toxina completa de 130 kDa es procesada rápidamente al segmento de núcleo resistente por una proteasa en el intestino del insecto. Así, el segmento de protoxina puede transmitir una especificidad de insecto parcial a la toxina porque limita la accesibilidad del núcleo al insecto por reducción del procesamiento por proteasas de la molécula de toxina (Haider *et al.* (1986)) o por reducción de la solubilidad de la toxina (Aronson *et al.* (1991)).

Se ha informado de proteínas quiméricas unidas ventajosamente dentro de los dominios de toxina de Cry1Fa y Cry1Ab (patente norteamericana US N° 5.527.883). Otro éxito en el área ha sido informado en la literatura. Por ejemplo, la construcción de endotoxinas delta híbridas se informa en el siguiente documento del arte relacionado. La publicación de la solicitud de patente internacional N° WO 95/30753 divulga la construcción de endotoxinas delta de *B. thuringiensis* híbridas para producción en *Pseudomonas fluorescens*, en las cuales el fragmento

de protoxina no tóxica de Cry1F ha sido reemplazado por el fragmento de protoxina no tóxica de la Cry1Ac/Cry1Ab que se divulga en la patente norteamericana US N° 5.128.130. Esa patente también divulga la construcción de endotoxinas delta de *B. thuringiensis* híbridas para producción en *P. fluorescens* en las cuales una porción del segmento de protoxina no tóxica de Cry1Ac está reemplazado con el fragmento de protoxina no tóxica correspondiente de Cry1Ab. La patente norteamericana US N° 5.055.294 divulga la construcción de una endotoxina delta híbrida específica entre Cry1Ac (residuos de amino ácidos 1-466) y Cry1Ab (residuos de amino ácidos 466-1155) para producción en *P. fluorescens*. A pesar de que la patente antes mencionada divulga la construcción de una toxina híbrida dentro del segmento de toxina activo, no se presentan detalles específicos con respecto a la actividad insecticida de la toxina híbrida. La publicación de la solicitud de patente internacional N° WO 95/30752 divulga la construcción de endotoxinas delta de *B. thuringiensis* híbridas para producción en *P. fluorescens* en las cuales el segmento de protoxina no tóxica de Cry1C está reemplazado por el segmento de protoxina no tóxica de Cry1Ab. La solicitud mencionada más arriba divulga además que la actividad contra *Spodoptera exigua* de la endotoxina delta híbrida es mejorada con respecto a la de la toxina activa madre, Cry1C. La publicación de la solicitud de patente internacional N° WO 95/06730 divulga la construcción de una endotoxina delta de *B. thuringiensis* híbrida constituida por los dominios 1 y 2 de Cry1E acoplados al dominio 3 y el segmento de protoxina no tóxica de Cry1C. Bioensayos en insectos efectuados contra *Manduca sexta* (sensible a Cry1C y Cry1E), *Spodoptera exigua* (sensible a Cry1C) y *Mamestra brassicae* (sensible a Cry1C) indican que la toxina híbrida Cry1E/Cry1C es activa contra *M. sexta*, *S. exigua* y *M. brassicae*. Los resultados del bioensayo fueron expresados como valores de EC₅₀ (concentración de toxina que da un 50% de reducción del crecimiento) en lugar de valores de LC₅₀ (concentración de toxina que da un 50% de mortalidad). A pesar de que las endotoxinas delta usadas para el bioensayo fueron producidas en *B. thuringiensis*, sólo se usaron segmentos activos generados artificialmente de las endotoxinas delta, y no los cristales producidos naturalmente típicamente producidos por *B. thuringiensis* que están presentes en formulaciones de *B. thuringiensis* comerciales. Los resultados del bioensayo indicaron que los valores de LC₅₀ para el cristal de Cry1E/Cry1C híbrida contra *S. frugiperda*

fueron de 1,5 a 1,7 veces más bajos (o sea, eran más activas) que para Cry1C nativa. Este documento también divulga la construcción de una endotoxina delta de *B. thuringiensis* híbrida entre Cry1Ab (dominios 1 y 2) y Cry1C (dominio 3 y el segmento de protoxina no tóxico), a pesar de que no se dan datos con respecto a la actividad o utilidad de la toxina híbrida.

Lee *et al.* (1995) informan de la construcción de endotoxinas delta de *B. thuringiensis* híbridas entre Cry1Ac y Cry1Aa dentro del segmento de toxina activo. Segmentos activos generados artificialmente de las toxinas híbridas fueron usados para examinar las interacciones de proteínas en vesículas de las microvellosidades epiteliales del intestino ("brush border membrane vesicles") (BBMV) de insectos susceptibles. No se informó de la bioactividad de las toxinas híbridas. Honee *et al.* (1991) informan de la construcción de endotoxinas delta híbridas entre Cry1C (dominio 1) y Cry1Ab (dominios 2 y 3) y el híbrido recíproco entre Cry1Ab (dominio 1) y Cry1C (dominios 2 y 3). Estos híbridos no mostraron ningún aumento significativo en actividad contra insectos susceptibles. Más aún, se encontró que la toxina híbrida Cry1C (dominio 1)/Cry1Ab (dominios 2 y 3) era hipersensible a la degradación por proteasas. Un informe de Schnepf *et al.* (1990) divulga la construcción de una toxina híbrida Cry1Ac en la cual una pequeña porción del dominio 2 fue reemplazada por la región correspondiente de Cry1Aa, a pesar de que no se observó un aumento significativo en la actividad contra larvas de insectos susceptibles.

Las toxinas quiméricas de la presente invención comprenden una porción de toxina núcleo N-terminal completa de una toxina de *B.t.* y, en algún punto más allá del extremo de la porción de toxina, la proteína tiene una transición a una secuencia de protoxina heteróloga. La transición al segmento de protoxina heteróloga puede estar aproximadamente en la unión de toxina nativa/protoxina, o una porción de la protoxina nativa (que se extiende más allá de la porción de toxina) puede ser retenida y la transición a la protoxina heteróloga ocurre aguas abajo. Por ejemplo, una toxina quimérica de la presente invención puede tener la porción de toxina completa de una toxina Cry1Ca modificada, tal como los amino ácidos 1-628 de DIG-473 o DIG-465, y un segmento de protoxina heteróloga (amino ácidos 629 hasta el terminal C). En una modalidad preferida, la porción de segmento de protoxina heteróloga se toma de Cry1Ab.

Una persona experta en el arte podrá apreciar que las toxinas de *B.t.*, incluso dentro de una cierta clase, variarán en alguna medida en longitud y en la ubicación precisa de la transición desde la porción de toxina núcleo a la porción de protoxina. La transición desde la porción de toxina núcleo a la porción de protoxina típicamente se encontrará a entre alrededor del 50% y alrededor del 60% de la toxina de longitud completa. La toxina quimérica de la presente invención incluye toda la extensión de esta porción de toxina núcleo N-terminal, o sea la longitud completa de 628 amino ácidos de la proteína toxina insecticida IRDIG544.12. SEQ ID NO:15 divulga la secuencia de 1.887 nucleótidos del ADN que codifica DIG-465, cuyos 1.887 nucleótidos 5'-terminales comprenden la región codificadora para el segmento de toxina núcleo de Cry1Ca con una mutación L57A (leucina en la posición de amino ácido 57 sustituido por alanina), una modalidad de la presente invención. SEQ ID NO:16 divulga la secuencia de 628 amino ácidos del polipéptido DIG-465 de longitud completa, donde la porción de núcleo N-terminal de Cry1Ca tiene las sustituciones de amino ácidos mencionadas más arriba. SEQ ID NO:23 divulga la secuencia de 1.887 nucleótidos del ADN que codifica DIG-473, que comprende la región codificadora para el segmento de toxina núcleo de Cry1Ca con una mutación F596M (fenilalanina en la posición de amino ácido 596, sustituido por metionina), otra materia de la invención. SEQ ID NO:24 divulga la secuencia de 628 amino ácidos del polipéptido DIG-473 de longitud completa, que comprende la porción de Cry1Ca con las sustituciones de amino ácidos mencionadas más arriba.

Con respecto a la porción de protoxina, la extensión completa de la porción de protoxina de Cry1Ab nativa se extiende desde el extremo de la porción de toxina de la proteína Cry1Ab de longitud completa hasta el terminal C de la molécula. Debe ponerse atención a aproximadamente los últimos 100 a 150 amino ácidos de esta protoxina, que son los más críticos para incluir en la toxina quimérica de la presente invención.

Debido a que las proteínas Cry tienen actividad insecticida selectiva, la mayoría son activas sobre una gama limitada de plagas blanco. Por lo tanto, existe una necesidad de mejorar aún más los atributos de actividad biológica de las proteínas Cry. Proteínas Cry con

características de unión y modos de acción singulares son útiles en estrategias para expandir la gama de plagas de insectos controladas o contrarrestar el desarrollo de resistencia a *B.t.*

Modificaciones en el dominio III. Como se ha descrito aquí, las toxinas insecticidas de *B.t.* de la presente invención son toxinas del tipo de 3 dominios, que comprenden dominio I, dominio II y dominio III. El dominio III se une a ciertas clases de proteínas receptoras y tal vez participa en la inserción de un pre-poro oligomérico de toxina. Se demostró que toxinas híbridas específicas que comprendían sustituciones en el dominio III tenían una toxicidad superior contra *Spodoptera exigua* (de Maagd *et al.*, 1996) y existen pautas para el diseño de los intercambios de dominios en las toxinas Cry (Knight *et al.*, 2004).

Modificaciones en el dominio 1. Numerosos estudios usando métodos bioquímicos y moleculares han proporcionado información sobre los determinantes de la unión de las proteínas Cry y su inserción en las membranas del intestino medio de los insectos (revisado en Piggot y Ellar, 2007). El dominio I de las proteínas Cry1A y Cry3A ha sido estudiado en cuanto a la capacidad para insertarse y formar poros en las membranas. Las hélices α 4 y 5 del dominio I tienen roles clave en la inserción y formación de poros en las membranas (Walters *et al.*, 1993; Gazit *et al.*, 1998; Nunez-Valdez *et al.*, 2001), y se propone que las otras hélices contactan a la superficie de las membranas como las varillas de un paraguas (Gazit *et al.*, 1998).

En algunos casos, la hélice alfa 3 parece ser requerida para la formación de pre-poros oligoméricos y la toxicidad. Algunos mutantes de la hélice alfa 3 son capaces de unirse a receptores, pero no forman oligómeros y no son tóxicos para *Manduca sexta* (revisado en Jimenez-Juarez *et al.*, 2008). Sin embargo, formas activadas proteolíticamente de Cry3Aa1 carecen de hélices α 1, 2 y 3 (Carroll *et al.*, 1997).

La hélice α 1 es removida después de la unión al receptor. Gomez *et al.* (2002) encontraron que oligómeros de Cry1Ab formados después de la unión a receptores de BBMV carecían de la porción de hélice α 1 del dominio I. También, Soberon *et al.* (2007) han demostrado que mutantes por delección N-terminal de Cry1Ab y Cry1Ac, que carecen de aproximadamente 60 amino ácidos que comprenden la hélice α 1 en la estructura tridimensional de Cry, son capaces de ensamblar monómeros de un peso molecular de alrededor de 60 kDa en

pre-poros en ausencia de unión a cadherina. Se informó que estos mutantes por delección N-terminal eran activos en larvas de insectos resistentes a Cry. Más aún, Diaz-Mendoza *et al.* (2007) describieron fragmentos de Cry1Ab de 43 kDa y 46 kDa que retenían la actividad sobre el barrenador del maíz del Mediterráneo (*Sesamia nonagrioides*). Se demostró que estos fragmentos incluían los residuos de amino ácidos 116 a 423; sin embargo, las secuencias de amino ácidos precisas no fueron dilucidadas y el mecanismo de actividad de estos fragmentos proteolíticos es desconocido. Los resultados de Gomez *et al.* (2002), Soberon *et al.* (2007) y Diaz-Mendoza *et al.* (2007) contrastan con los de Hofte *et al.* (1986), que informaron que la delección de 36 amino ácidos desde el terminal N de Cry1Ab dio como resultado una pérdida de actividad insecticida.

