

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 811 914**

51 Int. Cl.:

C12N 15/82 (2006.01)

C12N 9/52 (2006.01)

C12N 15/57 (2006.01)

A01H 5/10 (2008.01)

C12N 5/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.08.2015 PCT/US2015/047649**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.03.2016 WO16036635**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.08.2015 E 15838145 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.05.2020 EP 3189145**

54 Título: **Genes de *Chromobacterium subtsugae***

30 Prioridad:

05.09.2014 US 201462046672 P

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

15.03.2021

73 Titular/es:

**MARRONE BIO INNOVATIONS, INC. (100.0%)
1540 Drew Avenue
Davis, CA 95618, US**

72 Inventor/es:

**CORDOVA-KREYLOS, ANA LUCIA;
BURMAN, SCOTT y
WILK, DEBORA**

74 Agente/Representante:

**INGENIAS CREACIONES, SIGNOS E
INVENCIONES, SLP**

ES 2 811 914 T3

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

DESCRIPCIÓN

Genes de *Chromobacterium subtsugae*

5 INCORPORACIÓN DE LISTADO DE SECUENCIAS

La presente solicitud contiene un listado de secuencias que se ha presentado en formato ASCII mediante EFS-Web. Dicha copia en ASCII se denomina MBI-203-0005-PCT_seq_ST25.txt y tiene un tamaño de 13.798 bytes.

10 **Campo**

La presente divulgación pertenece al campo de bioplaguicidas; en particular, plaguicidas bacterianos, sus genes, productos génicos y método de uso de los mismos.

15 **Antecedentes*****Chromobacterium subtsugae***

20 En 2000, se aisló una bacteria de color morado (PRAA4-1) de suelo forestal en Maryland (Martin *et al.*, 2004). En exploraciones iniciales, se descubrió que esta bacteria era tóxica para el escarabajo de la patata y otras plagas de insectos (Martin *et al.*, 2007a). Trabajos adicionales con el aislado han revelado actividad contra ácaros, larvas, diversas especies de escarabajos, áfidos y nematodos parásitos de plantas, entre otras plagas de plantas (Martin, *et al.*, 2007b, publicación de solicitud de patente de los Estados Unidos n.º 2012/0100236 A1). Existen algunos estudios de proteínas de PRAA4-1 en el campo de la técnica con respecto a proteínas activas contra insectos.

25

Proteasas y control de insectos

Las proteasas tienen la capacidad de dirigirse a y destruir proteínas y tejidos esenciales de insectos. Las plantas han evolucionado de manera natural para expresar proteasas para protegerse contra insectos. Los insectos depredadores también producen proteasa en su veneno, lo que contribuye a la mortalidad. Se han identificado las proteasas como agentes insecticidas importantes para el control de insectos en la agricultura.

30

Las proteasas con actividad insecticida se clasifican en tres categorías generales: cisteína proteasas, metaloproteasas y serina proteasas. Las proteasas de estas clases se dirigen al intestino medio, la cutícula y el hemocele. La matriz peritrófica del intestino medio es una diana ideal para el control de insectos debido a que reviste y protege el epitelio del intestino medio de partículas alimentarias, enzimas digestivas y patógenos; además de actuar como una barrera bioquímica (Hegedus *et al.*, 2009). Las enhancinas son metaloproteasas de cinc expresadas por baculovirus que facilitan las infecciones por nucleopolyhedrovirus en lepidópteros (Lepore *et al.*, 1996). Estas proteasas promueven la infección de larvas de lepidópteros digiriendo la proteína mucina intestinal de invertebrados de la matriz peritrófica, lo que, a su vez, promueve la infección del epitelio del intestino medio (Wang y Granados, 1997). Se han identificado homólogos de genes de enhancina en baculovirus en los genomas de *Yersinia pestis*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus thuringiensis* y *Bacillus cereus* (Galloway *et al.*, 2005; Hajajj-Ellouze *et al.*, 2006).

35

40

Las cisteína proteasas de plantas también demuestran actividad contra larvas de lepidópteros. Las cisteína proteasas en el látex del papayo y la higuera silvestre son esenciales en la defensa contra diversas larvas de lepidópteros. La toxicidad para las larvas se perdió cuando se lavó el látex o cuando las hojas se trataron con un inhibidor de cisteína proteasa, lo que indica que la defensa puede deberse a la alta concentración de cisteína proteasas en el látex (Konno *et al.*, 2004).

45

Las proteasas que se dirigen a la cutícula también son importantes en el control de insectos. La cutícula recubre toda la parte externa del insecto, así como algunas invaginaciones de estructuras internas. La cutícula está compuesta de una epicutícula cerosa, una exocutícula y una endocutícula que consisten en proteína, lípido y quitina (Harrison y Bonning 2010). Se produce infección fúngica de insectos por *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana* cuando las esporas fúngicas germinan en la cutícula, formando estructuras para la penetración de la cutícula por diversas enzimas, incluyendo proteasas (Freimoser *et al.*, 2003; Cho *et al.*, 2006). Una serina proteasa notable producida por *M. anisopliae*, PR1A, digiere la cutícula y desempeña una función esencial en la penetración (St. Leger *et al.*, 1987). Se modificó por ingeniería genética un clon de *M. anisopliae* para que contuviera copias adicionales del gen *pr1a* y mostró 25 % más destrucción del gusano de cuerno que el tipo silvestre (St Leger *et al.*, 1996). También se modificó por ingeniería genética *B. bassiana* para expresar la proteasa PR1A de *M. anisopliae* y demostró mayor toxicidad de larvas de oruga de los pinos de Masson, *Dendrolimus punctatus*, y la polilla de las abejas, *Galleria mellonella* (Lu *et al.*, 2008).

55

60

La membrana basal de insectos consiste en proteínas que rodean el tejido y contribuyen a diversas funciones de soporte estructural para barreras para virus. Se evaluaron tres proteínas potenciales degradantes de la membrana basal usando nucleopolyhedrovirus múltiple de *Autographa californica* (AcMNPV). Este baculovirus se modificó por ingeniería genética para expresar dos metaloproteasas de vertebrados, estromelisinina de rata y gelatinasa A humana,

65

así como la catepsina L de la mosca de la fruta, ScathL. La proteasa ScathL demostró la mejor actividad de baculovirus. La mediana del tiempo de supervivencia de las larvas del gusano de la yema del tabaco se redujo en 50 % en comparación con larvas infectadas de tipo silvestre (Harrison y Bonning, 2001). Estos datos apoyan la idea de que las proteasas expresadas en virus tienen la capacidad de acceder a la membrana basal de insectos, que actúa en general como una barrera para virus. Un informe previo ha identificado dos proteínas de la membrana basal de discos imaginales de larvas de la mosca de la fruta que son susceptibles de hidrólisis por catepsina L (Homma y Natori, 1996). La proteasa ScathL purificada también era tóxica para diversas plagas de insectos cuando se inyectó en el hemocele. La proteasa purificada demostró melanización, mortalidad y actividad proteasa de la hemolinfa similares en larvas de lepidópteros como se vio en ScathL expresada en infecciones por baculovirus (Li *et al.*, 2008). El daño a la membrana basal está provocado por proteasa ScathL purificada tanto *in vivo* como *in vitro* (Tang *et al.*, 2007; Philip *et al.* 2007).

También se ha mostrado que los artrópodos depredadores contienen proteasas que escinden la membrana basal en su veneno. Un ejemplo es la avispa parasitaria, *Eulophus pennicornis*, en la que se identificaron 3 metaloproteinasas (EpMP1-3) en las glándulas del veneno. Se inyectó EpMP3 recombinante en el hemocele de larvas de *Lacanobia oleracea* y dio lugar a una mortalidad significativa, o alteró el desarrollo y el crecimiento en larvas supervivientes (Price *et al.*, 2009). Las ninfas soldado de áfidos sociales producen una proteasa de catepsina B tóxica (cisteína proteasa) en sus intestinos. La proteasa se secreta por vía oral en los enemigos y demuestra actividad insecticida (Kutsukake *et al.*, 2008).

Se ha mostrado que una proteasa aislada de la bacteria, *Xenorhabdus nematophilia*, suprime péptidos antibacterianos implicados en la respuesta inmunitaria de los insectos, haciendo al insecto susceptible al proceso patógeno (Caldas *et al.*, 2002). Se ha mostrado que la enterobacteria, *Photorhabdus luminescense*, es patógena para un amplio espectro de insectos. La secuencia genómica de esta bacteria identificó genes relacionados con la toxicidad, incluyendo proteasas (Duchaud *et al.*, 2003).

El uso de proteasas como insecticidas también ha sido de interés para modificaciones de plantas. Las proteasas que degradan la membrana basal se han caracterizado y modificado por ingeniería genética para protocolos insecticidas transgénicos, con el objetivo de desarrollar plantas transgénicas que sean resistentes a plagas de insectos (patente de los Estados Unidos n.º 6.673.340, Harrison y Bonning, 2004). Se ha mostrado que las proteasas en el intestino de insectos afectan al impacto de proteínas insecticidas Cry de *Bacillus thuringiensis*. Algunas proteasas activan proteínas Cry procesándolas a de una protoxina a una forma tóxica. Las toxinas de insectos se han modificado para comprender sitios de activación proteolítica con el objetivo de incorporar esta modificación a plantas, células vegetales y semillas transformadas. La escisión de estos sitios por la proteasa del intestino de insecto da lugar a una toxina de insecto activa dentro del intestino del animal nocivo (patente de los Estados Unidos n.º 7.473.821, Abad *et al.*, 2009).

Actividad insecticida de quitinasas

Las quitinasas facilita la actividad insecticida al perforar el revestimiento del intestino medio de los insectos y degradar la cutícula de los insectos. La degradación de estas membranas expone los insectos a patógenos, a otros compuestos insecticidas y/o a defensas de las plantas.

Las quitinasas hidrolizan la quitina estructural, un homopolímero lineal de 2-acetamido-2-desoxi-D-glucopiranosido, unido mediante enlaces β -1 \rightarrow 4, que es un componente del exoesqueleto y el revestimiento del intestino de los insectos. Las quitinasas se clasifican como glucosil hidrolasas de la familia 18 o 19. Las quitinasas de la familia 18 están extendidas, encontrándose en bacterias, plantas y animales; aunque las quitinasas de la familia 19 se encuentran principalmente en plantas (Henrissat y Bairoch, 1993). En insectos, las quitinasas desempeñan una función en la muda (Samuels y Reynolds, 1993, Merzendorfer y Zimoch, 2003).

Las quitinasas por sí solas muestran actividad insecticida. Se descubrió que la quitinasa de *Serretia marcenscens* era tóxica para larvas de *Galleria mellonella* de séptima fase (Lysenko, 1976). Se ha mostrado que las plantas transgénicas que expresan quitinasas de insectos tienen mayor resistencia a plagas de insectos. Se transformaron plantas de tabaco con ADNc que codificaba una quitinasa de *Manduca sexta*. Se infestaron hojas de estas plantas transgénicas con larvas de *Heliothis virescens*. Después de 3 semanas se descubrió que las hojas positivas para quitinasa tenían menos biomasa larvaria y daño alimentario que las hojas negativas para quitinasa. Es posible que la actividad de las quitinasas haga a los insectos más susceptibles a las defensas vegetales (Ding, *et al.*, 1998).

Las cutículas de insectos proporcionan una barrera física para proteger al insecto de patógenos u otros riesgos ambientales y están compuestas principalmente de quitina (Kramer, *et al.*, 1995). Hongos entomopatógenos *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, *Beauveria amorpha*, *Verticillium lecanii* y *Aspergillus flavus* secretan todas quitinasas para degradar la cutícula y entrar en el insecto hospedador (St Leger, *et al.*, 1986, 1992, Campos, *et al.* 2005). Según Kim, *et al.*, los sobrenadantes que contenían quitinasa de *Beauveria bassiana* eran tóxicos para adultos de *Aphis gossypii*. Sin embargo, cuando estos sobrenadantes se trataron con un exceso de quitina con un exceso de quitina para inhibir la actividad de las quitinasas fúngicas, esta mortalidad se redujo significativamente, lo que sugiere que la quitinasa desempeña una función integral en la degradación de la cutícula y para facilitar la infección (Kim, *et al.* 2010). También se han aislado quitinasas del veneno de la avispa endoparasitaria *Chelonus* sp., donde posiblemente ayuden a que el veneno penetre en las defensas de la presa protegida por quitina (Krishnan, *et al.*,

1994).