Anticuerpos antitoxinas. Toxinas equivalentes y/o genes que codifican estas toxinas equivalentes pueden ser derivados de aislados de *Bacillus thuringiensis* y/o bibliotecas de ADN usando las enseñanzas proporcionadas aquí. Existe un número de métodos para obtener las toxinas plaguicidas de la presente invención. Por ejemplo, anticuerpos inmunorreactivos a las toxinas plaguicidas divulgadas y reivindicadas aquí pueden usarse para identificar y aislar otras toxinas desde una mezcla de proteínas. Específicamente, pueden prepararse anticuerpos contra las porciones de las toxinas que son más constantes y más distintas de otras toxinas de *B.t.* Después, estos anticuerpos pueden usarse para identificar específicamente toxinas equivalentes con la actividad característica, por ejemplo, mediante inmunoprecipitación, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) o inmunotransferencia ("Western blotting"). Anticuerpos contra las toxinas divulgadas aquí, o contra toxinas equivalentes, o fragmentos de estas toxinas, pueden prepararse fácilmente usando procedimientos estándar en este arte. Después, los genes que codifican estas toxinas pueden obtenerse de los microorganismos que producen las toxinas.

Una vez que la toxina insecticida de *B.t.* ha sido aislada, pueden fabricarse anticuerpos específicos para la toxina por métodos convencionales que son bien conocidos en el arte. Inyecciones repetidas en un huésped de elección durante un período de semanas o meses, producirán una respuesta inmune y darán como resultado títulos séricos significativos de anti-

toxina de *B.t.* Los huéspedes preferidos son especies de mamíferos y las especies más altamente preferidas son conejos, cabras, ovejas y ratones. La sangre extraída de estos animales inmunizados puede ser procesada por métodos establecidos para obtener un antisuero (anticuerpos policlonales) reactivo con la toxina insecticida de *B.t.* Enseguida, el antisuero puede ser purificado por afinidad mediante adsorción en la toxina de acuerdo con técnicas conocidas en el arte. El antisuero purificado por afinidad puede ser purificado adicionalmente aislando la fracción de inmunoglobulina en el antisuero, usando procedimientos conocidos en el arte. El material resultante será una población heterogénea de inmunoglobulinas reactivas con la toxina insecticida de *B.t.*

También pueden generarse anticuerpos anti-toxinas de *B.t.* preparando un inmunógeno semisintético consistente en un fragmento de péptido sintético de la toxina insecticida de *B.t.* conjugado con un portador inmunogénico. Numerosos esquemas e instrumentos útiles para fabricar fragmentos de péptidos son bien conocidos en el arte. Muchos portadores inmunogénicos adecuados tales como albúmina de suero de bovino (BSA) o hemocianina de lapa californiana también son bien conocidos en el arte, lo mismo que las técnicas para acoplar el inmunógeno con las proteínas portadoras. Una vez que el inmunógeno semisintético ha sido construido, el procedimiento para fabricar anticuerpos específicos para el fragmento de toxina insecticida de *B.t.* es idéntico a los usados para fabricar anticuerpos reactivos con la toxina de *B.t.* natural.

Anticuerpos monoclonales (MAbs) anti-toxinas de *B.t.* se preparan fácilmente usando toxina insecticida de *B.t.* purificada. Los métodos para producir MAbs han sido practicados por más de 15 años y son bien conocidos para los técnicos de nivel medio en el arte. Inyecciones intraperitoneales o subcutáneas repetidas de toxina insecticida de *B.t.* purificada en un adyuvante, producirán una respuesta inmune en la mayoría de los animales. Linfocitos B hiperinmunizados son removidos del animal y fusionados con una línea celular compañera de fusión adecuada, capaz de ser cultivada indefinidamente. Los animales preferidos cuyos linfocitos B pueden ser hiperinmunizados y usados en la producción de MAbs son los mamíferos. Los animales más preferidos son ratas y ratones, y la cepa de ratones BALB/c es la más preferida.

Numerosas líneas celulares de mamíferos son compañeras de fusión adecuadas para la producción de hibridomas. Muchas de estas líneas están disponibles de American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA) y proveedores comerciales. Las líneas celulares compañeras de fusión preferidas son derivadas de mielomas de ratón, y la línea celular de mieloma HL-1® Friendly 653 (Ventrex, Portland, ME) es la más preferida. Una vez fusionados, los hibridomas resultantes se cultivan en un medio de cultivo selectivo durante una a dos semanas. Hay disponibles dos sistemas de selección bien conocidos para eliminar las células de mieloma no fusionadas, o las fusiones entre células de mieloma, desde el cultivo mixto de hibridomas. La elección del sistema de selección depende de la cepa de ratón inmunizada y de la compañera de fusión de mieloma usada. Puede usarse el sistema de selección AAT, descrito por Taggart y Samloff (1983); sin embargo, el sistema de selección HAT (hipoxantina, aminopterina, timidina) descrito por Littlefield (1964) es preferido, debido a su compatibilidad con la cepa de ratón y la compañera de fusión preferidas mencionadas más arriba. Después, el medio de cultivo agotado es sondeado para determinar la secreción de MAbs inmunoespecíficos. Los procedimientos del ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) son los más adecuados para este propósito; no obstante, los radioinmunoensayos adaptados para sondeo en grandes volúmenes también son aceptables. Pueden efectuarse múltiples sondeos diseñados para disminuir consecutivamente el número considerable de cultivos irrelevantes o menos deseados. Los cultivos que secretan MAbs reactivos con la toxina insecticida de *B.t.* pueden ser sondeados para determinar reactividad cruzada con toxinas insecticidas de *B.t.* conocidas. Los MAbs que se unen preferencialmente a la toxina insecticida de *B.t.* preferida pueden someterse a determinación del isotipo usando ensayos disponibles en el comercio. Los MAbs preferidos son de la clase IgG, y los MAbs más preferidos son de los subisotipos IgG1 e IgG2a.

Los cultivos de hibridomas que secretan los MAbs preferidos pueden ser subclonados varias veces para establecer monoclonalidad y estabilidad. Métodos bien conocidos para subclonar cultivos de células eucarióticas no adherentes incluyen técnicas de clasificación de células por dilución limitante, en agarosa blanda y activadas por fluorescencia. Después de cada subclonación, los cultivos resultantes preferentemente son analizados nuevamente en cuanto a

secreción de anticuerpos e isotipo, para asegurar que se haya establecido un cultivo estable que secreta los MABs preferidos.

Los anticuerpos anti-toxinas de *B.t.* son útiles en diversos métodos para detectar la toxina insecticida de *B.t.* reivindicada de la presente invención, y variantes o fragmentos de la misma. Es bien sabido que anticuerpos marcados con un grupo reportero pueden usarse para identificar la presencia de antígenos en una variedad de medios. Anticuerpos marcados con radioisótopos han sido usados por décadas en radioinmunoensayos para identificar, con gran precisión y sensibilidad, la presencia de antígenos en una variedad de fluidos biológicos. Más recientemente, anticuerpos marcados con enzimas han sido usados como sustituto de los anticuerpos radiomarcados en el ensayo ELISA. Además, anticuerpos inmunorreactivos a la toxina insecticida de *B.t.* de la presente invención pueden ser unidos a una sustancia inmovilizante, tal como una partícula o un pocillo de poliestireno, y usados en inmunoensayos para determinar si la toxina de *B.t.* está presente en una muestra de prueba.

En una modalidad preferida, una proteína insecticida o una variante se entrega por vía oral mediante una planta transgénica que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que expresa una toxina de la presente invención. La presente invención proporciona un método para producir una planta transgénica resistente a insectos, que comprende introducir una molécula de ácido nucleico de la invención en la planta, donde la toxina es expresable en la planta transgénica en una cantidad eficaz para controlar a un insecto. En un ejemplo no limitante, una estrategia de clonación básica puede ser subclonar secuencias de codificación (CDS) de Cry de longitud completa o modificadas en un plásmido de expresión en plantas en los sitios de restricción NcoI y SacI. Los casetes de expresión en plantas resultantes, que contienen la región codificadora de Cry apropiada bajo el control de elementos de expresión en plantas (por ejemplo, promotores expresables en plantas, determinantes de adición de poliadenilato y de terminación de la transcripción en el terminal 3', y similares), son subclonados en un plásmido vector binario, utilizando por ejemplo tecnología Gateway® o procedimientos estándar de clonación de fragmentos con enzimas de restricción. Por ejemplo, LR Clonase® (Invitrogen) puede usarse para recombinar los casetes de expresión en plantas de genes de longitud completa y modificados

en un plásmido de transformación de plantas binario, si se utiliza la tecnología Gateway®. Es conveniente emplear un vector de transformación de plantas binario que alberga un gen bacteriano que confiere resistencia al antibiótico espectinomicina, cuando el plásmido está presente en células de *E. coli* y *Agrobacterium*. También es conveniente emplear un plásmido vector binario que contiene un gen marcador seleccionable expresable en plantas que es funcional en las plantas huéspedes deseadas. Los ejemplos de genes marcadores seleccionables expresables en plantas incluyen pero no están limitados al gen de aminoglicósido fosfotransferasa del transposón Tn5 (Aph II) que codifica resistencia a los antibióticos kanamicina, neomicina y G418, y también aquellos genes que codifican tolerancia a los herbicidas glifosato; higromicina; metotrexato; fosfínotricina (bialafos), imidazolinonas, sulfonilureas y triazolopirimidinas, tales como clorosulfurona, bromoxinil, dalapón y similares.

Alternativamente, la estructura del plásmido del vector de transformación de plantas binario que contiene el inserto del gen DIG-465, DIG-473, DIG-468, DIG-483, DIG-462, DIG-463, DIG-464, DIG-466, DIG-467, DIG-469, DIG-474, DIG-482, DIG-485, DIG-487, IRDIG544.8, IRDIG544.9, IRDIG544.11 ó IRDIG544.12 se determina por mapeo de huella dactilar del digerido de restricción del ADN plasmidial preparado a partir de aislados de *Agrobacterium* candidatos, por métodos estándar de biología molecular bien conocidos para los expertos en el arte de la manipulación de *Agrobacterium*.

Los expertos en el arte de obtener plantas transformadas por métodos de transformación mediados por *Agrobacterium* entenderán que pueden usarse otras cepas de *Agrobacterium* además de Z707S, y la elección de la cepa puede depender de la identidad de la especie de planta huésped que será transformada.

A continuación hay ejemplos que ilustran procedimientos para practicar la invención. Estos ejemplos no deben considerarse como limitantes. Todos los porcentajes son en peso y todas las proporciones de las mezclas de solventes son en volumen, a menos que se indique otra cosa. Todas las patentes, solicitudes de patentes, solicitudes provisionales y publicaciones mencionadas o citadas aquí se incorporan por referencia en su totalidad, en la medida que no sean inconsistentes con las enseñanzas explícitas de esta memoria. A menos que

esté específicamente indicado o implicado, los términos "un", "una", "el" y "la" significan "al menos uno", como se usa aquí.