La membrana peritrófica, que reviste el intestino medio del insecto, es otra barrera compuesta principalmente por quitina que protege a los insectos de patógenos. Cualquier enzima que pueda perforar esta membrana tiene potencial como bioinsecticida (Wang y Granados, 2001). Hubner, *et al.* demostraron que los parásitos palúdicos secretan quitinasas para penetrar en la membrana peritrófica en mosquitos (Hubner, *et al.*, 1991), y Shahabuddin, *et al.* confirmaron que la inhibición de la quitinasa con alosamidina es suficiente para evitar que el parásito palúdico *Plasmodium gallinaceum* cruce la membrana peritrófica de *Anopheles freeborni*. Asimismo, la adición de quitinasa exógena de *Streptomyces griseus* durante el desarrollo del intestino medio de *Anopheles freeborni* evitó la formación de la membrana peritrófica (Shahabuddin, *et al.*, 1993). Esto demuestra que las quitinasas pueden degradar la membrana peritrófica. Regev, *et al.* usaron *E. coli* para expresar endoquitinasa ChiA de *Serratia marcescens* y confirmaron con microscopía electrónica que las larvas de *Spodoptera littoralis* expuestas a la endoquitinasa presentaron perforaciones en la membrana peritrófica (Regev, *et al.*, 1996).

Debido a la capacidad de la quitinasa para perforar la membrana peritrófica, también se ha mostrado que las endoquitinasas aumentan la actividad insecticida de *Bacillus thuringiensis* (Bt). Las larvas de *Choristoneura fumiferana* criadas con *Agies balsamea* tratada con una mezcla de formulación comercial diluida de Bt y quitinasa murieron más rápidamente que las larvas criadas con hojas solo con Bt (Smirnoff, 1973). Una mezcla de una baja concentración de Bt y quitinasa de *S. marcescens* también dio lugar a mayor mortalidad de larvas de *Spodoptera littoralis* que Bt solo (Sheh *et al.*, 1983). Se cree que este efecto sinérgico se debe a la perforación del revestimiento peritrófico del intestino del insecto por la quitinasa, lo que facilita la penetración de esporas de Bt en el insecto. (Smirnoff, 1973).

Yen-Tc, una proteína de tipo ABC que es necesario y suficiente para la entomopatogenia de *Yersinia entomophaga* en el insecto *Costelytra zealandica*, contiene dos quitinasas de la familia 18, lo que lo convierte en el primer complejo de toxinas insecticidas identificado que incorpora quitinasas. Se plantea la hipótesis de que las quitinasas son responsables de la degradación de la membrana peritrófica y exposición de las células epiteliales del intestino medio a la toxina. Sin embargo, las quitinasas pueden estar activas solo en regiones del intestino medio con un pH relativamente neutro (Busby, 2012).

Las quitinasas también son integrales para la actividad de algunos virus de insectos. Hatwin, *et al.* crearon mutantes del nucleopolyhedrovirus de *Autographa californica* (AcMNPV) que carecían del gen de la quitinasa. Habitualmente, este virus provoca el licuado de las larvas del hospedador, lo que facilita la propagación del virus. No se produjo licuado cuando las larvas de *Trichoplusia ni* se infectaron con el virus negativo para quitinasa. También se confirmó que la quitinasa de AcMNPV está activa en las condiciones alcalinas del intestino medio del insecto (Hatwin, *et al.* 1997). Se descubrió que una versión recombinante del mismo nucleopolyhedrovirus de *Autographa californica* que expresaba una quitinasa de *Haemaphysalis longicornis* tenía actividad bioacaricida contra ninfas de *Haemaphysalis longicornis* (Assegna, *et al.* 2006).

Los genes de tipo *Rhs* codifican toxinas insecticidas

La familia génica de *rhs* (punto caliente de reordenamiento) se identificó por primera vez en *E. coli*. Estos genes confieren reordenamientos cromosómicos mediante intercambio homólogo (Lin *et al.*, 1984). Son de 2 a 12 kb de tamaño y presentan un núcleo largo con una punta corta. Las secuencias del núcleo son ricas en GC y están muy conservadas, pero las secuencias de la punta son pobres en GC y muy variables. Codifican proteínas que tienen un dominio de núcleo grande y un dominio de punta C-terminal. El dominio de núcleo proteico es hidrófilo y contiene repeticiones de YD (Jackson *et al.*, 2009). Las proteínas Rhs son capaces de interactuar con superficies celulares bacterianas y unirse con ligandos específicos (Wang *et al.*, 1998). Aunque la función de las proteínas Rhs sigue siendo desconocida (Hill *et al.*, 1994), la estructura es importante porque las repeticiones de YD y secuencias muy conservadas se asemejan a *rhs* y genes de tipo *rhs* que codifican toxinas insecticidas producidas por bacterias.

Photorhabdus luminescens es un simbionte mutualista de los nematodos de la familia *Heterorhabditae*. El nematodo infecta al insecto e inyecta la bacteria en el hemocele del insecto. La bacteria secreta después toxinas que matan al insecto (Frost *et al.*, 1997). Bowen *et al.* (1998) purificaron una proteína de alto peso molecular asociada con toxicidad insecticida oral e inyectable que se dirige a insectos. En otro estudio, Bowen *et al.* (1998) usaron cromatografía líquida de alto rendimiento para separar esta proteína en cuatro complejos de toxina (tc) denominados Tca, Tcb, Tcc y Tcd codificados por los loci *tc* (Bowen *et al.*, 1998). Waterfield *et al.* (2001) analizaron la expresión recombinante de los genes *tc* en *E. coli* para entender la toxicidad oral de proteínas Tc. Descubrieron que sin homólogos de tipo *tccC*, no podían recuperar la toxicidad oral en *E. coli*. Estos autores concluyeron que TccC está implicado en la activación de la secreción de toxinas. Asimismo, un análisis de secuencia de aminoácidos reveló que TccC y las proteínas de tipo TccC tiene un núcleo muy conservado y extensión muy variable. Esta estructura tiene semejanza con elementos de tipo *rhs* (Waterfield NR, Bowen DJ, Fetherston JD, Perry RD y ffrench-Constant, RH, 2001). Esta similitud sugiere que las proteínas de tipo TccC y Rhs comparten una función antigua en la movilidad y activación para la familia *Enterobacteriaceae* (ffrench-Constant, R *et al.*, 2003).

Otro microbio, *Serratia entomophila*, tiene actividad insecticida que ataca a *Costelytra zealandica* y provoca la enfermedad del ámbar (Grimont *et al.*, 1988). La virulencia de *S. entomophila* está ligada a un plásmido grande

denominado plásmido asociado a enfermedad del ámbar (pADAP) (Glare *et al.*, 1993). Hurst *et al.* analizaron la mutagénesis y la secuencia de nucleótidos de pADAP para entender cómo confiere patogenicidad a *Costelytra zealandica*. Descubrieron que pADAP codifica tres genes responsables de los síntomas de la enfermedad del ámbar, *sepA*, *sepB* y *sepC*. Los tres genes son necesarios para la patogenicidad debido a que una mutación en estos genes anula la enfermedad del ámbar. Ilustraron que las proteínas codificadas por los genes *sep* son similares a las proteínas codificadas o los ejemplos de toxinas insecticidas de *P. luminescens*. Por ejemplo, los primeros 680 aminoácidos de SepC y TccC muestran una fuerte similitud. Asimismo, esta región se asemeja a los elementos *rhs* de *E. coli*. El gen *sepC* es más pequeño que los elementos Rhs, pero codifica un núcleo proteico hidrófilo con nueve variantes peptídicas de Rhs. En función de la similitud entre los genes *sep* y *tc*, Hurst *et al.* concluye que estos productos son parte de un nuevo grupo de toxinas insecticidas (Hurst *et al.*, 2000).

Harada *et al.* descubrieron que, *Pantoea stewartii* ssp. DC283 es un patógeno agresivo que infecta áfidos (Harada *et al.*, 1996). El áfido ingiere la bacteria y DC283 es capaz de agregarse en el intestino y provoca la muerte del áfido. Stavrinides *et al.* realizaron una exploración de mutagénesis y descubrieron que el locus *ucp1* (you cannot pass) es responsable de la virulencia de DC283. El análisis de la secuencia del gen *ucp1* reveló similitudes con la familia de proteínas Rhs. El gen *ucp1* es más pequeño que los genes que codifican proteínas Rhs/YD y no tiene una repetición de YD de unión a ligando, pero tiene núcleos 5' conservados, extremos 3' no homólogos y es una proteína unida a membrana. Estas similitudes estructurales sugieren que los colonizadores vegetales entéricos tienen la capacidad genética para colonizar insectos hospedadores. Asimismo, las similitudes entre los genes *ucp1* y *rhs* sugieren que los genes de tipo *rhs* tienen posible actividad insecticida (Stavrinides *et al.*, 2010).

A pesar de estas proteínas conocidas, es posible que los insectos puedan desarrollar resistencia a plantas que expresan estos genes conocidos. Por consiguiente, existe la necesidad de encontrar nuevas proteínas que tengan actividades insecticidas.

Sumario

La presente divulgación proporciona la secuencia de nucleótidos de proteínas insecticidas de la bacteria *Chromobacterium subtsugae*. Se describe el aislamiento y la caracterización parcial de esta bacteria, por ejemplo, en la patente de los Estados Unidos n.º 7.244.607. Se proporcionan adicionalmente secuencias de aminoácidos de polipéptidos codificados por las proteínas insecticidas de *Chromobacterium subtsugae*.

La invención se refiere a una célula vegetal que comprende un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID NO: 1, 2 o 3.

La invención se refiere a una composición insecticida que comprende un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID NO: 1, 2 o 3, un vehículo, diluyente o adyuvante y al menos una de una proteína insecticida o una moléculas de ARN bicatenario.

La invención se refiere a una semilla o un agente de recubrimiento de semilla que comprende un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID NO: 1, 2 o 3.

La invención se refiere a un método para modular la infestación por plagas en una planta que comprende presentar al insecto una cantidad eficaz del polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID NO: 1, 2 o 3.

La invención se refiere a un método para producir una planta plaguicida resistente a insectos que comprende la etapa de transformar un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID NO: 1, 2 o 3, teniendo el polipéptido la secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID NO: 1, 2 o 3 en una célula vegetal.

La presente divulgación proporciona ácidos nucleicos aislados (p. ej., ADN, RNA, análogos de ácidos nucleicos) que comprenden secuencias de proteínas insecticidas, secuencias génicas, fragmentos de las mismas y/o variantes mutantes. También se proporcionan vectores de ácidos nucleicos (p. ej., vectores plasmídicos, vectores víricos), incluyendo vectores de expresión, que comprenden ácidos nucleicos que tienen secuencias génicas de *C. subtsugae* y/o fragmentos de las mismas. Los vectores bacterianos ilustrativos incluyen, pero sin limitación, *Agrobacterium tumefaciens*, *Rhizobium sp.* NGR234, *Sinorhizobium meliloti* y *Mesorhizobium loti*.

Los vectores víricos ilustrativos incluyen, pero sin limitación, virus del mosaico de la coliflor (CaMV), virus del pardeamiento temprano del guisante (PEBV), virus del moteado de las vainas (BPMV), virus del mosaico del pepino (CMV), virus esférico latente de la manzana (ALSV), virus del mosaico del tabaco (TMV), virus X de la patata, virus del mosaico del bromo (BMV) y virus del mosaico estriado de la cebada (BSMV).

Se desvelan en el presente documento células transfectadas con los ácidos nucleicos o vectores anteriores. Dichas células pueden ser células vegetales, células de insecto, células de mamífero, células bacterianas o células fúngicas (p. ej., levadura).

También se proporcionan plantas que comprenden células (vegetales o de otro tipo) que se han transfectado con los ácidos nucleicos o vectores anteriores, semillas de dichas plantas y la descendencia de dichas plantas. Las células bacterianas transfectadas pueden incluir agrobacterias (p. ej., *Agrobacterium tumefaciens*), *Rhizobium*, *Sinorhizobium meliloti* y *Mesorhizobium loti*. También se proporcionan vectores de insectos (p. ej., *Homalodisca vitripennis*) que comprenden vectores de ácido nucleico que comprenden en sí mismos secuencias de *C. subtsugae*.

También se desvelan en el presente documento polipéptidos codificados por los genes de *C. subtsugae*. También se proporcionan fragmentos funcionales de polipéptidos de *C. subtsugae* y variantes sustituidas de manera conservativa de polipéptidos de *C. subtsugae*.

También se desvelan en el presente documento plantas que comprenden uno o más ácidos nucleicos aislados que comprenden secuencias génicas de *C. subtsugae* y/o fragmentos de las mismas. Estos ácidos nucleicos aislados pueden estar presentes en el exterior de la planta o internamente dentro de células o entre células.

También se desvelan en el presente documento plantas que comprenden uno o más vectores de ácido nucleico, en donde dicho vector o vectores comprenden secuencias génicas de *C. subtsugae* y/o fragmentos de las mismas. Dichos vectores pueden estar presentes en el exterior de la planta o de manera interna.

En más realizaciones adicionales, se proporcionan plantas que comprenden uno o más polipéptidos de *C. subtsugae*. Dichos polipéptidos de *C. subtsugae* pueden estar presentes en el exterior de la planta o de manera interna.

También se proporcionan plantas que comprenden uno o más fragmentos funcionales y/o una o más variantes sustituidas de manera conservativa de un polipéptido o polipéptidos de *C. subtsugae*. Dichos fragmentos y/o variantes sustituidas de manera conservativa pueden estar presentes en el exterior de la planta o de manera interna.

También se proporciona la descendencia de las plantas anteriormente mencionadas. Además, se proporcionan semillas de las plantas anteriormente mencionadas y de su descendencia.

También se desvelan en el presente documento métodos para combatir plagas; p. ej., métodos para modular la infestación por plagas en una planta. Dichas plagas pueden ser, por ejemplo, insectos, hongos, nematodos, ácaros, polillas o áfidos. Los métodos incluyen la aplicación de un ácido nucleico que comprende una secuencia génica de *C. subtsugae* o un fragmento de la misma a una planta, de manera interna o externa. Los métodos adicionales incluyen la aplicación de un polipéptido de *C. subtsugae*, o fragmento del mismo, o variante sustituida de manera conservativa del mismo, a una planta, de manera interna o externa.

También se proporcionan composiciones insecticidas que comprenden ácidos nucleicos y/o polipéptidos codificados por los genes de *C. subtsugae*. Dichas composiciones pueden incluir opcionalmente otros insecticidas o plaguicidas, bien de origen natural o bien artificiales.

Descripción detallada

La práctica de la presente divulgación emplea, a menos que se indique otra cosa, métodos habituales y técnicas convencionales en los campos de la agricultura, la biología molecular de plantas, la entomología, la biología celular, la biología molecular, la bioquímica, el ADN recombinante y campos relacionados como se encuentran dentro de la experiencia de la técnica. Dichas técnicas se describen en la bibliografía y están disponibles, por lo tanto, para los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, Alberts, B. *et al.*, "Molecular Biology of the Cell", 5ª edición, Garland Science, Nueva York, NY, 2008; Voet, D. *et al.* "Fundamentals of Biochemistry: Life at the Molecular Level", 3ª edición, John Wiley & Sons, Hoboken, NJ, 2008; Sambrook, J. *et al.*, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 3ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001; Ausubel, F. *et al.*, "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, Nueva York, 1987 y actualizaciones periódicas; Glover, DNA Cloning: A Practical Approach, volúmenes I y II, IRL Press (1985), volumen III, IRL Press (1987); Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning, John Wiley & Sons (1984); Rigby (ed.), La serie "Genetic Engineering" (Academic Press); Setlow y Hollaender (eds.), La serie "Genetic Engineering: Principles and Methods", Plenum Press; Gait (ed.), Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach, IRL Press (1984, 1985); Eckstein (ed.) Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, IRL Press (1991); Hames y Higgins, Nucleic Acid Hybridization: A Practical Approach, IRL Press (1985); Hames y Higgins, Transcription and Translation: A Practical Approach, IRL Press (1984); B. Buchanan, W. Grissem y R. Jones (eds.) "Biochemistry and Molecular Biology of Plants", Wiley (2002) y la serie "Methods in Enzymology", Academic Press, San Diego, CA.

Cuando se proporciona un intervalo de valores, se entiende que cada valor intermedio, hasta el décimo de la unidad del límite inferior salvo que el contexto indique claramente lo contrario, entre el límite superior e inferior de ese intervalo y cualquier otro valor declarado o intermedio en el intervalo indicado, está incluido en el mismo. También se incluyen intervalos menores. Los límites superiores e inferiores de estos intervalos menores también se incluyen en los mismos, sujetos a cualquier límite específicamente excluido en el intervalo indicado.

A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento

tienen el mismo significado que el que entiende habitualmente un experto habitual en la materia a la que pertenece la presente invención. Aunque también pueden usarse en la puesta en práctica o el ensayo de la presente invención cualquier método y material similar o equivalente a los que se describen en el presente documento, a continuación se describen los métodos y materiales preferidos.

5 Cabe destacar que, como se usan en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un/a", y "el/la" incluyen referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

10 Como se usa en el presente documento, el término "construcción" significa cualquier molécula polinucleotídica recombinante tal como un plásmido, cósmido, virus, molécula polinucleotídica que se replica de forma autónoma, fago o molécula polinucleotídica de ADN o ARN monocatenario o bicatenario, lineal o circular, obtenidas de cualquier fuente, con capacidad de integración genómica o replicación autónoma, que comprende una molécula polinucleotídica en la que una o más moléculas polinucleotídicas se han unido de manera funcionalmente operativa, es decir, unidas operativamente.

15 Como se usa en el presente documento, la expresión "unido operativamente" se refiere a una primera molécula unida a una segunda molécula, en donde las moléculas están dispuestas de manera que la primera molécula afecta a la función de la segunda molécula. Las dos moléculas pueden ser o no parte de una única molécula contigua y pueden ser o no adyacentes. Por ejemplo, un promotor está unido operativamente a una molécula polinucleotídica transcribible si el promotor modula la transcripción de la molécula polinucleotídica transcribible de interés en una célula.

20 Las construcciones pueden incluir cualquier promotor o líder conocido en la técnica. Por ejemplo, un promotor puede estar unido operativamente a un líder 5' heterólogo no traducido tal como uno derivado de un gen de la proteína de choque térmico (véase, por ejemplo, patente de los Estados Unidos n.º 5.659.122 y patente de los Estados Unidos n.º 5.362.865). Como alternativa, un líder puede estar unido operativamente a un promotor heterólogo, tal como el promotor de transcrito de 35S del virus del mosaico de la coliflor (véase, patente de los Estados Unidos n.º 5.352.605).

25 Como se usa en el presente documento, la expresión "molécula polinucleotídica transcribible" se refiere a cualquier molécula de ADN capaz de transcribirse en una molécula de ARN, incluyendo, pero sin limitación, las que tienen secuencias codificantes de proteínas (SEQ ID NO: 4-6) y las que tienen secuencias útiles para la supresión génica. Un "transgén" se refiere a una molécula polinucleotídica transcribible heteróloga para una célula hospedadora y/o una molécula polinucleotídica transcribible incorporada artificialmente en el genoma de una célula hospedadora.

30 Un promotor puede estar unido operativamente a una molécula polinucleotídica transcribible que es heteróloga con respecto a la molécula promotora. Como se usa en el presente documento, el término "heterólogo" se refiere a la combinación de dos o más moléculas polinucleotídicas cuando dicha combinación no se encontraría normalmente en la naturaleza. Por ejemplo, las dos moléculas pueden obtenerse de diferentes especies y/o las dos moléculas pueden obtenerse de diferentes genes, p. ej., diferentes genes de la misma especie o los mismos genes de diferentes especies. Por tanto, un promotor es heterólogo con respecto a un polinucleótido transcribible unido operativamente si dicha combinación normalmente no se encuentra en la naturaleza, es decir, esa molécula polinucleotídica transcribible no se produce de forma natural unida operativamente en combinación con esa molécula promotora.

35 La molécula polinucleotídica transcribible puede ser en general cualquier molécula de ADN para la que se desea la expresión de un transcrito de ARN. Dicha expresión de un transcrito puede dar lugar a la traducción de la molécula de ARNm resultante y, por tanto, la expresión de proteínas. Como alternativa, una molécula polinucleotídica transcribible puede diseñarse para provocar en última instancia una expresión disminuida de un gen o proteína específico que puede potenciar la expresión de las SEQ ID NO: 1-3. Esto puede lograrse usando una molécula polinucleotídica transcribible que esté orientada en la dirección antisentido. Un experto habitual en la materia está familiarizado con el uso de dicha tecnología antisentido. En resumen, a medida que se transcribe la molécula polinucleotídica transcribible antisentido, el producto de ARN se hibrida con y secuestra una molécula de ARN complementaria en el interior de la célula. Esta molécula de ARN bicatenario no se puede traducir en una proteína mediante la maquinaria de traducción de la célula y se degrada en la célula. Cualquier gen puede regularse negativamente de esta manera.

55 Polinucleótidos y oligonucleótidos

Un polinucleótido es un polímero de nucleótidos y se entiende que el término abarca polinucleótidos más pequeños (fragmentos) generados por fragmentación de polinucleótidos mayores. Las expresiones polinucleótido y ácido nucleico abarcan tanto ARN como ADN, así como polinucleótidos y ácidos nucleicos monocatenarios y bicatenarios. Los polinucleótidos también incluyen polinucleótidos y ácidos nucleicos modificados, que contienen modificaciones de la base, el azúcar o los grupos fosfato tales como se conocen en la técnica.

60 Un oligonucleótido es un ácido nucleico corto, en general ADN y en general monocatenario. En general, un oligonucleótido será menor de 200 nucleótidos, más en particular, menor de 100 nucleótidos, muy en particular, 50 nucleótidos o menos.

65 Se conocen en la técnica bases y análogos de bases modificados, p. ej., los que pueden formar pares de bases de

Hoogsteen y de Hoogsteen inversos con las bases de origen natural. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, 8-oxo-adenosina, pseudoisocitidina, 5-metil citidina, inosina, 2-aminopurina y diversos derivados de pirrolo y pirazolopirimidina. De manera similar, los restos o análogos de azúcar modificados, por ejemplo, 2'-O-metilribosa o cadenas principales de ácido nucleico peptídico, también pueden formar un componente de una base o análogo de base modificado. Véase, por ejemplo, Sun y Helene (1993) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 3: 345-356. Las macromoléculas no nucleotídicas capaces de realizar cualquier tipo de interacción específica de secuencia con un polinucleótido son útiles en los métodos y las composiciones desvelados en el presente documento. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, ácidos nucleicos peptídicos, agentes de unión al surco menor y antibióticos. Están disponibles en la técnica nuevas bases modificadas, análogos de bases, azúcares modificados, análogos de azúcares, fosfatos modificados y análogos de fosfato capaces de participar en la formación de dobles o triples cadenas y son útiles en los métodos y composiciones desvelados en el presente documento.