EJEMPLO 1

Diseño de una versión optimizada para plantas de la secuencia de codificación para proteínas insecticidas de *B.t.*

Una secuencia de ADN con preferencia codónica para plantas fue diseñada y sintetizada para producir las proteínas insecticidas en plantas transgénicas monocotiledóneas y dicotiledóneas. Una tabla de uso de codones para maíz (*Zea mays* L.) fue calculada a partir de 706 secuencias de codificación (CDS) de proteínas obtenidas de secuencias depositadas en GenBank. Tablas de uso de codones para tabaco (*Nicotiana tabacum*, 1.268 CDS), canola (*Brassica napus*, 530 CDS), algodón (*Gossypium hirsutum*, 197 CDS) y soya (*Glycine max*; aproximadamente 1.000 CDS) fueron descargadas de datos en el sitio web <http://www.kazusa.or.jp/codon/>. Un conjunto de codones preferidos que comprende codones muy usados comunes a conjuntos de datos de maíz y de dicotiledóneas, en cantidades relativas promedio ponderadas apropiadas, fue calculado después de omitir cualquier codón redundante usado menos de alrededor del 10% de los usos totales de codones para ese amino ácido en ambos tipos de plantas. Para derivar una secuencia optimizada para plantas que codifica la proteína insecticida, se efectuaron sustituciones de codones en las secuencias de ADN de la proteína insecticida, de tal manera que la secuencia de ADN resultante tenía la composición de codones general de la tabla de preferencia codónica optimizada para plantas. Se efectuaron refinamientos adicionales a la secuencia para eliminar sitios de reconocimiento para enzimas de restricción no deseados, sitios de empalme de intrones de plantas potenciales, largas corridas de residuos A/T o C/G, y otros motivos que pudieran interferir con la estabilidad del ARN, la transcripción, o la traducción de la región codificadora en células de plantas. Se efectuaron otros cambios para introducir sitios de reconocimiento para enzimas de restricción deseados, y para eliminar marcos

de lectura abiertos internos largos (marcos distintos de +1). Todos estos cambios se hicieron dentro de las restricciones de retener la composición de codones preferida para plantas. Para completar el diseño, una secuencia que codificaba codones de Detención ("Stop") de la traducción en los 6 marcos de lectura abiertos fue añadida al extremo 3' de las regiones codificadoras, y sitios de reconocimiento para enzimas de restricción apropiados fueron añadidos a los extremos 5' y 3' de las secuencias. La síntesis de la secuencia diseñada fue efectuada por un proveedor comercial (DNA2.0, Menlo Park, CA). Pautas adicionales con respecto a la producción de genes sintéticos pueden encontrarse, por ejemplo, en la patente WO 97/13402 y la patente norteamericana US N° 5.380.831.

Secuencias de ADN optimizadas para plantas que codifican proteínas DIG de la presente invención (SEQ ID NOs:2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38 y 40) se divulgan como SEQ ID NOs:1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37 y 39. Moléculas de ADN que comprenden secuencias divulgadas en SEQ ID NOs: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37 y 39 fueron ensambladas sintéticamente por una entidad comercial (DNA2.0).

EJEMPLO 2

Construcción de plásmidos de expresión que codifican toxinas insecticidas y expresión en huéspedes bacterianos

Métodos de clonación estándar fueron usados en la construcción de plásmidos de expresión de *Pseudomonas fluorescens* (*Pf*), modificados por ingeniería genética para producir las proteínas DIG-465 (SEQ ID NO:16), DIG-473 (SEQ ID NO:24), DIG-468 (SEQ ID NO:2), DIG-483 (SEQ ID NO:4), DIG-462 (SEQ ID NO:10), DIG-463 (SEQ ID NO:12), DIG-464 (SEQ ID NO:14), DIG-466 (SEQ ID NO:18), DIG-467 (SEQ ID NO:20), DIG-469 (SEQ ID NO:22), DIG-474 (SEQ ID NO:26), DIG-482 (SEQ ID NO:28), DIG-485 (SEQ ID NO:6) y DIG-487 (SEQ ID NO:8) codificadas por regiones codificadoras optimizadas para plantas. Las endonucleasas de restricción fueron obtenidas de New England BioLabs (NEB; Ipswich, MA) y ADN ligasa T4 (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) fue usada para la ligazón del ADN.

La estrategia básica de clonación implicaba subclonar la secuencia de codificación (CDS) de la toxina DIG-465, DIG-473, DIG-468, DIG-483, DIG-462, DIG-463, DIG-464, DIG-466, DIG-467, DIG-469, DIG-474, DIG-482, DIG-485 o DIG-487 dentro de pDOW1169 en sitios de restricción tales como SpeI y XhoI, donde fue colocada bajo el control de expresión del promotor *Ptac* y el terminador *rrnBT1T2* del plásmido pKK223-3 (PL Pharmacia, Milwaukee, WI). pDOW1169 es un plásmido con bajo número de copias con el origen de replicación RSF1010, un gen *pyrF* y un sitio de unión al ribosoma precediendo a los sitios de reconocimiento para enzimas de restricción donde pueden introducirse fragmentos de ADN que contienen regiones codificadoras de proteínas (solicitud de patente norteamericana US N° 2008/0193974). El plásmido de expresión fue transformado por electroporación dentro de DC454 (una cepa de *P. fluorescens* casi de tipo silvestre que tiene las mutaciones $\Delta pyrF$ y *lsc::lacIQI*) o sus derivados, recuperado en medio SOC con hidrolizado de soya, y sembrado en placas en medio selectivo (agar con glucosa M9 que carece de uracilo, Sambrook *et al.*, *supra*). Detalles de las manipulaciones microbiológicas están disponibles en Squires, C.H. *et al.* (2004), la solicitud de patente norteamericana US 2006/0008877, la solicitud de patente norteamericana US 2008/0193974 y la solicitud de patente norteamericana US 2008/0058262, incorporadas aquí por referencia. Las cepas fueron validadas por digestión con enzimas de restricción del ADN plasmidial "miniprep".

Cultivo y análisis de expresión en matraces agitados. La producción de toxina DIG-465, DIG-473, DIG-468, DIG-483, DIG-462, DIG-463, DIG-464, DIG-466, DIG-467, DIG-469, DIG-474, DIG-482, DIG-485 o DIG-487 para caracterización y bioensayos en insectos se efectuó mediante cepas de *P. fluorescens* cultivadas en matraces agitados, que albergaban construcciones de expresión. Cultivos de semillas en medio M9 suplementado con 1% de glucosa y elementos traza fueron usados para inocular 50 ml de medio mínimo definido con 5% de glicerol (Teknova Cat. # 3D7426, Hollister, CA). La expresión del gen de la proteína toxina insecticida mediante el promotor *Ptac* fue inducida por la adición de isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) después de una incubación inicial de 24 horas a 30°C con agitación. Los cultivos fueron muestreados al momento de la inducción y a diversos tiempos post-

inducción. La densidad celular fue medida por la densidad óptica a 600 nm (DO₆₀₀). También pueden utilizarse otros medios de cultivo adecuados para el crecimiento de *Pseudomonas fluorescens*, por ejemplo como se describe en Huang *et al.*, 2007 y la solicitud de patente norteamericana US 2006/0008877.

Análisis de fraccionamiento de células y SDS-PAGE de muestras en matraces agitados. A cada tiempo de muestreo, alícuotas de 0,5 ml fueron centrifugadas a 14.000 x g por cinco minutos. Los pélets de células fueron congelados a -80°C. Fracciones solubles e insolubles de muestras de pélets de células de matraces agitados congelados, fueron generadas usando la mezcla maestra BugBuster Master Mix (EMDMillipore® Darmstadt, Alemania). Cada pélet fue resuspendido en 0,5 ml de solución de BugBuster Master Mix® e incubado con agitación a temperatura ambiente por 30 minutos. Las muestras fueron lisadas usando una batidora de perlas con perlas de vidrio de 0,1 mm por 3 minutos. El lisado fue centrifugado a 14.000 rpm por 5 minutos y el sobrenadante fue recuperado como la fracción soluble. Enseguida, el pélet (fracción insoluble) fue resuspendido en un volumen igual de tampón de extracción (8 M de urea, 0,5 M de NaCl, 25 mM de NaPO₄, pH 10,4).

Las muestras fueron mezcladas 1:1 con tampón de muestras NuPAGE 2x Tris Glicina SDS (Invitrogen, Carlsbad, CA) que contenía ditioneitol (DTT) y hervidas por 5 minutos antes de cargarlas en gel de poliacrilamida Novex 4-20% Tris-Glicina SDS (Invitrogen, Carlsbad, CA). La electroforesis se efectuó en el tampón de Tris-Glicina recomendado. Los geles fueron teñidos con tinción Bio-Safe Coomassie de acuerdo con el protocolo del fabricante (Bio-Rad Inc., Hercules, CA) y se obtuvieron imágenes usando el sistema de generación de imágenes serie GE Typhoon (Pittsburgh, PA).

Preparación de cuerpos de inclusión. Preparaciones de cuerpos de inclusión (CI) de proteínas Cry se efectuaron en células provenientes de fermentaciones de *P. fluorescens* que producían proteína insecticida de *B.t.* insoluble, como se demostró por SDS-PAGE y MALDI-MS (espectrometría de masas por desorción/ionización láser asistida por matriz). Pélets de fermentación de *P. fluorescens* fueron descongelados en un baño de agua a 37°C. Las células fueron resuspendidas a 25% p/v en tampón de lisis (Tris 50 mM, pH 7,5, 200 mM de NaCl, 20

mM de sal disódica de EDTA (ácido etilendiaminotetraacético), 1% de Triton X-100 y 5 mM de ditioneitol (DTT); 5 ml/l de cóctel inhibidor de proteasas bacterianas (P8465 Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) fueron añadidos justo antes del uso. Las células fueron suspendidas usando un homogenizador portátil ajustado al nivel mínimo (Tissue Tearor, BioSpec Products, Inc Bartlesville, OK). Lisozima (25 mg de L7651 de Sigma-Aldrich, proveniente de clara de huevo de gallina) fue añadida a la suspensión de células mezclando con una espátula metálica, y la suspensión fue incubada a temperatura ambiente por una hora. La suspensión fue enfriada en hielo por 15 minutos, después sonicada usando un sonicador Branson 250 (dos sesiones de 1 minuto, con un ciclo de trabajo de 50%, y control de salida de 30%). La lisis celular fue controlada por microscopía. En caso necesario, se añadieron 25 mg adicionales de lisozima y se repitió la incubación y sonicación. Cuando la lisis celular fue confirmada por microscopía, el lisado fue centrifugado a 11.500 x g por 25 minutos (a 4°C) para formar el pélet de CI, y el sobrenadante fue desechado. El pélet de CI fue suspendido con 100 ml de tampón de lisis, homogenizado con la mezcladora portátil y centrifugado como se señaló más arriba. El pélet de CI fue lavado repetidas veces por suspensión (en 50 ml de tampón de lisis), homogenización, sonicación y centrifugación, hasta que el sobrenadante quedó incoloro y el pélet de CI quedó firme y de color blanquecino. Para el lavado final, el pélet de CI fue suspendido en agua destilada filtrada en forma estéril (0,22 µm) que contenía 2 mM de EDTA, y centrifugado. El pélet final fue suspendido en agua destilada filtrada en forma estéril que contenía 2 mM de EDTA, y almacenado en alícuotas de 1 ml a -80°C.

El análisis por SDS-PAGE y la cuantificación de la proteína en preparaciones de CI se efectuó descongelando una alícuota de 1 ml de pélet de CI y diluyendo 1:20 con agua destilada filtrada en forma estéril. Después, la muestra diluida fue hervida con tampón de muestra reductor 4x [Tris 250 mM, pH 6,8, 40% de glicerol (v/v), 0,4% de azul bromofenol (p/v), 8% de SDS (p/v) y 8% de β-mercaptoetanol (v/v)] y cargada en un gel para 12+2 pocillos Novex® 4-20% Tris-Glicina (Invitrogen) corrido con tampón Tris/Glicina/SDS 1x (BioRad). El gel fue corrido por 60 min a 200 volts y después teñido con azul Coomassie (50% de G-250/50% de R-250 en 45% de metanol, 10% de ácido acético), y decolorado con 7% de ácido acético, 5%

de metanol en agua destilada. La cuantificación de las bandas blanco se efectuó comparando los valores densitométricos para las bandas contra muestras de albúmina de suero de bovino (BSA) corridas en el mismo gel para generar una curva estándar.