Homología e identidad de ácidos nucleicos y polipéptidos

"Homología" o "identidad" o "similitud" como se usa en el presente documento en el contexto de ácidos nucleicos y polipéptidos se refiere a la relación entre dos polipéptidos o dos moléculas de ácido nucleico basada en un alineamiento de las secuencias de aminoácidos o secuencias de ácido nucleico, respectivamente. Cada una de la homología y la identidad se pueden determinar comparando una posición en cada secuencia que se puede alinear para fines de comparación. Por ejemplo, una "secuencia de referencia" puede compararse con una "secuencia de ensayo". Cuando una posición en la secuencia de referencia está ocupada por la misma base o aminoácido en una posición equivalente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición; cuando la posición equivalente está ocupada por un resto de aminoácido similar (p. ej., similar en su naturaleza estérica y/o electrónica), entonces las moléculas pueden denominarse homólogas (similares) en esa posición. La relación de dos secuencias, cuando se expresa como un porcentaje de homología/similitud o identidad, está en función del número de aminoácidos idénticos o similares en posiciones compartidas por las secuencias que se comparan. Al comparar dos secuencias, la ausencia de restos (aminoácidos o ácidos nucleicos) o presencia de restos extra, en una secuencia en comparación con la otra, también reduce la identidad y homología/similitud.

Como se usa en el presente documento, el término "identidad" se refiere al porcentaje de restos de nucleótidos o aminoácidos idénticos en dos o más secuencias cuando las secuencias se alinean para maximizar secuencias coincidentes, es decir, teniendo en cuenta huecos e inserciones. La identidad puede calcularse fácilmente mediante métodos conocidos, incluyendo, pero sin limitación, los descritos en *Computational Molecular Biology*, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, Nueva York, 1988; *Biocomputing: Informatics and Genome Projects*, Smith, D. W., ed., Academic Press, Nueva York, 1993; *Computer Analysis of Sequence Data, Parte I*, Griffin, A. M., y Griffin, H. G., eds., Humana Press, Nueva Jersey, 1994; *Sequence Analysis in Molecular Biology*, von Heinje, G., Academic Press, 1987; y *Sequence Analysis Primer*, Gribskov, M. y Devereux, J., eds., M Stockton Press, Nueva York, 1991; y Carillo, H. y Lipman, D., *SIAM J. Applied Math.*, 48: 1073 (1988). Los métodos para determinar la identidad están diseñados para proporcionar el mayor grado de coincidencia entre las secuencias ensayadas. Por otra parte, los métodos para determinar la identidad se codifican en programas informáticos disponibles públicamente. Los métodos de programas informáticos para determinar la identidad entre dos secuencias incluyen, pero sin limitación, el paquete de programas GCG (Devereux *et al.* (1984) *Nucleic Acids Research* 12: 387), BLASTP, BLASTN y FASTA (Altschul *et al.* (1990) *J. Molec. Biol.* 215: 403-410; Altschul *et al.* (1997) *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402). El programa BLAST X está disponible públicamente en el NCBI y otras fuentes. Véase, p. ej., BLAST Manual, Altschul, S., *et al.*, NCBI NLM NIH Bethesda, Md. 20894; Altschul *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215: 403-410. También puede usarse el algoritmo de Smith-Waterman bien conocido para determinar la identidad.

Para la comparación de secuencias, normalmente una secuencia actúa como secuencia de referencia, con la que se comparan una o más secuencias de prueba. Las secuencias se alinean en general para máxima correspondencia sobre una región designada, p. ej., una región de al menos aproximadamente 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65 o más aminoácidos de longitud, y la región puede ser tan larga como la longitud completa de la secuencia de aminoácidos de referencia o la secuencia de nucleótidos de referencia. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de prueba y referencia se introducen en un programa informático, se designan las coordenadas de subsecuencia, si fuera necesario, y se designan los parámetros del programa del algoritmo de secuencias. El algoritmo de comparación de secuencias calcula entonces el porcentaje de identidad de secuencia para la o las secuencias de prueba respecto a la secuencia de referencia, basándose en los parámetros del programa designados.

Los ejemplos de algoritmos que son adecuados para determinar el porcentaje de identidad de secuencia incluyen los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, que se describen en Altschul *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215: 403-410 y Altschul *et al.* (1977) *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402, respectivamente. El programa informático para realizar análisis de BLAST está disponible públicamente a través del Centro Nacional para la Información Biotecnológica en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Más algoritmos ilustrativos incluyen ClustalW (Higgins *et al.* (1994) *Nucleic Acids Res.* 22: 4673-4680), disponibles en www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/index.html.

La identidad de secuencia entre dos ácidos nucleicos también puede describirse con respecto a renaturalización, reasociación o hibridación de dos polinucleótidos entre sí, mediadas por formación de pares de bases. La hibridación

entre polinucleótidos continúa según propiedades de formación de pares de bases conocidas y reconocidas en la técnica, de modo que la adenina se empareja con timina o uracilo y la guanina se empareja con citosina. La propiedad de un nucleótido que permite que forme un par de bases con un segundo nucleótido se denomina complementariedad. Por tanto, la adenina es complementaria tanto de timina como de uracilo, y viceversa; de manera similar, la guanina es complementaria de citosina y viceversa. Se dice que un oligonucleótido o polinucleótido que es complementario a lo largo de su longitud completa con una secuencia diana es perfectamente complementario, perfectamente coincidente o completamente complementario de la secuencia diana, y viceversa. Dos polinucleótidos pueden tener secuencias relacionadas, en donde la mayoría de bases en las dos secuencias son complementarias, pero una o más bases no son complementarias, o están desapareadas. En tal caso, se puede decir que las secuencias son sustancialmente complementarias entre sí. Si dos secuencias polinucleotídicas son tales que son complementarias en todas las posiciones de nucleótidos excepto una, las secuencias tienen un único desapareamiento de nucleótidos entre sí.

La expresión "sustancialmente idénticas" se refiere a la identidad entre una primera secuencia de aminoácidos que contiene un número suficiente o mínimo de restos de aminoácidos que son i) idénticos a, o ii) sustituciones conservadoras de, restos de aminoácidos alineados en una segunda secuencia de aminoácidos de modo que las primera y segunda secuencias de aminoácidos comparten un dominio estructural común y/o actividad funcional común. Por ejemplo, las secuencias de aminoácidos que contienen un dominio estructural común que tiene al menos aproximadamente 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 99,5 % de identidad con una secuencia de aminoácidos como se desvela en el presente documento (es decir, SEQ ID NO: 1-3) se denominan sustancialmente idénticas. En el contexto de una secuencia de nucleótidos, la expresión "sustancialmente idénticas" se usa en el presente documento para referirse a una primera secuencia de ácido nucleico que contiene un número suficiente o mínimo de nucleótidos que son idénticos a nucleótidos alineados en una segunda secuencia de ácido nucleico de modo que las primera y segunda secuencias de nucleótidos codifiquen un polipéptido que tiene actividad funcional o estructural común o codifiquen un dominio polipeptídico estructural común o una actividad polipeptídica funcional común.

El término "homología" describe una comparación de base matemática de similitudes de secuencia que se usa para identificar genes o proteínas con funciones o motivos similares. Una secuencia de nucleótidos o aminoácidos (p. ej., una secuencia como se desvela en el presente documento) se usa como una "secuencia de consulta" para realizar una búsqueda en bases de datos públicas para, por ejemplo, identificar otros miembros de la familia, secuencias relacionadas u homólogos. Dichas búsquedas se pueden realizar usando los programas NBLAST y XBLAST (versión 2.0) de Altschul *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215: 403-410. Pueden realizarse búsquedas de nucleótidos BLAST con el programa NBLAST, puntuación = 100, longitud de palabra = 12 para obtener secuencias de nucleótidos homólogas de una secuencia de nucleótidos de referencia. Pueden realizarse búsquedas de aminoácidos BLAST con el programa XBLAST, puntuación = 50, longitud de palabra = 3 para obtener secuencias de aminoácidos homólogas de una secuencia de aminoácidos de referencia. Para obtener alineaciones con huecos con fines de comparación, se puede utilizar Gapped BLAST como se describe en Altschul *et al.* (1997) *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402. Cuando se utilizan los programas BLAST y Gapped BLAST, pueden usarse los parámetros por defecto de los programas respectivos (p. ej., XBLAST y BLAST) (véase la web en: ncbi.nlm.nih.gov).

Los ácidos nucleicos y polinucleótidos de la presente divulgación abarcan los que tienen una secuencia de nucleótidos que es al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 % o al menos 100 % idéntica a cualquiera de las SEQ ID NO: 4-6.

Se conocen en la técnica análogos de nucleótidos y análogos de aminoácidos. Por consiguiente, los ácidos nucleicos (es decir, SEQ ID NO: 4-6) que comprenden análogos de nucleótidos y polipéptidos (es decir, SEQ ID NO: 1-3) que comprenden análogos de aminoácidos también están abarcados por la presente divulgación.

Las moléculas polinucleotídicas transcribibles pueden ser genes de interés agronómico. Como se usa en el presente documento, la expresión "gen de interés agronómico" se refiere a una molécula polinucleotídica transcribible que, cuando se expresa en un tejido vegetal, célula o tipo celular particular, proporciona una característica deseable asociada con la morfología, fisiología, crecimiento, desarrollo, rendimiento, producto, perfil nutricional, resistencia a enfermedades o insectos/plagas y/o tolerancia ambiental o química de la planta. Los genes de interés agronómico incluyen, pero sin limitación, genes de control de insectos codificados por las SEQ ID NO: 4-6 o su proteína asociada SEQ ID NO: 1-3, los que codifican una proteína de producción, una proteína de resistencia a la tensión, una proteína de control del desarrollo, una proteína de diferenciación tisular, una proteína del meristema, una proteína sensible al medio ambiente, una proteína de senescencia, una proteína sensible a hormonas, una proteína de abscisión, una proteína fuente, una proteína sumidero, una proteína de control de las flores, una proteína de semilla, una proteína de resistencia a herbicidas, una proteína de resistencia a enfermedades, una enzima biosintética de ácidos grasos, una enzima biosintética de tocoferol, una enzima biosintética de aminoácidos, una proteína plaguicida o cualquier otro agente, tal como una molécula antisentido o de iARN que se dirige a un gen particular para la supresión para potenciar expresión de proteínas de las SEQ ID NO: 1-3. El producto de un gen de interés agronómico puede actuar en la planta a fin de provocar un efecto en la fisiología o el metabolismo de la planta o puede actuar como un agente plaguicida en la dieta de una plaga que se alimenta de la planta.

Como se usa en el presente documento, "planta de control" significa una planta que no contiene el ADN recombinante que expresaba una proteína que transmite un rasgo mejorado. Una planta de control es para identificar y seleccionar una planta que tenga un rasgo de mejora. Una planta de control adecuada puede ser una planta no transgénica de la línea parental usada para generar una planta transgénica, p. ej., desprovista de ADN recombinante. Una planta de control adecuada puede ser, en algunos casos una descendencia de una línea vegetal transgénica hemocigota que no contiene el ADN recombinante, conocida como una segregante negativa.

Como se usa en el presente documento, un "rasgo mejorado" significa una característica de una planta transgénica que incluye, pero sin limitación, un rasgo agronómico de mejora caracterizado por mejor resistencia a insectos, mejor morfología vegetal, fisiología, crecimiento y desarrollo, rendimiento, mejora nutricional, resistencia a enfermedades o plagas o tolerancia ambiental o química. En aspectos más específicos de la presente invención, el rasgo mejorado se selecciona del grupo que consiste en rasgos mejorados que consisten en mejor eficacia del uso del agua, mejor tolerancia al frío, mayor rendimiento, mejor eficacia del uso del nitrógeno, mejor proteína de la semilla o mejor aceite de la semilla. En un aspecto de la invención, el rasgo mejorado es mejor rendimiento, incluyendo mayor rendimiento en condiciones sin tensión y mayor rendimiento en condiciones de tensión ambiental. Las condiciones de tensión pueden incluir, por ejemplo, sequía, sombra, enfermedad fúngica, enfermedad vírica, enfermedad bacteriana, infestación por insectos, infestación por nematodos, exposición a temperaturas frías, exposición al calor, tensión osmótica, disponibilidad reducida de nutrientes de nitrógeno, disponibilidad reducida de nutrientes de fósforo y alta densidad vegetal. El "rendimiento" puede verse afectado por muchas propiedades, incluyendo, sin limitación, altura de la planta, número de vainas, posición de las vainas en la planta, número de entrenudos, incidencia de vainas rotas, tamaño de grano, eficacia de la nodulación y fijación de nitrógeno, eficacia de la asimilación de nutrientes, resistencia a tensión biótica y abiótica, asimilación de carbono, arquitectura vegetal, resistencia a la caída, porcentaje de germinación de semillas, vigor de la plántula y rasgos juveniles. El rendimiento también puede verse afectado por la eficacia de germinación (incluyendo germinación en condiciones de tensión), tasa de crecimiento (incluyendo tasa de crecimiento en condiciones de tensión), número de mazorcas, número de semillas por mazorca, tamaño de las semillas, composición de la semilla (almidón, aceite, proteína) y características de carga de semilla.