Solubilización de cuerpos de inclusión. Seis ml de la suspensión de cuerpos de inclusión provenientes del clon *Pf* que contenía proteína DIG-465, DIG-473, DIG-468, DIG-483, DIG-462, DIG-463, DIG-464, DIG-466, DIG-467, DIG-469, DIG-474, DIG-482, DIG-485 o DIG-487 fueron centrifugados en una microcentrífuga Eppendorf modelo 5415C ajustada al nivel máximo (aproximadamente 14.000 x g) para peletizar las inclusiones. El sobrenadante de tampón de almacenamiento fue removido y reemplazado con 25 ml de tampón de carbonato de sodio 100 mM, pH 11, en un tubo cónico de 50 ml. Las inclusiones fueron resuspendidas usando una pipeta y sometidas a vórtice para mezclar acabadamente. El tubo fue colocado en una plataforma con balanceo suave a 4°C durante la noche para extraer la proteína blanco. El extracto fue centrifugado a 30.000 x g por 30 min a 4°C, y el sobrenadante resultante fue concentrado 5 veces usando un dispositivo de filtro centrífugo de celulosa regenerada Amicon Ultra-15 (corte a peso molecular 30.000; Millipore). Después, el tampón de muestra fue cambiado a CAPS [ácido 3-(ciclohexamino)-1-propanosulfónico] 10 mM, pH 10, usando columnas PD-10 desechables (GE Healthcare, Piscataway, NJ).

Electroforesis en gel. El extracto concentrado se preparó para la electroforesis diluyéndolo 1:50 en tampón de muestra NuPAGE® LDS (Invitrogen) que contenía 5 mM de ditiotretitol como agente reductor, y se calentó a 95°C por 4 minutos. La muestra fue cargada en carriles duplicados de un gel NuPAGE® 4-12%, al lado de cinco estándares de BSA en el rango de 0,2 a 2 µg/carril (para la generación de una curva estándar). Se aplicó voltaje a 200 V usando el tampón de corrida MOPS SDS (Invitrogen) hasta que el colorante trazador llegó al fondo del gel. El gel fue teñido con azul Coomassie G-250 al 0,2% en 45% de metanol, 10% de ácido acético, y fue decolorado, primero brevemente con 45% de metanol, 10% de ácido acético, y después por más tiempo con 7% de ácido acético y 5% de metanol hasta que el fondo se aclaró. Después de la decoloración, el gel fue escaneado con un generador de imágenes BioRad Fluor-S MultiImager. El software Quantity One v.4.5.2 del instrumento fue usado para obtener

volúmenes con el valor de referencia restado de las bandas de proteínas teñidas, y para generar la curva estándar de BSA que fue usada para calcular la concentración de proteína DIG-465, DIG-473, DIG-468, DIG-483, DIG-462, DIG-463, DIG-464, DIG-466, DIG-467, DIG-469, DIG-474, DIG-482, DIG-485 o DIG-487 en la solución stock.

El nivel de expresión de DIG-465, DIG-473, DIG-468, DIG-483, DIG-463, DIG-464, DIG-466, DIG-467, DIG-469, DIG-474, DIG-482, DIG-485 y DIG-487 fue comparado con el nivel de expresión de Cry1Ca truncada (DIG-462) cuando se expresa en células bacterianas de *Pseudomonas fluorescens*. Cry1Ca truncada (DIG-462) se expresó a aproximadamente 1 g/l, en tanto que DIG-473 se expresó a aproximadamente 0,5 g/l. DIG-465 se expresó aproximadamente 5 veces más que Cry1Ca truncada, a 4,9 g/l. Estos resultados *in vitro* indican que la mutación L57A da como resultado una mayor expresión de la proteína Cry1Ca truncada.

EJEMPLO 3

Actividad insecticida de proteínas DIG producidas en *Pseudomonas fluorescens*

Se demostró que las toxinas insecticidas de *B.t.* DIG-462, DIG-463, DIG-464, DIG-465, DIG-466, DIG-467, DIG-468, DIG-469, DIG-470, DIG-473 y DIG-474 eran activas en especies de lepidópteros incluyendo polilla de la col (DBM; *Plutella xylostella* (Linnaeus)) y gusano cogollero del maíz (FAW, *Spodoptera frugiperda* (Smith)).

Preparación de muestras y bioensayos. Preparaciones de cuerpos de inclusión en CAPS 10 mM de pH 10 fueron diluidas apropiadamente en CAPS 10 mM de pH 10, y todos los bioensayos contenían un tratamiento de control consistente en este tampón, que sirvió como referencia para mortalidad o inhibición del crecimiento.

Las concentraciones de proteína en el tampón del bioensayo fueron estimadas por electroforesis en gel, usando BSA para crear una curva estándar para la densitometría en gel, que se midió usando un sistema de generación de imágenes BioRad (Fluor-S MultiImager con software Quantity One versión 4.5.2). Las proteínas en la matriz de gel fueron teñidas con tinción a base de azul Coomassie, y decoloradas antes de leer.

Las proteínas purificadas fueron analizadas para determinar actividad insecticida en bioensayos efectuados con larvas neonatas de lepidópteros alimentadas con dieta para insectos artificial. Las larvas de DBM y FAW nacieron de huevos obtenidos de una colonia mantenida por un insectario comercial (Benzon Research Inc., Carlisle, PA). Las larvas de FAWr nacieron de huevos cosechados de una colonia de propiedad de la empresa (Dow AgroSciences LLC, Indianapolis, IN).

Estos bioensayos se efectuaron en bandejas de plástico de 128 pocillos específicamente diseñadas para bioensayos en insectos (C-D International, Pitman, NJ). Cada pocillo contenía 1,0 ml de alimento para multi-especies de lepidópteros (Southland Products, Lake Village, AR). Una alícuota de 40 μ l de muestra de proteína fue aplicada mediante pipeta sobre la superficie del alimento de 1,5 cm^2 de cada pocillo (26,7 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$). Las concentraciones de proteína Cry se calcularon como la cantidad (ng) de proteína DIG por centímetro cuadrado (cm^2) de área superficial en el pocillo. Las bandejas tratadas se mantuvieron en una campana extractora de humos hasta que el líquido en la superficie del alimento se evaporó o fue absorbido en el alimento.

Unas pocas horas después de la eclosión, larvas individuales fueron recogidas con un pincel de pelo de camello humedecido y depositadas sobre el alimento tratado, una larva por pocillo. Enseguida, los pocillos infestados fueron sellados con láminas adhesivas de plástico transparente, agujereado para permitir el intercambio de gases (C-D International, Pitman, NJ). Las bandejas del bioensayo se mantuvieron bajo condiciones ambientales controladas (28°C, ~60% de humedad relativa, 16:8 [luz:oscuridad]) por 5 días, después de lo cual se registró el número total de insectos expuestos a cada muestra de proteína, el número de insectos muertos y el peso de los insectos sobrevivientes. Para cada tratamiento, se calculó el porcentaje de mortalidad y el porcentaje de inhibición del crecimiento. La inhibición del crecimiento (GI) se calculó como sigue:

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

donde TWIT es el peso total de los insectos en el tratamiento,

TNIT es el número total de insectos en el tratamiento,

TWIBC es el peso total de los insectos en la referencia (control con tampón), y
TNIBC es el número total de insectos en la referencia (control con tampón).

En el bioensayo para DBM, 10 y 300 ng/cm² de DIG-462, DIG-463, DIG-464, DIG-465, DIG-466, DIG-467, DIG-468, DIG-469, DIG-470, DIG-471, DIG-472, DIG-473 y DIG-474 fueron analizados contra los insectos. Los FAW fueron analizados con una preparación de cuerpos de inclusión de DIG-462, DIG-465, DIG-473 a una tasa de dilución de 1X y 5X. Se compararon los resultados de porcentaje de mortalidad e inhibición del crecimiento.

La mortalidad fue de 100% a 300 ng/cm² para los tratamientos con DIG-462, DIG-463, DIG-464, DIG-465, DIG-466, DIG-468, DIG-469, DIG-473 y DIG-474 (Tabla 2 y Tabla 3). La inhibición del crecimiento fue de 70-90% de inhibición del crecimiento a 10 ng/cm² y 100% de inhibición a 300 ng/cm² para los tratamientos con DIG-465 y DIG-473 (Tabla 2).

Tabla 2

Resultados de las pruebas de bioensayos de las proteínas DIG-462, DIG-465 y DIG-473 en DBM, midiendo tanto mortalidad como inhibición del crecimiento

Proteína	Mortalidad	Inhibición del crecimiento
DIG-462	+++	++++
DIG-465	++	++++
DIG-473	+++	++++

Para Mortalidad ++ = 0-20% a 10 ng/cm² y 100% a 300 ng/cm², +++= 30-60% a 10 ng/cm² y 100% a 300 ng/cm². Para Inhibición del crecimiento ++++ = 70-90% de inhibición del crecimiento a 10 ng/cm² y 100% de inhibición a 300 ng/cm².

Tabla 3

Resultados de los bioensayos de mutantes de proteínas probados contra DBM a concentraciones de 10 ng/cm² y 300 ng/cm².

Proteína	% de Mortalidad a 10 ng/cm ²	% de Mortalidad a 300 ng/cm ²
----------	---	--

DIG-462	38	100
DIG-463	63	100
DIG-464	38	100
DIG-465	0	100
DIG-466	38	100
DIG-467	38	88
DIG-468	13	100
DIG-469	0	100
DIG-470	0	50
DIG-471	0	0
DIG-472	0	0
DIG-473	38	100
DIG-474	0	100
BSA	0	0

Se determinó que la inhibición del crecimiento de las proteínas toxina núcleo de Cry1Ca (DIG-462), DIG-465 y DIG-473 en las larvas de FAW era >40% para todos los tratamientos (Tabla 4). Las proteínas fueron analizadas a la concentración máxima y diluidas 5 veces con tampón (CAPS 10 mM, pH 10).

Tabla 4

Porcentaje de inhibición del crecimiento de DIG-462, DIG-465 y DIG-473 en FAW

Proteína	Dilución	% de Inhibición del crecimiento
DIG-462	1X	43
DIG-462	5X	47
DIG-465	1X	81
DIG-465	5X	58

DIG-473	1X	56
DIG-473	5X	48
Tampón	1X	0

Se evaluó la actividad en DBM y la susceptibilidad de la proteína purificada a ser digerida por quimotripsina. Un hallazgo inesperado y sorprendente fue que DIG-473 era resistente a la escisión por quimotripsina, y a la vez tenía la misma potencia contra DBM que DIG-462. Esto contrasta con las proteínas núcleo de Cry1Ca (DIG-462) y DIG-465, que fueron susceptibles a la escisión por quimotripsina *in vitro* (Tabla 5).

Tabla 5

Proteínas con actividad contra DBM (DIG-462 es el estándar) y resistencia de las proteínas a la escisión por quimotripsina

DIG #	Tipo de mutación	Actividad sobre DBM	Resistente a quimotripsina
462	Truncada	++++	No
463	G54A	++++	No
464	L57M	++++	No
465	L57A	++++	No
466	V68F	++++	No
467	V68I	++++	No
468	ΔGPS	+++	No
469	W73A	+++	Parcial
473	F596M	++++	Sí
474	F596A	++++	No
482	G54A/W73M	+++	Sí
483	G54A/ΔGPS	+++	Sí

485	L57A/ Δ GPS	+++	No
487	L57M/ Δ GPS	+++	No

EJEMPLO 4

Bioensayos en taladro del maíz europeo (ECB), taladro del maíz del sudoeste (SWCB)
y gusano cogollero del sur (SAW)

Los bioensayos se efectuaron en bandejas de prueba de 32 pocillos. Aproximadamente 5 ml de una solución al 2% de agar en agua fueron aplicados a cada pocillo y el agar se dejó solidificar completamente.