El aumento del rendimiento de una planta puede medirse de varias maneras, incluyendo peso de prueba, número de semillas por planta, peso de las semillas, número de semillas por unidad de área (p. ej., semillas, o peso de las semillas, por acre), bushels por acre, toneladas por acre, toneladas largas por acre, kilo por hectárea. Por ejemplo, el rendimiento del maíz puede medirse como la producción de granos de maíz pelados por unidad de área de producción en bushels por acre o toneladas métricas por hectárea, con frecuencia indicado de manera ajustada para humedad a aproximadamente 15,5 por ciento de humedad. El aumento del rendimiento puede resultar de la mejora de la utilización de compuestos bioquímicos clave tales como nitrógeno, fósforo e hidratos de carbono, o de mejora de las respuestas a tensiones ambientales, tales como frío, calor, sequía, salinidad y ataque por plagas o patógenos.

Sustituciones conservadoras y fragmentos funcionales

Al comparar secuencias de aminoácidos, las posiciones de los restos que no son idénticas pueden diferir en sustituciones de aminoácidos conservadoras. Las sustituciones de aminoácidos conservadoras se refieren a la intercambiabilidad de restos que tienen cadenas laterales similares. Por ejemplo, un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas es glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales de hidroxilo alifático es serina y treonina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen amida es asparagina y glutamina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales aromáticas es fenilalanina, tirosina y triptófano; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales básicas es lisina, arginina e histidina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen azufre es cisteína y metionina. Con respecto a una secuencia polipeptídica de referencia, una secuencia polipeptídica de prueba que difiere solo en sustituciones conservadoras se indica como "variante sustituida de manera conservadora" de la secuencia de referencia.

Un "fragmento funcional" de una proteína, polipéptido o ácido nucleico es una proteína, polipéptido o ácido nucleico cuya secuencia no es idéntica a la proteína, polipéptido o ácido nucleico de longitud completa, pero conserva la misma función que la proteína, polipéptido o ácido nucleico de longitud completa. Un fragmento funcional puede poseer más, menos o el mismo número de restos que la molécula nativa correspondiente y/o puede contener una o más sustituciones de aminoácidos o nucleótidos. Se conocen en la técnica métodos para determinar la función de un ácido nucleico (p. ej., función codificante, capacidad de hibridar con otro ácido nucleico). De manera similar, se conocen métodos para determinar la función proteica. Por ejemplo, la función de unión a ADN de un polipéptido puede determinarse, por ejemplo, mediante ensayos de unión a filtro, de desplazamiento de movilidad electroforética o inmunoprecipitación. Véase Ausubel *et al.*, mencionado anteriormente. La capacidad de una proteína para interactuar con otra proteína puede determinarse, por ejemplo, mediante coimmunoprecipitación, ensayos de dos híbridos o complementación, bien genética o bien bioquímica. Véase, por ejemplo, Fields *et al.* (1989) Nature 340: 245-246; patente de los Estados Unidos n.º 5.585.245 y documento PCT WO 98/44350.

Normalmente, un fragmento funcional conserva al menos 50 % de la actividad o función del polipéptido. En algunas realizaciones, un fragmento funcional conserva al menos 55 %, al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 99 % o 100 % de la actividad

o función del polipéptido.

Un fragmento funcional de un polipéptido puede incluir sustituciones de aminoácidos conservadoras (con respecto a la secuencia polipeptídica nativa) que no alteran sustancialmente la actividad o función del polipéptido. La expresión "sustitución de aminoácidos conservadora" se refiere al agrupamiento de aminoácidos basándose en determinadas estructuras y/o propiedades comunes. Con respecto a estructuras comunes, los aminoácidos pueden agruparse en los que tienen cadenas laterales no polares (glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, metionina, prolina, fenilalanina y triptófano), los que tienen cadenas laterales polares sin carga (serina, treonina, asparagina, glutamina, tirosina y cisteína) y los que tienen cadenas laterales polares con carga (lisina, arginina, ácido aspártico, ácido glutámico e histidina). Un grupo de aminoácidos que contienen cadenas laterales aromáticas incluye fenilalanina, triptófano y tirosina. Están presentes cadenas laterales heterocíclicas en prolina, triptófano e histidina. En el grupo de aminoácidos que contiene cadenas laterales no polares, las que tienen cadenas laterales de hidratos de carbono cortas (glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina) pueden distinguirse de las que tienen cadenas laterales distintas de hidratos de carbono, más largas (metionina, prolina, fenilalanina, triptófano). En el grupo de aminoácidos con cadenas laterales polares con carga, los aminoácidos ácidos (ácido aspártico, ácido glutámico) pueden distinguirse de los que tienen cadenas laterales básicas (lisina, arginina e histidina).

Un método funcional para definir propiedades comunes de aminoácidos individuales es analizar las frecuencias normalizadas de los cambios de aminoácidos entre proteínas correspondientes de organismos homólogos (Schulz, G. E. y R. H. Schirmer, *Principles of Protein Structure*, Springer-Verlag, 1979). Según dichos análisis, pueden definirse grupos de aminoácidos en los que los aminoácidos en un grupo se sustituyen preferentemente entre sí en proteínas homólogas y, por lo tanto, tienen influencia similar en la estructura proteica general (Schulz, G. E. y R. H. Schirmer, mencionado anteriormente). Según este tipo de análisis, la "sustitución de aminoácidos conservadora" se refiere a una sustitución de un resto de aminoácido por otro que comparte propiedades químicas y físicas de la cadena lateral del aminoácido (p. ej., carga, tamaño, hidrofobicidad/hidrofilia). Los siguientes son ejemplos de restos de aminoácidos que comparten determinadas propiedades químicas y/o físicas:

- (i) aminoácidos que contienen un grupo con carga, que consisten en Glu, Asp, Lys, Arg e His,
- (ii) aminoácidos que contienen un grupo con carga positiva, que consisten en Lys, Arg e His,
- (iii) aminoácidos que contienen un grupo con carga negativa, que consisten en Glu y Asp,
- (iv) aminoácidos que contienen un grupo aromático, que consisten en Phe, Tyr y Trp,
- (v) aminoácidos que contienen un grupo de anillo de nitrógeno, que consisten en His y Trp,
- (vi) aminoácidos que contienen un grupo no polar alifático grande, que consisten en Val, Leu e Ile,
- (vii) aminoácidos que contienen un grupo ligeramente polar, que consisten en Met y Cys,
- (viii) aminoácidos que contienen un grupo de restos pequeños, que consisten en Ser, Thr, Asp, Asn, Gly, Ala, Glu, Gln y Pro,
- (ix) aminoácidos que contienen un grupo alifático que consisten en Val, Leu, Ile, Met y Cys, y
- (x) aminoácidos que contienen un grupo hidroxilo que consisten en Ser y Thr.

Determinadas "sustituciones de aminoácidos conservadoras" pueden incluir una sustitución en los siguientes grupos de restos de aminoácidos: gly, ala; val, ile, leu; asp, glu; asn, gln; ser, thr; lys, arg; y phe, tyr.

Por tanto, como se ha ilustrado anteriormente, los expertos en la materia conocen sustituciones de aminoácidos conservadoras y estas pueden realizarse en general sin alterar la actividad o función biológica de la molécula resultante. Los expertos en esta técnica también reconocen que, en general, las sustituciones de aminoácidos individuales en regiones no esenciales de un polipéptido no alteran sustancialmente la actividad biológica. Véase, p. ej., Watson, *et al.*, "Molecular Biology of the Gene", 4ª edición, 1987, The Benjamin/Cummings Pub. Co., Menlo Park, CA, pág. 224.

Los polipéptidos de la presente divulgación abarcan los que tienen 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 o más sustituciones de aminoácidos en comparación con una secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID NO: 1-3, p. ej., sustituciones de aminoácidos conservadoras. Los restos de aminoácidos que pueden sustituirse pueden ubicarse en posiciones de restos que no están muy conservadas. Los expertos habituales en la materia apreciarán que, en función de la ubicación de los sitios activos y/o de la homología con proteínas relacionadas, una proteína tolerará sustituciones, supresiones y/o inserciones en algunos de sus restos de aminoácidos, sin cambios significativos en sus propiedades físicas y químicas.

Los polipéptidos de la presente divulgación abarcan los que tienen una secuencia de nucleótidos que es al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 % o al menos 100 % idéntica a cualquiera de los polipéptidos mostrados en las SEQ ID NO: 1-3.

Supresión de ARN

Los ARN pequeños que regulan la expresión de proteínas incluyen miARN y ARNip-at. Un miARN es un ARN pequeño (normalmente de aproximadamente 21 nucleótidos) que tiene la capacidad de modular la expresión de un gen diana al unirse con ARN mensajero para la proteína diana, lo que conduce a desestabilización del ARN mensajero de la

proteína diana o inhibición de la traducción del ARN mensajero de la proteína diana, lo que da como resultado en última instancia reducción de la proteína diana. El diseño y la construcción de construcciones de ARNip-at y su uso en la modulación de la proteína en células de plantas transgénicas se desvela en Allen y Carrington la publicación de solicitud de patente de los Estados Unidos US 2006/0174380 A1. La expresión o supresión de dichos ARN pequeños son aspectos de la invención que se ilustran convenientemente por referencia al uso de miARN.

Se pueden usar construcciones de ADN recombinante para modificar la actividad de miARN nativos por diversos medios. Al aumentar la expresión de un miARN, p. ej., temporal o espacialmente, se puede potenciar la modulación de la expresión de un gen diana nativo. Un enfoque alternativo de supresión génica para suprimir la expresión de una proteína diana puede incluir el uso de una construcción de ADN recombinante que produce un miARN sintético que se diseña para unirse a un sitio de reconocimiento de miARN nativo o sintético en ARN mensajero para la proteína diana.

Al reducir la expresión de un miARN, la modulación de un gen diana nativo puede disminuirse, lo que da lugar a mejora de la expresión de la proteína diana, tal como las SEQ ID NO: 1-3. De manera más específica, la expresión de una proteína diana puede potenciarse mediante la supresión de la actividad del miARN que se une a un sitio de reconocimiento en el ARN mensajero que se transcribe a partir del gen nativo para la proteína diana. Se pueden diseñar varios tipos de construcciones de ADN recombinante para suprimir la actividad de un miARN.

Por ejemplo, se puede usar una construcción de ADN recombinante que produce una abundancia de ARN con el sitio de reconocimiento de miARN como un señuelo para el miARN nativo que permite que el ARN mensajero endógeno con el sitio de reconocimiento de miARN se traduzca a la proteína diana sin interferencia del miARN nativo. Una construcción de ADN recombinante que produce ARN con un sitio de reconocimiento de miARN modificado, p. ej., con nucleótidos en las posiciones 10 y/u 11 en un sitio de reconocimiento de miARN de 21 unidades que no están emparejados con respecto al miARN nativo, se puede usar para secuestrar miARN expresado de manera nativa, reduciendo de este modo la escisión que se produce normalmente cuando miARN se une a un sitio de reconocimiento. Los nucleótidos no emparejados pueden producirse, p. ej., mediante nucleótidos adicionales entre las posiciones 10 y 11 o mediante sustituciones de los nucleótidos en las posiciones 10 y 11.