Las plantas tenían aproximadamente 3 semanas y fueron analizadas en la generación T₁. Se completaron tres réplicas de material de hoja T₁. Una hoja fue cortada (rectangular de 1" x 0,5" [2,54 x 1,27 cm]) y colocada en un pocillo único de la bandeja. Cada pocillo fue infestado con 10 larvas de insectos individuales (habitualmente de menos de 24 horas de edad) de ECB, ECB resistente a Cry1Fa o SWCB. Para SAW, cada pocillo fue infestado con 5 larvas de insectos individuales. Plantas a base de semillas originadas de líneas endogámicas B104 y plantas transformadas con proteína fluorescente amarilla (YFP) sirvieron como controles negativos.

Después, los pocillos infestados fueron sellados con láminas adhesivas de plástico transparente, agujereado para permitir el intercambio de gases (C-D International, Pitman, NJ). Las bandejas se colocaron en una incubadora Conviron y se mantuvieron a 28°C (16:8 h de luz:oscuridad, 60% de HR) por 3 días, después de lo cual se registró la cantidad total de daño a cada trozo de hoja (0, 5, 10, 15, 25, 50, 75% de daño, etc., hasta 100%).

Hubo daño por alimentación reducido causado por ECB y ECB resistente a Cry1Fa (ECBr) cuando las larvas de insectos fueron expuestas a plantas que contenían proteína modificada Cry1Ca truncada. Cuando se prueba en un bioensayo con alimento, donde Cry1Ca de longitud completa purificada se coloca encima de un alimento para insectos artificial y se permite que insectos individuales ingieran el alimento que contiene la toxina, se encuentra que Cry1Ca

modificada es inactiva contra ECB y ECBr. Sin embargo, cuando es expresada en maíz, a concentraciones de >120 ng/cm², la expresión de Cry1Ca en la planta proporciona una protección inesperada contra el daño por alimentación causado por ECB y especialmente ECBr.

Tabla 6

Resultados del bioensayo en maíz T₁ con IRDIG544.12 cuando fue dado como alimento a taladro del maíz europeo (ECB) y ECB resistente a Cry1Fa (ECBr)

Nombre de la planta	Descripción	Daño promedio por ECB	Daño promedio por ECBr	Toxina ng/cm ²
Control negativo con YFP	control	100	88,3	0
Control negativo con YFP	control	100	93,3	0
Control negativo con YFP	control	97,7	98,3	0
Control negativo con YFP	control	99,3	98	0
Control negativo con YFP	control	100	92,7	0
114269[1]-021.001AJ.025	IRDIG544.12 c/ TraP12	96	85	41
114269[1]-021.001AJ.018	IRDIG544.12 c/ TraP12	94,3	90	42
114269[1]-021.001AJ.017	IRDIG544.12 c/ TraP12	99,3	95	34
114269[1]-021.001AJ.023	IRDIG544.12 c/ TraP12	99,3	50	36
114269[1]-021.001AJ.016	IRDIG544.12 c/ TraP12	99,3	80	33
114260[1]-021.AJ001.023	IRDIG544.12	66,7	11,7	210
114260[1]-021.AJ001.029	IRDIG544.12	69,7	13,3	230
114260[1]-021.AJ001.021	IRDIG544.12	66,7	16,7	210
114260[1]-021.AJ001.016	IRDIG544.12	50	18,3	230
114260[1]-021.AJ001.019	IRDIG544.12	50	18,3	210
114259[1]-009.AJ001.018	IRDIG544.12	95	85	100

114259[1]-009.AJ001.022	IRDIG544.12	86	61,7	130
114259[1]-009.AJ001.021	IRDIG544.12	93,3	75	140
114259[1]-009.AJ001.026	IRDIG544.12	80	95	67
114259[1]-009.AJ001.027	IRDIG544.12	100	61,7	92
114260[1]-010.001AJ.054	IRDIG544.12	68,3	25	180
114260[1]-010.001AJ.048	IRDIG544.12	71,7	18,3	180
114260[1]-010.001AJ.047	IRDIG544.12	66,7	50	140
114260[1]-010.001AJ.052	IRDIG544.12	71,7	20	220
114260[1]-010.001AJ.046	IRDIG544.12	86,7	16,7	200
114269[1]-029.001AJ.027	IRDIG544.12 c/ TraP12	91	66,7	39
114269[1]-029.001AJ.028	IRDIG544.12 c/ TraP12	88,3	66,7	30
114269[1]-029.001AJ.023	IRDIG544.12 c/ TraP12	96,7	88,3	41
114269[1]-029.001AJ.026	IRDIG544.12 c/ TraP12	96	76,7	37
114269[1]-029.001AJ.019	IRDIG544.12 c/ TraP12	96,7	95	41
114267[1]-009.001AJ.044	IRDIG544.12 c/ TraP12	95	70	36
114267[1]-009.001AJ.034	IRDIG544.12 c/ TraP12	88,3	56,7	44
114267[1]-009.001AJ.032	IRDIG544.12 c/ TraP12	96,7	86,7	41
114267[1]-009.001AJ.037	IRDIG544.12 c/ TraP12	96,7	88,3	43
114267[1]-009.001AJ.030	IRDIG544.12 c/ TraP12	91,7	80	43
114259[1]-006.001AJ.015	IRDIG544.12	91,7	90	38
114259[1]-006.001AJ.014	IRDIG544.12	98,3	85	41
114259[1]-006.001AJ.005	IRDIG544.12	95	80	40

114259[1]-006.001AJ.010	IRDIG544.12	81,7	86	39
114259[1]-006.001AJ.013	IRDIG544.12	85	88,3	47
114270[1]-027.AJ001.029	IRDIG544.12 c/ TraP12	98,7	96,7	170
114270[1]-027.AJ001.030	IRDIG544.12 c/ TraP12	91,7	99,3	150
114270[1]-027.AJ001.023	IRDIG544.12 c/ TraP12	93,3	95	170
114270[1]-027.AJ001.028	IRDIG544.12 c/ TraP12	96,7	85	160
114270[1]-027.AJ001.027	IRDIG544.12 c/ TraP12	98,3	86,7	150
114257[1]-016.AJ001.030	IRDIG544.12	100	86,7	100
114257[1]-016.AJ001.024	IRDIG544.12	68,3	97	140
114257[1]-016.AJ001.021	IRDIG544.12	100	99,3	130
114257[1]-016.AJ001.027	IRDIG544.12	100	71,7	130
114257[1]-016.AJ001.022	IRDIG544.12	100	81,7	120
114267[1]-021.AJ001.039	IRDIG544.12 c/ TraP12	91,7	61,7	230
114267[1]-021.AJ001.034	IRDIG544.12 c/ TraP12	95	80	180
114267[1]-021.AJ001.044	IRDIG544.12 c/ TraP12	83,3	75	210
114268[1]-023.AJ001.036	IRDIG544.12 c/ TraP12	81	99	320
114268[1]-023.AJ001.041	IRDIG544.12 c/ TraP12	100	83,3	410
114268[1]-023.AJ001.034	IRDIG544.12 c/ TraP12	93,3	55	520
114268[1]-023.AJ001.039	IRDIG544.12 c/ TraP12	91,7	80	620
114268[1]-023.AJ001.026	IRDIG544.12 c/ TraP12	98,3	96	440

114268[1]-026.AJ001.053	IRDIG544.12 c/ TraP12	90	73,3	390
114268[1]-026.AJ001.046	IRDIG544.12 c/ TraP12	90	84,3	500
114268[1]-026.AJ001.037	IRDIG544.12 c/ TraP12	99,3	71,7	320
114268[1]-026.AJ001.038	IRDIG544.12 c/ TraP12	91,7	65	320
114268[1]-026.AJ001.052	IRDIG544.12 c/ TraP12	97,7	66,7	360
114271[1]-011.001AJ.031	IRDIG544.12 c/ TraP12	100	95	4
114271[1]-011.001AJ.042	IRDIG544.12 c/ TraP12	100	95	4
114271[1]-011.001AJ.043	IRDIG544.12 c/ TraP12	96	91,7	4
114271[1]-011.001AJ.047	IRDIG544.12 c/ TraP12	100	97,7	3
114271[1]-011.001AJ.046	IRDIG544.12 c/ TraP12	100	98	3
114270[1]-023.001AJ.050	IRDIG544.12 c/ TraP12	90	80	210
114270[1]-023.001AJ.055	IRDIG544.12 c/ TraP12	99,3	73,3	260
114270[1]-023.001AJ.044	IRDIG544.12 c/ TraP12	100	92	250
114270[1]-023.001AJ.054	IRDIG544.12 c/ TraP12	100	88,3	210
114270[1]-023.001AJ.058	IRDIG544.12 c/ TraP12	100	82,7	140
B104	control	100	100	0
B104	control	100	100	0
B104	control	100	100	0
B104	control	100	99,3	0
B104	control	100	86	0

Se observó daño por alimentación reducido causado por taladro del maíz del sudoeste (SWCB) y gusano cogollero del sur (SAW) cuando las larvas de insectos fueron expuestas a plantas que contenían proteína modificada Cry1Ca truncada, en un rango de expresión de la proteína de 140-340 ng/cm² (Tabla 7). La expresión promedio fue de 210 ng/cm² con una desviación estándar de 35.

Tabla 7

Bioensayo de plantas de maíz T₁ con IRDIG544.12 cuando fueron dadas como alimento a taladro del maíz del sudoeste (SWCB) y gusano cogollero del sur (SAW)

Nombre de la planta	Daño promedio por SWCB	Daño promedio por SAW
112726[1]-015.AJ001.047	2	3,0
112726[1]-015.AJ001.030	4	3,0
112726[1]-015.AJ001.019	1	1,3
112726[1]-015.AJ001.034	2	2,0
Control negativo con YFP	98,3	94,3
Control negativo con YFP	93,3	62,5
Control negativo con YFP	100	27,5
Control negativo con YFP	92,7	67,5
Control negativo con YFP	97,7	30,0
Control negativo con YFP	100	45,0
B104	98,3	94,3
B104	100	91,7
B104	100	97,0
B104	65	70,0
B104	100	86,7

Pruebas de campo en taladros del maíz se efectuaron en dos lugares: uno en Indiana (IN), Estados Unidos y el otro en Mississippi (MS), Estados Unidos. Múltiples construcciones y eventos fueron ensayados para cada tratamiento. Cry1Ab y Cry1F sirvieron como controles positivos en los ensayos en ECB. El nulo sirvió como control negativo.

Para evaluar la eficacia en ECB, cada planta recibió diez larvas de ECB de segundo estadio en el verticilo de plantas de etapa V6-V7. En MS, larvas de segundo estadio de taladro del maíz del sudoeste (SWCB) también fueron introducidas como infestación artificial en los verticilos de maíz V9 (22 larvas por planta). Los ECB y SWCB usados se obtuvieron de Benzon Laboratory. En ambos ensayos en ECB, las plantas fueron evaluadas 2 semanas después de la infestación en cuanto al daño foliar (escala de 1-9 de Guthrie) (Guthrie *et al.*, 1960) donde 1 significa sin daño visible y 9 significa la mayoría de las hojas con lesiones largas (Tabla 8). En los ensayos de SWCB en MS, las plantas fueron examinadas 4-5 días después de la calificación de los verticilos en cuanto a daño en los tallos e insectos vivos. Los datos recolectados incluyeron número de túneles por tallo, longitud de los túneles y larvas/pupas vivas por tallo.

Tabla 8

Criterio de puntajes de daño por taladradores del maíz (daño en los verticilos).

Puntaje	Criterio
1	No hay daño visible en las hojas o hay una pequeña cantidad de lesiones de tipo agujero de bala en unas pocas hojas.
2	Pequeña cantidad de lesiones de tipo agujero de bala en unas pocas hojas.
3	Lesiones de tipo agujero de bala comunes en varias hojas.
4	Varias hojas con agujeros de bala y lesiones alargadas.
5	Varias hojas con lesiones alargadas.
6	Varias hojas con lesiones alargadas (de aproximadamente 1 pulgada [2,54 cm]).
7	Lesiones largas comunes en la mitad de las hojas.
8	Lesiones largas comunes en alrededor de 2/3 de las hojas.

9	La mayoría de las hojas con lesiones largas.
---	--

Pruebas de campo en ECB. El daño a los verticilos por ECB fue medido para actividad de Cry1Ca, que mostró una protección a los verticilos significativamente mejor en comparación con el nulo. Las actividades de los eventos de Cry1Ca no fueron estadísticamente equivalentes a la protección a los verticilos proporcionada por Cry1Ab y Cry1F.

Los datos generados en MS reforzaron aún más el inesperado alto nivel de protección a las plantas para Cry1Ca. Se estableció una alta presión de alimentación en este estudio. Un control significativo fue determinado para Cry1Ca en comparación con el daño foliar y a los tallos en el nulo. Se encontraron muy pocos insectos vivos que sobrevivieron en los tallos con Cry1Ca. Una protección significativa para los verticilos y tallos fue determinada para eventos de Cry1Ab y Cry1F en comparación con el nulo.

Tabla 9

Datos de verticilos foliares para ECB, IN (promedio en múltiples eventos)

Gen	Eventos	Puntaje de daño promedio a los verticilos (Puntaje 1-9)	Rango de medias
Cry1Ca	4	2,31 B	2,00-2,65
Cry1Ab	8	1,00 A	1,00
Cry1F	12	1,03 A	1,00-1,20
Nulo	1	4,65 C	

Medias seguidas por diferentes letras son significativamente diferentes ($P \leq 0,05$).

Tabla 10

Datos de verticilos foliares y tallos para ECB, MS (promedio en múltiples eventos)

Gen de la toxina	Número de eventos	Puntaje de daño promedio a los verticilos (1-9)	# Promedio de túneles por tallo	Longitud promedio de los túneles (cm)	# Promedio de larvas + pupas por tallo
Cry1Ca	3	2,74 B	0,53 B	1,43 B	0,25 B
Cry1Ab	8	1,66 D	0,00 C	0,00 C	0,00 C
Cry1F	8	1,85 C	0,00 C	0,00 C	0,00 C
Nulo	1	6,77 A	1,93 A	9,15 A	1,89 A

Para todas las columnas de datos, todos los eventos génicos fueron significativamente diferentes de los valores del nulo ($P < 0,05$). Dentro de cada columna, las medias seguidas por diferentes letras son significativamente diferentes ($P \leq 0,05$).

En el ensayo en SWCB, se evaluaron solo 2 eventos por *B.t.*. Se estableció una alta presión de alimentación en este estudio. Una protección a los tallos y un número de larvas y pupas por tallo estadísticamente equivalentes fueron determinados para los eventos de Cry1Ab, Cry1F y Cry1Ca.

Tabla 11

Datos de verticilos foliares y tallos para SWCB, MS

Gen de la toxina	Número de eventos	Puntaje de daño promedio a los verticilos (1-9)	# Promedio de túneles por tallo	Longitud promedio de los túneles (cm)	# Promedio de larvas + pupas por tallo
Cry1Ca	2	1,90 C	0,07 B	0,20 B	0,02 B
Cry1Ab	2	1,91 C	0,00 B	0,00 B	0,00 B
Cry1F	2	2,18 B	0,07 B	0,54 B	0,03 B
Nulo	1	7,17 A	3,53 A	28,62 A	3,06 A

Dentro de cada columna, las medias seguidas por diferentes letras son significativamente diferentes ($P \leq 0,05$).

La forma activa de Cry1Ca está compuesta de los amino ácidos 29-628. Las formas de longitud completa (1-1164) o escindidas (1-628 y 29-628) son activas cuando son presentadas a los insectos, ya que son procesadas a la forma de 29-628.

EJEMPLO 5

Pruebas de campo en gusano de la mazorca del maíz

Se efectuaron pruebas de campo en gusano de la mazorca del maíz en Fowler, IN con múltiples construcciones y eventos (SEQ ID NO:31). El nulo sirvió como control negativo. Cada planta recibió cinco larvas del primer estadio en los pelos verdes de las mazorcas de maíz. Los CEW se obtuvieron de Benzon Laboratory. Diez mazorcas de maíz por parcela y por evento fueron evaluadas para determinar el nivel de daño a los granos de choclo en las mazorcas de maíz infestadas con CEW. Todos los eventos transgénicos proporcionaron niveles significativamente más bajos de daño a los granos en comparación con el nulo. Hubo una supresión significativa de alimentación de las larvas en las plantas con Cry1Ca (Tabla 12).

Tabla 12

Datos de consumo de granos de choclo en CEW, IN

Gen	Entradas	Área promedio (cm ²) de granos consumidos*	% de reducción en área de granos consumidos (comparado con el nulo)
Cry1Ca	4	1,72 B	63,2
Cry1F	12	1,86 B	60,3
Nulo	1	4,68 A	

EJEMPLO 6

Transformación por *Agrobacterium*

Métodos estándar de clonación se usaron en la construcción de plásmidos binarios de transformación y expresión en plantas. Plásmidos binarios de *Agrobacterium* que contenían los casetes de expresión de *cryI*Ca fueron modificados por ingeniería genética usando tecnología Gateway® (Invitrogen, Carlsbad, CA) y usados en la transformación de plantas mediada por *Agrobacterium*. Las endonucleasas de restricción fueron obtenidas de New England BioLabs (NEB; Ipswich, MA) y ADN ligasa T4 (Invitrogen) fue usada para la ligazón del ADN. Las reacciones de Gateway se efectuaron usando la mezcla de enzimas Gateway® LR Clonase® (Invitrogen). Las preparaciones de plásmidos se efectuaron usando el kit de preparación de plásmidos NucleoSpin® o el kit NucleoBond® AX Xtra Midi (ambos de Macherey-Nagel), siguiendo las instrucciones de los fabricantes. Los fragmentos de ADN fueron purificados usando el kit de purificación por PCR QIAquick o el kit de extracción desde gel QIAEX II (ambos de Qiagen) después del aislamiento del gel.

Fragmentos de ADN que comprendían las secuencias de nucleótidos que codifican las proteínas insecticidas, o fragmentos de las mismas, fueron sintetizados por un proveedor comercial (por ejemplo DNA2.0, Menlo Park, CA) y suministrados como fragmentos clonados en vectores plásmidos estándar, o fueron obtenidos por manipulación de biología molecular estándar de otras construcciones que contenían secuencias de nucleótidos apropiadas. Se identificaron sitios de restricción singulares internos para cada gen y se sintetizó un fragmento de cada gen, cada uno conteniendo una delección o inserción específica. Los fragmentos de Cry modificada fueron subclonados en otros fragmentos de Cry, en un sitio de restricción apropiado para obtener una región que codificara la proteína de longitud completa, proteínas fusionadas o proteínas variantes por delección deseadas.

Células electrocompetentes de la cepa Z707S de *Agrobacterium tumefaciens* (un derivado resistente a estreptomicina de Z707; Hepburn *et al.*, 1985) fueron preparadas y transformadas usando electroporación (Weigel y Glazebrook, 2002). Después de la electroporación, se añadió a la cubeta 1 ml de caldo YEP (g/l: extracto de levadura, 10; peptona, 10; NaCl, 5), y la suspensión de células en YEP fue transferida a un tubo de cultivo de 15 ml para su incubación a 28°C en un baño de agua con agitación constante por 4 horas. Las células se

sembraron en placas de YEP más agar (25 g/l) con espectinomicina (200 µg/ml) y estreptomicina (250 µg/ml), y las placas se incubaron por 2-4 días a 28°C. Colonias individuales bien separadas fueron seleccionadas y aplicadas en rayas sobre placas frescas de YEP + agar con espectinomicina y estreptomicina como antes, e incubadas a 28°C por 1-3 días.

La presencia del inserto del gen de la proteína insecticida en el vector de transformación de plantas binario se determinó por análisis PCR, usando partidores con especificidad de vector con ADN plasmidial molde preparado a partir de colonias de *Agrobacterium* seleccionadas. El pélet de células de una alícuota de 4 ml de un cultivo nocturno de 15 ml en YEP con espectinomicina y estreptomicina como antes, fue extraído usando el kit Qiagen Spin Mini Prep según las instrucciones del fabricante. ADN plasmidial del vector binario usado en la transformación por electroporación con *Agrobacterium* fue incluido como control. La reacción de PCR se completó usando ADN polimerasa Taq de Invitrogen según las instrucciones del fabricante, a concentraciones de 0,5x. Las reacciones de PCR se efectuaron en un ciclador térmico MJ Research Peltier programado con las siguientes condiciones: Paso 1) 94°C por 3 minutos; Paso 2) 94°C por 45 segundos; Paso 3) 55°C por 30 segundos; Paso 4) 72°C por 1 minuto por kb de la longitud esperada del producto; Paso 5) 29 veces al Paso 2; Paso 6) 72°C por 10 minutos. La reacción se mantuvo a 4°C después de la ciclación. Los productos de la amplificación fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa (por ejemplo 0,7% a 1% de agarosa, p/v) y visualizados por tinción con bromuro de etidio. Se seleccionó una colonia cuyo producto de PCR era idéntico al plásmido de control.

Tabla 13

Descripción de plásmidos que expresan DIG-465 y DIG-473 en maíz.

Plásmido	Descripción
pDAB115752	ZmUbi1/DIG-465/ZmPer5::SCBV(MAM)v2/AAD-1v3/ZmLip
pDAB115753	ZmUbi1/DIG-473/ZmPer5::SCBV(MAM)v2/AAD-1v3/ZmLip
pDAB112725	ZmUbi1/Cry1Ca (Zm)/ZmPer5::SCBV(MAM)/AAD-1v3/ZmLip

pDAB112726	ZmUbi1/Cry1Ca (HGC)/ZmPer5::SCBV(MAM)/AAD-1v3/ZmLip
------------	---

EJEMPLO 7

Producción de proteínas insecticidas de *B.t.* DIG-465 y DIG-473 y variantes en plantas monocotiledóneas.

Transformación de maíz mediada por *Agrobacterium*. Semillas provenientes de una cruza High II F₁ (Armstrong *et al.*, 1991) se plantaron en macetas de 5 galones [18,9 litros] que contenían una mezcla de 95% de medio de cultivo sin tierra Metro-Mix 360 (Sun Gro Horticulture, Bellevue, WA) y 5% de suelo franco arcilloso. Las plantas se cultivaron en un invernadero usando una combinación de lámparas de haluro de metal y sodio a alta presión, con un fotoperíodo de 16:8 horas de luz:oscuridad. Para obtener embriones F₂ inmaduros para transformación, se efectuaron polinizaciones controladas entre plantas del mismo híbrido ("sib-pollinations"). Los embriones inmaduros fueron aislados a los 8-10 días post-polinización cuando los embriones tenían un tamaño de aproximadamente 1,0 a 2,0 mm.