Adicionalmente, puede crearse una construcción de ADN recombinante que produce ARN que puede procesarse en plantas a ARN pequeño sintético (tipo miARN) que puede unirse a sitios de reconocimiento de miARN endógeno pero es incapaz de inducir la escisión de ARNm debido a que el ARN pequeño está modificado, por ejemplo, al tener un nucleótido modificado en las posiciones 10 y/u 11 o una supresión que produce una protuberancia entre las posiciones 10 y 11 cuando el ARN pequeño está emparejado con el sitio de reconocimiento de miARN. El ARN pequeño sintético resultante, un bloqueador de escisión, puede reducir la unión de miARN endógeno y bloquear de este modo la escisión de un sitio diana de miARN protegido que potencia la expresión de una proteína diana.

Una construcción de ADN recombinante diseñada para producir un ARN mensajero modificado para la proteína donde el sitio de reconocimiento de miARN nativo se modifica para que sea resistente a la unión de miARN afin que regula el gen nativo también se puede usar para expresar proteína de ARN mensajero heterólogo que ya no está modulado por el miARN nativo.

La actividad de un miARN que regula negativamente una proteína endógena se potencia al mejorar la expresión del miARN o al mejorar la capacidad del miARN para unirse con un ARN que codifica la proteína diana. Un ADN recombinante que codifica un ARN que codifica el miARN o un ARN mensajero sensible a miARN que codifica la proteína en la que se añade un sitio de unión a miARN se diseñan para mejorar la actividad de miARN, lo que da lugar a potenciación de la supresión del ARNm diana y la proteína afin. Se diseñan ADN recombinante que codifica un ARN que codifica un miARN o un ARN sensible a miARN usando métodos desvelados en la publicación de solicitud de patente de los Estados Unidos US 2009/0070898 A1.

Algunos, si no muchos, de los miARN modulan la expresión de múltiples proteínas o rutas bioquímicas, se puede proporcionar a las plantas rasgos mejorados, no tanto por la supresión o mejora de la expresión de una proteína en particular, sino por el cambio de la actividad enzimática en una ruta modulando el nivel de un miARN. Por tanto, se logran aspectos de la presente invención mediante actividad de miARN potenciada resultante del uso en células vegetales de construcciones de ADN recombinante que producen una mejora del nivel de un miARN. Otros aspectos de la presente invención se logran mediante actividad de miARN reducida resultante del uso en células vegetales transgénicas de construcciones de ADN recombinante que producen una reducción del nivel o la actividad de un miARN.

60 **Ácidos nucleicos de *C. subtsugae***

También se proporcionan secuencias de nucleótidos que codifican genes de *C. subtsugae* y secuencias de nucleótidos de moléculas de ARN funcionales (p. ej., ARNr, ARNt) (SEQ ID NO: 4-6). También se proporcionan ácidos nucleicos que comprenden estas secuencias. También se proporcionan fragmentos de secuencias génicas de *C. subtsugae*. Dichos fragmentos son 10 o más, 25 o más, 50 o más, 75 o más, 100 o más, 200 o más, 500 o más o 1000 o más nucleótidos de longitud. También se proporcionan ácidos nucleicos que tienen una secuencia que es 50 %, 55 %, 60

60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 99,9 % idéntica a las secuencias anteriormente mencionadas. Los ácidos nucleicos desvelados en el presente documento pueden ser ADN o ARN y pueden ser monocatenarios o bicatenarios. También se proporcionan ácidos nucleicos que comprenden secuencias de nucleótidos que son complementarias de las secuencias anteriormente mencionadas, así como ácidos nucleicos que hibridan con los ácidos nucleicos mencionados anteriormente en condiciones rigurosas.

La presente descripción también proporciona polinucleótidos que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica cualquiera de las secuencias polipeptídicas desveladas en el presente documento. Dicho polinucleótido tiene una secuencia de nucleótidos que es al menos 70 % (p. ej., al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 % o 100 %) idéntica a una secuencia contigua de un ácido nucleico que codifica cualquiera de los polipéptidos desvelados en el presente documento. El porcentaje de identidad se basa en la más corta de las secuencias comparadas. Pueden emplearse programas conocidos tales como BLASTN (2.0.8) (Altschul *et al.* (1997) Nucl. Acids. Res. 25: 3389-3402) usando parámetros por defecto y sin filtro para realizar una comparación de secuencias. La identidad de secuencia de aminoácidos (p. ej., entre dos polinucleótidos diferentes que codifican secuencias de aminoácidos idénticas) puede ser menor que el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos debido a la degeneración del código genético.

Pueden encontrarse ejemplos de secuencias de ácidos nucleicos en un polinucleótido que codifica un polipéptido de la presente divulgación entre las SEQ ID NO: 4-6. Estas secuencias de ácido nucleico también pueden proporcionarse en un vector de expresión (véase posteriormente).

Polipéptidos y proteínas de *C. subtsugae*

La presente divulgación proporciona las secuencias de aminoácidos de proteínas codificadas por el genoma de *C. subtsugae*, así como polipéptidos que comprenden dichas secuencias de aminoácidos (es decir, SEQ ID NO: 1-3). También se proporcionan fragmentos funcionales y variantes sustituidas de manera conservativa de dichos polipéptidos. Además, también se proporcionan fragmentos de los polipéptidos desvelados en el presente documento que no conservan la función y son útiles, p. ej., como epítomos para la producción de anticuerpos. Dichos fragmentos son 4 o más, 10 o más, 25 o más, 50 o más, 75 o más, 100 o más, 200 o más, 500 o más o 1000 o más aminoácidos de longitud.

La presente divulgación también proporciona un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 98,5 %, 99 %, 99,5 % o 99,9 % idéntica a una secuencia contigua de un polipéptido como se desvela en el presente documento. El porcentaje de identidad se basa en la más corta de las secuencias comparadas. Se conocen en la técnica métodos para determinar el grado de identidad de la secuencia polipeptídica.

Los polipéptidos objeto pueden incluir secuencias de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 1-3 que comprenden secuencias de aminoácidos heterólogas. Dichos polipéptidos pueden ser proteínas de fusión, tales como una proteína de fusión que contiene marcadores epítomícos, marcadores de purificación y/o marcadores detectables. Una proteína de fusión puede incluir opcionalmente una secuencia conectora entre las secuencias heterólogas y la secuencia de aminoácidos de *C. subtsugae*. Se conocen en la técnica métodos para producir proteínas de fusión. Otros elementos heterólogos y proteínas de fusión ilustrativas se describen en más detalle a continuación.

Los polipéptidos ilustrativos que contienen elementos heterólogos pueden incluir marcadores de *myc* y/o His₆ y pueden incluir opcionalmente secuencias conectoras flanqueantes.

Los polipéptidos de la presente divulgación abarcan adicionalmente los que se unen con un polipéptido indicador, p. ej., una proteína fluorescente, y/o se conjugan con una molécula. La molécula conjugada con el polipéptido puede ser una molécula transportadora o un resto que facilite la administración y/o aumente la semivida del polipéptido objeto.

Los polipéptidos de la presente divulgación se pueden producir por cualquier método adecuado, incluyendo métodos recombinantes y no recombinantes (p. ej., síntesis química). El polipéptido objeto puede prepararse por métodos de síntesis en fase sólida conocidos en la técnica, (p. ej., química Fmoc o t-Boc), tales como los descritos en Merrifield (1963) J. Am. Chem. Soc. 85: 2149 y Methods in Molecular Biology, vol 35: Peptide Synthesis Protocols.

Debería observarse que los polipéptidos de la presente divulgación también pueden contener elementos adicionales, tales como un marcador detectable, p. ej., un marcador radioactivo, un marcador fluorescente, un marcador de biotina, un marcador inmunológicamente detectable (p. ej., un marcador de hemaglutinina (HA), un marcador de polihistidina) y similares. Pueden proporcionarse elementos adicionales (p. ej., en forma de polipéptidos de fusión) para facilitar la expresión (p. ej., metionina N-terminal y/o una secuencia señal heteróloga para facilitar la expresión en células hospedadoras) y/o el aislamiento (p. ej., marcador de biotina, marcador inmunológicamente detectable) de los polipéptidos de la divulgación mediante diversos métodos. Los polipéptidos también pueden inmovilizarse opcionalmente en un soporte mediante unión covalente o no covalente.

Puede realizarse aislamiento y purificación de los polipéptidos objeto según métodos conocidos en la técnica. Se

entiende que el término "aislado" significa que un compuesto (p. ej., polipéptido o polinucleótido) está separado de todos o algunos de los componentes que lo acompañan en la naturaleza. "Aislado" también se refiere al estado de un compuesto separado de todos o algunos de los componentes que lo acompañan durante la fabricación (p. ej., síntesis química, expresión recombinante, medio de cultivo y similares).

5 Por ejemplo, un polipéptido según la presente divulgación puede aislarse de un lisado de células que se han modificado genéticamente para expresar el polipéptido objeto, a partir de un medio de cultivo celular o de una mezcla de reacción sintética. El aislamiento puede lograrse adicionalmente mediante purificación por inmovilización, que implica, en general, poner en contacto una muestra con un anticuerpo (opcionalmente inmovilizado) que se une de manera
10 específica con un epítipo del polipéptido, lavar para eliminar el material unido de manera inespecífica y eluir el polipéptido unido de manera específica. El polipéptido aislado puede purificarse adicionalmente mediante diálisis y otros métodos empleados normalmente en la purificación de proteínas, p. ej., cromatografía de quelato metálico, intercambio iónico y exclusión por tamaño.

15 Homólogos

También se desvelan métodos para obtener homólogos de los fragmentos de los genes de *C. subtsugae* desvelados en el presente documento y homólogos de las proteínas codificadas por las ORF desveladas en el presente documento. De manera específica, mediante el uso de las secuencias de nucleótidos y aminoácidos desveladas en el
20 presente documento como una sonda o como cebadores, y técnicas tales como clonación de PCR e hibridación de colonias/placas, un experto en la materia puede obtener dichos homólogos. Dichos homólogos pueden obtenerse de cualquier organismo; p. ej., otra especie de *Chromobacterium* u otras bacterias.

Los homólogos pueden identificarse por comparación de la secuencia de aminoácidos, p. ej., manualmente o mediante
25 el uso de una herramienta informática usando algoritmos de búsqueda basados en homología tales como los conocidos habitualmente y denominados BLAST, FASTA y Smith-Waterman. Un programa de alineación de secuencias local, p. ej., BLAST, puede usarse para buscar en una base de datos de secuencias para encontrar secuencias similares y el valor de expectativa abreviado (valor E) usado para medir la similitud de bases de
30 secuencias. Debido a que un acierto de proteína con el mejor valor E para un organismo en particular puede no ser necesariamente un ortólogo, p. ej., tener la misma función, o ser el único ortólogo, se usa una consulta recíproca para filtrar secuencias con aciertos con valores E significativos para la identificación de ortólogos. La consulta recíproca implica búsqueda de los aciertos significativos frente a una base de datos de secuencias de aminoácidos de los organismos básicos que son similares a la secuencia de la proteína de consulta. Un acierto puede identificarse como
35 un ortólogo, cuando el mejor acierto de la consulta recíproca es la proteína de consulta en sí misma o una proteína codificada por un gen duplicado después de la especiación. Un aspecto adicional de los homólogos codificados por ADN útil en las plantas transgénicas son las proteínas que difieren de una proteína desvelada como resultado de la supresión o inserción de uno o más aminoácidos en una secuencia nativa.

40 Anticuerpos, métodos de detección, equipos

También se proporcionan anticuerpos que se unen de manera selectiva con un fragmento proteico o polipeptídico codificado por los genes de *C. subtsugae* tales como las SEQ ID NO: 1-3. Dichos anticuerpos, además, puede comprender un marcador detectable y/o unirse a un soporte sólido. Dichos anticuerpos incluyen anticuerpos tanto
45 monoclonales como policlonales. También se proporcionan hibridomas que producen los anticuerpos monoclonales descritos anteriormente.

La presente divulgación proporciona métodos para identificar muestras de prueba procedentes de células que expresan una o más de las ORF desveladas en el presente documento u homólogos de las mismas. Dichos métodos comprenden incubar una muestra de prueba con uno o más de los anticuerpos de la presente divulgación o uno o más
50 fragmentos de los genes de *C. subtsugae*, en condiciones que permiten que un experto en la materia determine si la muestra contiene la ORF (o parte de la misma) o producto producido a partir de la misma.

Se proporcionan equipos que contienen los reactivos necesarios para llevar a cabo los ensayos anteriormente descritos. De manera específica, se proporciona en el presente documento un equipo compartimentalizado diseñado
55 para recibir, en confinamiento estrecho, uno o más recipientes que comprenden: (a) un primer recipiente que comprende uno de los anticuerpos o uno de los fragmentos génicos de *C. subtsugae* de la presente divulgación; y (b) uno o más recipientes adicionales que comprenden uno o más de los siguientes: reactivos de lavado, reactivos capaces de detectar la presencia de anticuerpos unidos o reactivos capaces de detectar la presencia de ácidos nucleicos hibridados.

Usando las proteínas aisladas desveladas en el presente documento, la presente divulgación proporciona
60 adicionalmente métodos para obtener e identificar agentes capaces de unirse a una proteína codificada por una ORF de *C. subtsugae*. De manera específica, dichos agentes incluyen anticuerpos (descritos anteriormente), péptidos, hidratos de carbono, agentes farmacéuticos y similares. Dichos métodos comprenden las etapas de: (a) poner en contacto un agente con una proteína aislada codificada por una de las ORF desveladas en el presente documento; y
65 (b) determinar si el agente se une a dicha proteína. Se conocen en la técnica métodos para la detección de la unión

proteína-proteína e incluyen, por ejemplo, unión a filtro, inmunoprecipitación, ensayos de dos híbridos, retardo en gel y complementación de subunidades indicadoras. Véase, por ejemplo, patentes de los Estados Unidos 5.503.977 y 5.585.245; Fields *et al.* (1989) *Nature* 340: 245-247; Bai *et al.* (1996) *Meth. Enzymol.* 273:331-347 y Luo *et al.* (1997) *BioTechniques* 22:350-352.

5

Vectores

Para realizaciones en las que se produce un polipéptido usando técnicas recombinantes, los métodos pueden implicar cualquier construcción adecuada y cualquier célula hospedadora adecuada, que puede ser una célula procariota o eucariota (p. ej., una célula hospedadora bacteriana, una célula hospedadora de levadura, una célula hospedadora vegetal, una célula hospedadora de insecto o una célula hospedadora de mamífero cultivada). Se conocen en la técnica métodos para introducir material genético en células hospedadoras e incluyen, por ejemplo, biolística, transformación, electroporación, lipofección, conjugación, coprecipitación con fosfato de calcio y similares. El método de transferencia puede seleccionarse para proporcionar expresión estable del ácido nucleico codificante de polipéptido introducido. El ácido nucleico codificante de polipéptido puede proporcionarse como un elemento episómico heredable (p. ej., plásmido) o puede integrarse en el genoma.

10

15

También pueden usarse vectores víricos para clonación y expresión de los ácidos nucleicos desvelados en el presente documento. Los vectores víricos de plantas ilustrativos incluyen virus del mosaico de la coliflor (CaMV), virus del pardeamiento temprano del guisante (PEBV), virus del moteado de las vainas (BPMV), virus del mosaico del pepino (CMV), virus esférico latente de la manzana (ALSV), virus del mosaico del tabaco (TMV), virus X de la patata, virus del mosaico del bromo (BMV) y virus del mosaico estriado de la cebada (BSMV).

20

Pueden usarse vectores adicionales para la expresión de secuencias polipeptídicas de *C. subtsugae* en organismos no vegetales. Estos incluyen vectores de clonación procariotas (p. ej., pBR322, pUC, bacteriófago lambda), vectores fúngicos (p. ej., plásmido 2 μ de levadura), vectores de clonación de insectos (p. ej., baculovirus) y vectores de mamíferos (p. ej., SV40).

25

La composición de los vectores adecuados para transferir un ácido nucleico codificante de polipéptido puede variar. Los vectores integrantes pueden ser plásmidos condicionalmente replicantes o suicidas, bacteriófagos y similares. Las construcciones pueden incluir diversos elementos, incluyendo, por ejemplo, promotores, marcadores genéticos seleccionables (p. ej., genes que confieren resistencia a antibióticos, por ejemplo, neomicina, G418, metotrexato, ampicilina kanamicina, eritromicina, cloranfenicol o gentamicina), orígenes de replicación (para promover la replicación en una célula hospedadora, p. ej., una célula hospedadora bacteriana) y similares. La elección del vector depende de diversos factores tales como el tipo de célula en el que se desea la propagación y el fin de propagación. Determinados vectores son útiles para amplificar y preparar grandes cantidades de la secuencia de ADN deseada. Otros vectores son adecuados para la expresión de proteína en células. Otros vectores adicionales son adecuados para la transferencia y expresión en células en un animal o una planta completa. La elección del vector adecuado está dentro de la experiencia de la técnica. Muchos de dichos vectores están disponibles en el mercado.

30

35

El vector usado puede ser un vector de expresión basado en plásmidos episómicos que contienen marcadores de resistencia a fármacos y elementos que posibilitan la replicación autónoma en diferentes células hospedadoras. Los vectores están ampliamente descritos en numerosas publicaciones bien conocidas por los expertos, incluyendo, p. ej., *Short Protocols in Molecular Biology*, (1999) F. Ausubel, *et al.*, eds., Wiley & Sons. Los vectores pueden posibilitar la expresión de los ácidos nucleicos que codifican el polipéptido objeto, pueden posibilitar la propagación de los ácidos nucleicos objeto, o ambos.

40

45

Puede prepararse construcciones, por ejemplo, al insertar un polinucleótido de interés en una cadena principal de la construcción, normalmente por medio de unión de ADN ligasa a un sitio de enzima de restricción escindido en el vector. Como alternativa, la secuencia de nucleótidos deseada puede insertarse por recombinación homóloga o recombinación específica de sitio, o por uno o más métodos de amplificación (p. ej., PCR). Normalmente, se logra recombinación homóloga al unir regiones de homología con el vector en los flancos de la secuencia de nucleótidos deseada, mientras que puede lograrse recombinación específica de sitio mediante el uso de secuencias que facilitan la recombinación específica de sitio (p. ej., cre-lox, sitios att, etc.). Puede añadirse ácido nucleico que contiene dichas secuencias mediante, por ejemplo, ligamiento de oligonucleótidos o mediante reacción en cadena de la polimerasa usando cebadores que comprende tanto la región de homología como una parte de la secuencia de nucleótidos deseada.

50

55

Para expresión del polipéptido de interés, puede emplearse un casete de expresión. Por tanto, la presente divulgación proporciona un vector de expresión recombinante que comprende un ácido nucleico objeto. El vector de expresión puede proporcionar secuencias reguladoras de la transcripción y la traducción, y también puede proporcionar expresión inducible o constitutiva, en donde la región codificante se sitúa operativamente bajo el control transcripcional de una región de inicio de la transcripción (p. ej., un promotor, potenciador) y regiones de terminación de la transcripción y la traducción. Estas regiones de control pueden ser nativas para el genoma de *C. subtsugae* o pueden obtenerse de fuentes exógenas. Como tales, las regiones de control de fuentes exógenas pueden considerarse elementos heterólogos que están unidos operativamente con el ácido nucleico que codifica el polipéptido objeto. En

60

65

general, las secuencias reguladoras de la transcripción y la traducción pueden incluir, pero sin limitación, secuencias promotoras, secuencias operadoras, sitios de unión a ribosomas, secuencias de inicio y terminación de la transcripción, secuencias de inicio y terminación de la traducción, sitios de poliadenilación y secuencias potenciadoras o activadoras. Los promotores pueden ser constitutivos o inducibles, y pueden ser un promotor constitutivo fuerte (p. ej., promotor T7, promotor SP6 y similares).

Las secuencias reguladoras de plantas ilustrativas, que pueden usarse en las construcciones recombinantes desveladas en el presente documento, incluyen promotores constitutivos tales como los promotores 19S y 35S de CaMV y los de genes que codifican actina o ubiquitina. Como alternativa, también pueden usarse promotores regulados tales como promotores regulados químicamente (p. ej., regulados por tetraciclina) y promotores inducibles por heridas (expresados en sitios de heridas y en sitios de infección fitopatogena). En realizaciones adicionales, los promotores pueden ser específicos de tejido (p. ej., que especifican expresión en raíces, hojas, flores, inflorescencias) y/o regulados temporalmente (p. ej., que especifican expresión en plántulas).

Se han descrito promotores adicionales para su uso en células vegetales. Véase, por ejemplo, Stanford *et al.* (1989) Mol. Gen. Genet. 215: 200-208; Xu *et al.* (1993) Plant Molec. Biol. 22: 573-588; Logemann *et al.* (1989) Plant Cell 1: 151-158; Rohrmeier y Lehle (1993) Plant Molec. Biol. 22: 783-792; Firek *et al.* (1993) Plant Molec. Biol. 22: 129-142 y Warner *et al.* (1993) Plant J. 3: 191-201.

Se han descrito secuencias consenso de inicio de la traducción en plantas (es decir, sitios de unión a ribosomas) en Joshi (1987) Nucleic Acids Res. 15:6643-6653 y en el catálogo Clontech 1993/1994, página 210.

Los vectores de expresión tienen en general sitios de restricción convenientes ubicados cerca de la secuencia promotora para posibilitar la inserción de secuencias de ácido nucleico que codifican proteínas de interés. Un marcador seleccionable operativo en el hospedador de expresión puede estar presente para facilitar la selección de células que contienen el vector. Además, la construcción de expresión puede incluir elementos adicionales. Por ejemplo, el vector de expresión puede tener uno o dos sistemas de replicación, permitiendo de este modo que se mantenga, por ejemplo, en células vegetales o de insecto para expresión y en un hospedador procarionta para clonación y amplificación. Además, la construcción de expresión puede contener un gen marcador seleccionable para permitir la selección de células hospedadoras transformadas. Los genes de selección son bien conocidos en la técnica y varían según la célula hospedadora usada.

Los vectores de expresión proporcionados en el presente documento contienen los ácidos nucleicos y/o polinucleótidos mencionados anteriormente. Dichos vectores de expresión pueden contener promotores (p. ej., promotor T7, promotor T3, promotor SP6, promotor de la ARN polimerasa de *E. coli*, promotor *lac* y sus derivados, promotor *tac*, promotor *trp*, el promotor P_{BAD} inducible por arabinosa, el promotor *rhaP_{BAD}* inducible por ramnosa, promotores de bacteriófagos lambda (p. ej., P_L), promotor de CMV, promotor de SV40, promotor de PGK, promotor alfa de EF-1), operadores, señales de terminación de la transcripción (p. ej., señal de terminación de SV40), sitios de corte y empalme (p. ej., sitios de corte y empalme de SV40, sitios de corte y empalme de beta-globina), sitios de unión a ribosomas, secuencias señal (p. ej., secuencia señal de inmunoglobulina kappa), marcadores de epítopos (p. ej., *myc*, FLAG), marcadores de purificación (p. ej., His₆), orígenes de replicación y marcadores de selección de fármacos. También pueden unirse operativamente secuencias conectoras, que codifican aminoácidos conectores y/o que comprenden sitios de reconocimiento de enzimas de restricción, o cualquier otro tipo de secuencia conectora, con el ácido nucleico, que codifica el polipéptido objeto presente en los vectores desvelados en el presente documento.