Infección y cocultivo. Mazorcas de maíz fueron esterilizadas en su superficie restregando con jabón líquido, sumergiendo en etanol al 70% por 2 minutos, y después sumergiendo en blanqueador comercial al 20% (0,1% de hipoclorito de sodio) por 30 minutos antes de enjuagar con agua estéril. Una suspensión de células de *Agrobacterium* conteniendo un vector superbinario se preparó transfiriendo 1-2 asas de bacterias cultivadas en medio sólido YEP que contenía 100 mg/l de espectinomicina, 10 mg/l de tetraciclina y 250 mg/l de estreptomicina a 28°C por 2-3 días, a 5 ml de medio de infección líquido (Medio basal LS (Linsmaier y Skoog, 1965), vitaminas de N6 (Chu *et al.*, 1975), 1,5 mg/l de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), 68,5 g/l de sacarosa, 36,0 g/l de glucosa, 6 mM de L-prolina, pH 5,2) que contenía 100 µM de acetosiringona. La solución se sometió a vórtice hasta que se obtuvo una suspensión uniforme, y la concentración se ajustó a una densidad final de 200 unidades Klett usando un colorímetro Klett-Summerson con un filtro de color morado. Los embriones inmaduros fueron aislados directamente en un tubo de microcentrífuga que contenía 2 ml del medio de infección. El medio

fue removido y reemplazado por 1 ml de la solución de *Agrobacterium* con una densidad de 200 unidades Klett, y la solución de *Agrobacterium* y embriones fue incubada por 5 minutos a temperatura ambiente y después transferida a un medio de cocultivo (Medio basal LS, vitaminas de N6, 1,5 mg/l de 2,4-D, 30,0 g/l de sacarosa, 6 mM de L-prolina, 0,85 mg/l de AgNO₃, 100 µM de acetosiringona, 3,0 g/l de goma Gellan (PhytoTechnology Laboratories., Lenexa, KS), pH 5,8) por 5 días a 25°C bajo condiciones de oscuridad.

Después del cocultivo, los embriones se transfirieron a medio selectivo, después de lo cual se obtuvieron aislados transformados en el curso de aproximadamente 8 semanas. Para la selección de tejidos de maíz transformados con un plásmido superbinario que contenía un gen marcador seleccionable expresable en plantas *pat* o *bar*, se usó un medio basado en LS (Medio basal LS, vitaminas de N6, 1,5 mg/l de 2,4-D, 0,5 g/l de MES (ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico monohidrato; PhytoTechnologies Labr.), 30,0 g/l de sacarosa, 6 mM de L-prolina, 1,0 mg/l de AgNO₃, 250 mg/l de cefotaxima, 2,5 g/l de goma Gellan, pH 5,7) con bialafos (Gold BioTechnology). Los embriones se transfirieron a un medio de selección que contenía 3 mg/l de bialafos hasta que se obtuvieron aislados embriogénicos. Se aumentó el volumen de los aislados recuperados transfiriéndolos a medio de selección fresco a intervalos de 2 semanas para regeneración y análisis adicional.

Regeneración y producción de semillas. Para la regeneración, los cultivos fueron transferidos a medio de inducción "28" (sales y vitaminas de MS, 30 g/l de sacarosa, 5 mg/l de bencilaminopurina, 0,25 mg/l de 2,4-D, 3 mg/l de bialafos, 250 mg/l de cefotaxima, 2,5 g/l de goma Gellan, pH 5,7) por 1 semana bajo condiciones de poca luz (14 µEm⁻²s⁻¹), y después 1 semana bajo condiciones de mucha luz (aproximadamente 89 µEm⁻²s⁻¹). Posteriormente, los tejidos fueron transferidos a medio de regeneración "36" (igual al medio de inducción, excepto que carece de reguladores del crecimiento de las plantas). Cuando las plántulas crecieron hasta 3-5 cm de longitud, fueron transferidas a tubos de cultivo de vidrio que contenían medio SHGA (sales y vitaminas de Schenk y Hildebrandt (1972; PhytoTechnologies Labr.), 1,0 g/l de mio-inositol, 10 g/l de sacarosa y 2,0 g/l de goma Gellan, pH 5,8) para permitir un crecimiento adicional y el desarrollo de los brotes y raíces. Las plantas fueron trasplantadas a la misma

mezcla de suelo descrita anteriormente aquí y cultivadas hasta la floración en el invernadero. Se efectuaron polinizaciones controladas para la producción de semillas.

El nivel de expresión de DIG-465 por la construcción 115752 y el nivel de expresión de DIG-473 por la construcción 115753 se presentan en la Figura 1. Ambas expresaron niveles similares de sus respectivas proteínas, a aproximadamente a 70-80 ng/cm² medido en hojas usando un punzón para hojas para obtener la muestra de tejido.

El SDS-PAGE del extracto fue tomado de maíz que expresaba el gen que codifica la proteína Cry1Ca de longitud completa (MR-1206) (pm 130 kDa). Al menos cinco productos de proteína fueron detectados por inmunotransferencia usando un anticuerpo policlonal dirigido contra Cry1Ca. Se detectó la proteína de longitud completa (130 kDa), codificada por el gen insertado en el maíz. Las otras bandas representan productos proteolíticos de esta proteína. Se determinó que un fragmento de proteína compuesto de las secuencias de amino ácidos 1-628, que representaba la toxina núcleo, tenía un peso molecular de 70 kDa. Una banda de 68 kDa representaba una proteína compuesta de los amino ácidos 29-628, donde los primeros 28 amino ácidos desde el terminal N estaban delecionados. Las primeras tres bandas fueron funcionalmente activas contra *S. frugiperda* y otros insectos lepidópteros. Una cuarta banda representaba una proteína escindida compuesta de los amino ácidos 74-628 (pm 62 kDa), y una quinta banda representaba la proteína Cry1Ca que fue procesada adicionalmente a los amino ácidos 74-596 (pm 59 kDa). Las bandas de 62 kDa y 59 kDa no fueron funcionalmente activas contra *S. frugiperda* y otros insectos lepidópteros, sin embargo representan productos de proteínas mayoritarios.

EJEMPLO 8

Bioensayo de maíz transgénico

La bioactividad de las proteínas DIG-465 y DIG-473 y variantes producidas en células de plantas, fue demostrada por métodos conocidos para los expertos en el arte (véase por ejemplo Huang *et al.*, 2006). La eficacia puede demostrarse dando de comer diversos tejidos o trozos de tejidos de plantas derivados de una planta que produce la proteína DIG-465 o DIG-473

o variantes, a insectos blanco en un ambiente de alimentación controlada. Alternativamente, pueden prepararse extractos de proteínas a partir de diversos tejidos de plantas derivados de una planta que produce la proteína DIG-465 o DIG-473 o variantes, y ser incorporados en un bioensayo con dieta artificial como se ha descrito anteriormente aquí. Debe entenderse que los resultados de estos ensayos de alimentación deben ser comparados con bioensayos efectuados en forma similar que emplean tejidos de control apropiados de plantas huéspedes que no producen la proteína DIG-465 o DIG-473 o variantes, o con otras muestras de control.

La actividad biológica de diversos eventos producidos en maíz a partir de la construcción 115752 (DIG-465) fue analizada en cuanto a la prevención del daño a las hojas causado por la actividad de alimentación ya sea de FAW o FAW resistente a Cry1Fa (FAWr). Los resultados indican que los eventos que expresaban la proteína DIG-465 exhibieron menos daño por alimentación que las plantas que no expresaban la proteína, y que el efecto era dependiente de la dosis, donde una expresión más alta de DIG-465 daba como resultado menos daño por alimentación causado ya sea por FAW o FAWr, siendo el efecto aparentemente mayor contra FAWr (Tabla 14 y Figura 2).

De manera similar, la actividad biológica de diversos eventos producidos en maíz a partir de la construcción 115753 (DIG-473) fue analizada en cuanto a la prevención del daño a las hojas causado por la actividad de alimentación ya sea de FAW o FAW resistente a Cry1Fa (FAWr). Los resultados indican que los eventos que expresaban la proteína DIG-473 exhibieron menos daño por alimentación que las plantas que no expresaban la proteína, y que el efecto era dependiente de la dosis, donde una expresión más alta de DIG-473 daba como resultado menos daño por alimentación causado ya sea por FAW o FAWr, siendo el efecto aparentemente mayor contra FAWr (Tabla 14 y Figura 3).

Tabla 14

Datos del bioensayo en FAW cuando fueron expuestos a DIG-465, DIG-473 o controles

Nombre de la planta	DIG #	Daño promedio por FAW	Daño promedio por FAWr	Toxina acumulada (ng/cm ²)
---------------------	-------	-----------------------	------------------------	--

115752[1]-001.001	DIG-465	65	20	24
115752[1]-002.001	DIG-465	20	4,375	46
115752[1]-003.001	DIG-465	32,5	3,75	75
115752[1]-004.001	DIG-465	100	98,75	0,7
115752[1]-005.001	DIG-465	30	8,75	110
115752[1]-006.001	DIG-465	40	11,25	44
115752[1]-007.001	DIG-465	22,5	5	110
115752[1]-009.001	DIG-465	3,125	3,125	56
115752[1]-010.001	DIG-465	17,5	11,25	53
115752[1]-011.001	DIG-465	3,125	1,75	170
115752[1]-012.001	DIG-465	27,5	5	16
115752[1]-013.001	DIG-465	20	1	61
115752[1]-014.001	DIG-465	25	3,75	97
115752[1]-016.001	DIG-465	15	3,75	110
115752[1]-017.001	DIG-465	75	45	2
115752[1]-018.001	DIG-465	25	4,375	72
115752[1]-019.001	DIG-465	10	2,125	37
115752[1]-020.001	DIG-465	25	1	120
115752[1]-021.001	DIG-465	20	1,75	65
115752[1]-022.001	DIG-465	12,5	7,5	110
115752[1]-023.001	DIG-465	35	11,25	84
115752[1]-024.001	DIG-465	47,5	10	67
115752[1]-025.001	DIG-465	20	5	120
115752[1]-026.001	DIG-465	4,375	8	130,00
115752[1]-027.001	DIG-465	5	3,125	56
115752[1]-028.001	DIG-465	10	3,75	96
115752[1]-029.001	DIG-465	4,375	2,5	80

115752[1]-030.001	DIG-465	8,75	10,625	21
115752[1]-031.001	DIG-465	100	100	0
115753[1]-001.001	DIG-473	100	100	0
115753[1]-002.001	DIG-473	12,5	8,75	130
115753[1]-003.001	DIG-473	20	7,5	78
115753[1]-004.001	DIG-473	20	3,125	110
115753[1]-005.001	DIG-473	25	11,875	24
115753[1]-006.001	DIG-473	12,5	1,75	96
115753[1]-007.001	DIG-473	8,75	3,75	89
115753[1]-008.001	DIG-473	25	3,375	130
115753[1]-010.001	DIG-473	20	6,25	89
115753[1]-011.001	DIG-473	15	4,375	100
115753[1]-012.001	DIG-473	13,75	2,125	79
115753[1]-013.001	DIG-473	17,5	2,75	54
115753[1]-014.001	DIG-473	10	12,5	65
115753[1]-015.001	DIG-473	20	3,75	130
115753[1]-016.001	DIG-473	7,5	3,125	49
115753[1]-017.001	DIG-473	2,125	3,125	110
115753[1]-018.001	DIG-473	100	100	0,7
115753[1]-019.001	DIG-473	100	100	0
115753[1]-020.001	DIG-473	11,875	1,75	90
115753[1]-021.001	DIG-473	10	3,75	130
115753[1]-022.001	DIG-473	40	5	120
115753[1]-023.001	DIG-473	7,5	3,75	110
115753[1]-025.001	DIG-473	13,75	3,375	72
115753[1]-026.001	DIG-473	12,5	4,375	150
115753[1]-027.001	DIG-473	5,625	2,5	93

115753[1]-028.001	DIG-473	5	11,875	48
115753[1]-029.001	DIG-473	3,125	3,125	56
115753[1]-030.001	DIG-473	7,5	3,125	120,00
B104		100	100	N/A
B104		100	100	N/A
B104		100	100	N/A
Control negativo con YFP		100	100	N/A
Control negativo con YFP		100	100	N/A
Control negativo con YFP		100	100	N/A
B104		100	100	N/A
B104		100	100	N/A
B104		100	100	N/A
Control negativo con YFP		100	100	N/A
Control negativo con YFP		100	100	N/A
Control negativo con YFP		100	100	N/A

Ejemplo 9

Producción de proteínas insecticidas de *Bt* y variantes en plantas dicotiledóneas

Transformación de *Arabidopsis*. *Arabidopsis thaliana* Col-01 fue transformada usando el método de inmersión floral (Weigel y Glazebrook, 2002). La colonia de *Agrobacterium* seleccionada fue usada para inocular 1 ml en cultivos de 15 ml de caldo YEP que contenía antibióticos apropiados para la selección. El cultivo fue incubado durante la noche a 28°C con agitación constante a 220 rpm. Cada cultivo fue usado para inocular dos cultivos de 500 ml de caldo YEP que contenía antibióticos apropiados para la selección, y los nuevos

cultivos fueron incubados durante la noche a 28°C con agitación constante. Las células fueron centrifugadas a aproximadamente 8.700 x g por 10 minutos a temperatura ambiente, y el sobrenadante resultante fue descartado. El pélet de células fue resuspendido suavemente en 500 ml de medio de infiltración que contenía: 1/2x de sales de Murashige y Skoog (Sigma-Aldrich)/vitaminas de B5 de Gamborg (Gold BioTechnology, St. Louis, MO), 10% (p/v) de sacarosa, 0,044 μ M de bencilaminopurina (10 μ l/litro de solución stock de 1 mg/ml en DMSO) y 300 μ l/litro de Silwet L-77. Plantas de aproximadamente 1 mes de edad fueron sumergidas en el medio por 15 segundos, cuidando de asegurarse de sumergir la inflorescencia más nueva. Enseguida, las plantas se depositaron de lado y se cubrieron (con un material transparente u opaco) por 24 horas, se lavaron con agua y se colocaron en posición vertical. Las plantas se cultivaron a 22°C, con un fotoperíodo de 16:8 de luz:oscuridad. Aproximadamente 4 semanas después de la inmersión, se cosecharon las semillas.

Cultivo y selección de *Arabidopsis*. Semillas T₁ recién cosechadas se dejaron secar por al menos 7 días a temperatura ambiente en presencia de un desecador. Las semillas fueron suspendidas en una solución de agar al 0,1%/agua (Sigma-Aldrich) y después estratificadas a 4°C por 2 días. Para preparar la plantación, mezcla de suelo Sunshine Mix LP5 (Sun Gro Horticulture Inc., Bellevue, WA) en bandejas de germinación de 10,5 pulgadas x 21 pulgadas [26,7 cm por 53,3 cm] (T.O. Plastics Inc., Clearwater, MN) fue cubierta con vermiculita fina, subirrigada con solución de Hoagland (Hoagland y Arnon, 1950) hasta que estuvo mojada, y después se dejó drenar por 24 horas. Las semillas estratificadas se sembraron en la vermiculita y se cubrieron con cúpulas de humedad (KORD Products, Bramalea, Ontario, Canadá) por 7 días. Las semillas germinaron y las plantas se dejaron crecer en un equipo Conviron (Modelos CMP4030 o CMP3244; Controlled Environments Limited, Winnipeg, Manitoba, Canadá) bajo condiciones de día largo (fotoperíodo de 16:8 de luz:oscuridad), con una intensidad de la luz de 120-150 μ mol/m²seg bajo temperatura (22°C) y humedad (40-50%) constantes. Las plantas se regaron inicialmente con solución de Hoagland y posteriormente con agua desionizada para mantener el suelo húmedo pero no mojado.

Las cúpulas se retiraron 5-6 días después de la siembra y las plantas se rociaron con un agente químico de selección para matar las plantas germinadas de semillas no transformadas. Por ejemplo, si el gen marcador seleccionable expresable en plantas proporcionado por el vector de transformación de plantas binario era un gen *pat* o *bar* (Wehrmann *et al.*, 1996), las plantas transformadas pudieron seleccionarse rociando con una solución 1000X de Finale (glufosinato de amonio al 5,78%, Farnam Companies Inc., Phoenix, AZ). Dos rociados subsiguientes se efectuaron a intervalos de 5-7 días. Las sobrevivientes (plantas que crecían activamente) fueron identificadas 7-10 días después del rociado final y trasplantadas a macetas preparadas con mezcla de suelo Sunshine Mix LP5. Las plantas trasplantadas se cubrieron con una cúpula de humedad por 3-4 días y se colocaron en una incubadora Conviron bajo las condiciones de cultivo mencionadas más arriba.

Los expertos en el arte de la transformación de plantas dicotiledóneas entenderán que otros métodos de selección de plantas transformadas están disponibles cuando se usan otros genes marcadores seleccionables expresables en plantas (por ejemplo, genes de tolerancia a herbicidas).

EJEMPLO 10

Glycine max transgénica que comprende proteína DIG

Diez a 20 plantas de *Glycine max* transgénica T₀ que albergaban vectores de expresión para ácidos nucleicos que comprendían proteína Cry1Ca fueron generadas como es conocido en el arte, incluyendo por ejemplo por transformación mediada por *Agrobacterium*. Semillas de soya (*Glycine max*) maduras fueron esterilizadas durante la noche con cloro gaseoso por dieciséis horas. Después de la esterilización con cloro gaseoso, las semillas se colocaron en un contenedor abierto en una campana de flujo LAMINAR® para disipar el cloro gaseoso. Enseguida, las semillas esterilizadas fueron empapadas con H₂O estéril por dieciséis horas en la oscuridad, usando una caja negra a 24°C.

Preparación de semilla dividida de soya. El protocolo para la semilla dividida de soya que comprende una porción de un eje embrionario requería la preparación de material de

semilla de soya, que se cortó longitudinalmente usando una hoja #10 fijada a un bisturí, a lo largo del hilo de la semilla para separar y remover el tegumento, y para dividir la semilla en dos secciones del cotiledón. Se tuvo especial cuidado de remover parcialmente el eje embriónico, donde alrededor de $1/2 - 1/3$ del eje embriónico quedó unido al extremo nodal del cotiledón.

Inoculación. Enseguida, las semillas de soya divididas que comprendían una porción parcial del eje embriónico fueron sumergidas por alrededor de 30 minutos en una solución de *Agrobacterium tumefaciens* (por ejemplo, cepa EHA 101 o EHA 105) que contenía plásmido binario que comprendía proteína DIG. La solución de *Agrobacterium tumefaciens* fue diluida hasta una concentración final de $\lambda=0,6$ DO₆₅₀ antes de sumergir los cotiledones que comprendían el eje embriónico.

Cocultivo. Después de la inoculación, se permitió que las semillas de soya divididas fueran cocultivadas con la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* por 5 días en medio de cocultivo (Wang, Kan. *Agrobacterium Protocols*. 2. 1. New Jersey: Humana Press, 2006. Print.) en una placa de Petri cubierta con un trozo de papel filtro.

Inducción de brotes. Después de 5 días de cocultivo, las semillas de soya divididas se lavaron en medio líquido de inducción de brotes (SI) consistente en sales de B5, vitaminas de B5, 28 mg/l de ferroso, 38 mg/l de Na₂EDTA, 30 g/l de sacarosa, 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). Enseguida, las semillas de soya divididas fueron cultivadas en medio de inducción de brotes I (SI I) consistente en sales de B5, vitaminas de B5, 7 g/l de agar Noble, 28 mg/l de ferroso, 38 mg/l de Na₂EDTA, 30 g/l de sacarosa, 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 mirando hacia arriba y el extremo nodal del cotiledón insertado en el medio. Después de 2 semanas de cultivo, los explantes de las semillas de soya divididas transformadas fueron transferidos al medio de inducción de brotes II (SI II) que contenía medio SI I suplementado con 6 mg/l de glufosinato (LIBERTY®).

Alargamiento de los brotes. Después de 2 semanas de cultivo en medio SI II, los cotiledones fueron removidos de los explantes y un cojinete con brotes al ras que contenía el eje

embriónico fue extirpado haciendo un corte en la base del cotiledón. El cojinete con brotes aislado del cotiledón fue transferido a medio de alargamiento de brotes (SE). El medio SE estaba constituido por sales de MS, 28 mg/l de ferroso, 38 mg/l de Na₂EDTA, 30 g/l de sacarosa 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 zeatina ribósido, 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 fueron transferidos a medio SE fresco cada 2 semanas. Los cultivos se dejaron crecer en una cámara de crecimiento CONVIRON® a 24°C con un fotoperíodo de 18 h a una intensidad de la luz de 80-90 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{seg}$.

Enraizamiento. Brotes alargados que se desarrollaron desde el cojinete con brotes del cotiledón fueron aislados cortando el brote alargado en la base del cojinete con brotes del cotiledón, y sumergiendo el brote alargado en 1 mg/l de IBA (ácido indol 3-butírico) por 1–3 minutos para promover enraizamiento. Enseguida, los brotes alargados fueron transferidos a medio de enraizamiento (sales de MS, vitaminas de B5, 28 mg/l de ferroso, 38 mg/l de Na₂EDTA, 20 g/l de sacarosa 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 Phytatray.

Cultivo. Después del cultivo en una cámara de crecimiento CONVIRON® a 24°C, fotoperíodo de 18 h, por 1-2 semanas, los brotes que habían desarrollado raíces fueron transferidos a una mezcla de suelo en un vaso para helado tapado, y colocados en una cámara de crecimiento CONVIRON® (modelos CMP4030 y CMP3244, Controlled Environments Limited, Winnipeg, Manitoba, Canadá) bajo condiciones de día largo (16 horas de luz/8 horas de oscuridad) a una intensidad de la luz de 120-150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{seg}$, a temperatura (22°C) y humedad (40-50%) constantes para la aclimatación de las plántulas. Las plántulas enraizadas fueron aclimatadas en vasos para helados por varias semanas antes de ser transferidas al invernadero para aclimatación adicional y establecimiento de plantas de soya transgénicas robustas.

El desarrollo y las características morfológicas de las líneas transgénicas fueron comparadas con plantas no transformadas. Se compararon las características de raíces, brotes, follaje y reproducción de las plantas. No había diferencias observables en longitud de las raíces y

patrones de crecimiento entre las plantas transgénicas y no transformadas. Características de los brotes de las plantas tal como altura, número y tamaño de las hojas, tiempo de floración, tamaño de las flores y apariencia fueron similares. En general, no hubo diferencias morfológicas observables entre líneas transgénicas y aquellas sin expresión de proteínas DIG, cuando fueron cultivadas *in vitro* y en suelo en el invernadero.

EJEMPLO 11

Transformación de especies de cultivos adicionales

El algodón es transformado con proteínas de *B.t.* (con o sin un péptido de tránsito al cloroplasto) para proporcionar control de insectos lepidópteros, utilizando un método conocido para los expertos en el arte, por ejemplo, sustancialmente las mismas técnicas descritas anteriormente en el EJEMPLO 9 de la patente norteamericana US 7.838.733, o el Ejemplo 12 de la publicación de patente internacional PCT N° WO 2007/053482.

Debe entenderse que los ejemplos y modalidades que se describen aquí son solamente para propósitos ilustrativos, y que diversas modificaciones o cambios a la luz de los mismos serán sugeridos a personas expertas en el arte, y deben ser incluidos dentro del espíritu y ámbito de esta solicitud y el alcance de las reivindicaciones adjuntas. Con las enseñanzas proporcionadas aquí, un experto en el arte podría fácilmente producir y usar las diversas toxinas y secuencias de polinucleótidos descritas aquí.