Se pueden preparar bibliotecas de cósmidos mediante métodos conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Maniatis *et al.* Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Press, 2ª edición, 1989 y Sambrook *et al.*, 2001. Dicha biblioteca puede usarse para exploración basada en secuencia y para cualquier tipo de exploración funcional de células, o de sobrenadantes, caldos de cultivo de células completas, lisados sin células o extractos derivados de las células. Se conocen en la técnica y se describen en la bibliografía ensayos biológicos de alto rendimiento para exploración de herbicidas, actividades enzimáticas, actividad antineoplásica, etc. Véase también ejemplos 7-11 en el presente documento.

Células hospedadoras

La presente divulgación contempla además células hospedadoras recombinantes que contienen un polinucleótido exógeno. Dicho polinucleótido puede comprender uno o más fragmentos de los genes de *C. subtsugae* como se desvela en el presente documento o puede codificar uno o más de los polipéptidos de la presente divulgación. Las células hospedadoras pueden ser procariontas (p. ej., bacterianas) o eucariotas (p. ej., levadura, insecto, mamífero). El hospedador también puede ser una célula sintética.

También se desvela en el presente documento que la célula hospedadora es un microorganismo. Son microorganismos adecuados los que son capaces de colonizar tejido vegetal (p. ej., raíz, tallos, hojas, flores, de manera interna y en la superficie) o la rizosfera, de manera que entren en contacto con plagas de insectos. Algunos de los microorganismos hospedadores también pueden ser capaces de colonizar el intestino de una plaga de insecto y ser capaces de transmitirse de un insecto a otro. Los microorganismos hospedadores también pueden colonizar el

intestino y la superficie corporal de una plaga vegetal. La célula hospedadora también puede usarse como una fábrica microbiana para la producción de proteínas de *C. subtsugae* o para la producción de uno o más compuestos producidos por la actividad de proteínas de *C. subtsugae* tales como, por ejemplo, péptidos, lípidos, lipopéptidos, glucoproteínas, metabolitos secundarios, antibióticos y compuestos orgánicos pequeños.

5 Los microorganismos gramnegativos adecuados para la expresión heteróloga incluyen: *Escherichia coli* (p. ej., *E. coli* K12, *E. coli* BL21), *Pseudomonas* sp. (p. ej., *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas aurantiaca*, *Pseudomonas aureofaciens*, *Pseudomonas protegens*), *Enterobacter* sp. (p. ej. *Enterobacter cloacae*) y *Serratia* sp. Las cepas de *E. coli* ilustrativas incluyen *E. coli* BL21 y *E. coli* K12 para expresión rutinaria. Otras cepas
10 de *E. coli*, para fines más especializados, son las que presentan deficiencia de proteasa (BL21-B838) y las que sobreexpresan proteínas de membrana tales como el derivado de BL21 DE3, C41 (DE3) y C43 (DE3).

Se conocen métodos para expresión de alto nivel de proteínas heterólogas en *E. coli* e incluyen (a) métodos de inducción de IPTG, (b) métodos de autoinducción y (c) métodos de inducción de IPTG de alta densidad celular. Véase,
15 por ejemplo, Sivashanmugam *et al.* (2009).

Los microorganismos grampositivos adecuados para la expresión heteróloga incluyen *Bacillus* sp. (p. ej., *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*) y *Streptomyces* sp. Una ventaja de usar *Bacillus* como un hospedador de expresión es que los miembros de este género producen esporas, lo que proporciona formulaciones con mejor
20 estabilidad y mayor tiempo de conservación. Están disponibles en el mercado sistemas de expresión basados en *Bacillus megaterium* y *Bacillus subtilis* de MoBiTec (Alemania). Pueden expresarse secuencias de nucleótidos de interesantes en *Bacillus megaterium* usando bajo el control del promotor del operón de xilosa.

Los microorganismos fúngicos adecuados para la expresión heteróloga incluyen *Trichoderma* sp., *Gliocladium*,
25 *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris*. Puede introducirse ADN heterólogo en hongos filamentosos mediante transformación mediada por protoplastos usando polietilenglicol (PEG) o mediante métodos basados en electroporación. El bombardeo de partículas es otro método que se ha usado con éxito para transformar células fúngicas.

30 Se conocen en la técnica métodos y composiciones para la transformación de *Saccharomyces cerevisiae*. Por ejemplo, un ácido nucleico puede clonarse en un vector adecuado (p. ej., los vectores YES (Invitrogen, Carlsbad, CA), bajo el control de un promotor inducible tal como GAL1 y el terminador de CYC1 y expresarse en *Saccharomyces cerevisiae*. Las células resultantes pueden probarse con respecto a la actividad deseada o la expresión de proteínas.

35 También puede realizarse expresión heteróloga en otras especies de levadura (Jeffries *et al.*, 2010), tales como *Pichia pastoris*, *Hansenula polymorpha*, *Arxula adenivorans* y *Yarrowia lipolytica*. Puede lograrse transformación de *Pichia pastoris* con el uso de un equipo comercial, tal como el sistema de expresión PichiaPink (Invitrogen, Carlsbad, CA), El sistema de expresión de proteínas clásico de Pichia o el Pichia GlycoSwitch (para proteínas glucosiladas) (Research Corporation Technologies, Tucson, AZ). Para la transformación de las levaduras *Pichia pastoris* o *Hansenula polymorpha*, también se puede usar electroporación.
40

En determinadas realizaciones, se usan bacterias simbióticas no patógenas, que son capaces de vivir y replicarse en tejidos vegetales (es decir, endófitos) o bacterias simbióticas no patógenas, que son capaces de colonizar la filosfera o la rizosfera (es decir, epífitos). Dichas bacterias incluyen bacterias de los géneros *Agrobacterium*, *Alcaligenes*,
45 *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Clavibacter*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Flavobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Serratia*, *Streptomyces* y *Xanthomonas*.

También pueden usarse hongos simbióticos, tales como *Trichoderma* y *Gliocladium* como hospedadores para la propagación y/o expresión de las secuencias desveladas en el presente documento.
50

Formulaciones y composiciones plaguicidas

La presente divulgación proporciona composiciones plaguicidas (p. ej., insecticidas) y formulaciones que comprenden los ácidos nucleicos y polipéptidos desvelados en el presente documento.
55

Una "plaga" es un organismo (procariota, eucariota o arquea) que aumenta la mortalidad y/o ralentiza, retarda o altera de otro modo el crecimiento de una planta. Las plagas incluyen, pero sin limitación, nematodos, insectos, hongos, bacterias y virus.

60 Un "plaguicida" como se ha definido en el presente documento, es una sustancia procedente de un producto biológico, o una sustancia química, que aumenta la mortalidad y/o inhibe la velocidad de crecimiento de plagas de plantas. Los plaguicidas incluyen, pero sin limitación, nematocidas, insecticidas, herbicidas, fungicidas vegetales, bactericidas vegetales y viricidas vegetales.

65 Un "plaguicida biológico" como se define en el presente documento es un microorganismo con propiedades plaguicidas.

Una "composición plaguicida" es una formulación que comprende un plaguicida y opcionalmente uno o más componentes adicionales. Los componentes adicionales incluyen, pero sin limitación, disolventes (p. ej., acetato de amilo, tetracloruro de carbono, dicloruro de etileno; queroseno, xileno, aceite de pino y otros enumerados en la lista de EPA 4a y 4b, etc.), vehículos, (p. ej., harina orgánica, harina de cáscara de nuez, corteza de madera), mineral pulverizado (azufre, diatomita, tripolita, cal, talco de yeso, pirofilita), arcilla (atapulgita, bentonitas, caolines, ceniza volcánica y otros enumerados en la lista de EPA 4a y 4b), estabilizadores, emulsionantes (p. ej., jabones alcalinos, aminas orgánicas, sulfatos de alcoholes de cadena larga y materiales tales como alginatos, hidratos de carbono, gomas, lípidos y proteínas, y otros enumerados en la lista de EPA 4a y 4b), tensioactivos (p. ej., los enumerados en la lista de EPA 4a y 4b), antioxidantes, protectores solares, un segundo plaguicida, químico o biológico (p. ej., insecticida, nematocida, mitocida, alguicida, fungicida, bactericida), un herbicida y/o un antibiótico.

Un "vehículo" como se define en el presente documento es un material inerte, orgánico o inorgánico, con el que el principio activo se mezcla o formula para facilitar su aplicación a una planta u otro objeto para tratar, o su almacenamiento, transporte y/o manipulación.

Las composiciones plaguicidas como se desvelan en el presente documento son útiles para modular la infestación por plagas en una planta. El término "modular" como se define en el presente documento se usa para indicar la alteración de la cantidad de infestación por plaga o velocidad de propagación de la infestación por plaga. En general, dicha alteración es una reducción del grado y/o la velocidad y/o propagación de la infestación.

La expresión "infestación por plaga" como se define en el presente documento, es la presencia de una plaga en una cantidad que provoca un efecto perjudicial incluyendo una enfermedad o infección en una población hospedadora o aparición de una mala hierba no deseada en un sistema de crecimiento. Las plagas de plantas ilustrativas incluyen, pero sin limitación, ácaros (p. ej., *Tetranychus urticae* (arañuela de la patata)), moscas de la fruta (p. ej., *Drosophila suzukii*, *Drosophila melanogaster*), moscas domésticas (p. ej., *Musca domestica*), arácnidos (p. ej., *Acarí spp.*), gusanos de las raíces (*Anthomyidae spp.*, p. ej., moscas del repollo), áfidos (p. ej., *Myzus persicae* (pulgón gris del melocotón)), *Triozidae spp.* (p. ej., psila de la patata (*Bactericera cockerelli*)), escarabajos (*Tenebrionidae spp.*, p. ej., escarabajos de la cama (*Alphitobius diaperinus*)), larvas (p. ej., gusano blanco (*Cyclocephala lurida*), gusano blanco europeo (*Rhizotrogus majalis*), larvas del escarabajo japonés (*Popillia japonica*), larvas del gorgojo de la vid (*Otiorhynchus sulcatus*), larvas del escarabajo oriental (*Anomala orientalis*), *Scarabaeidae* (p. ej., *Scarabaeidae spp.*), nematodos (p. ej., nematodo de los nudos de la raíz (*Meloidogyne spp.*)), hongos, bacterias y diversos virus vegetales, por ejemplo, virus del mosaico del tabaco, virus del bronceado del tomate, virus de la rizadura amarilla del tomate, virus del mosaico del pepino, virus Y de la patata, virus del mosaico de la coliflor, virus del mosaico africano de la yuca, virus de la viruela del ciruelo, virus del mosaico del bromo, virus X de la patata, virus de la tristeza de los cítricos, virus del enanismo amarillo de la cebada, virus del enrollamiento de las hojas de la patata y virus del achaparrado del tomate.

Las composiciones plaguicidas, como se desvelan en el presente documento, pueden usarse para fines profilácticos o moduladores. Cuando se proporcionan de manera profiláctica, la composición o las composiciones se proporcionan antes de cualquier síntoma de infestación. La administración profiláctica de la composición o las composiciones actúa para prevenir, atenuar o reducir la velocidad de aparición de cualquier infección o infestación posterior. Cuando se proporcionan para fines moduladores, la composición o las composiciones se proporcionan en el momento (o poco después) de la aparición de una indicación de la infección o infestación. La administración moduladora del compuesto o los compuestos actúa para atenuar los síntomas patológicos de la infección o infestación y para aumentar la velocidad de recuperación.

Se pueden emplear métodos adicionales para controlar la duración de la acción. Se puede lograr liberación controlada mediante el uso de polímeros para formar complejos o absorber uno o más de los componentes de la composición. El suministro controlado puede ejercitarse seleccionando macromoléculas adecuadas (por ejemplo, poliésteres, poliaminoácidos, polivinilo, pirrolidona, etilvinilacetato, metilcelulosa, carboximetilcelulosa o protamina, sulfato) y la concentración de macromoléculas así como los métodos de incorporación para controlar la liberación. Otro posible método para controlar la duración de la acción mediante preparaciones de liberación controlada es incorporar composiciones según lo desvelado en el presente documento en partículas de un material polimérico tal como poliésteres, poliaminoácidos, hidrogeles, poli (ácido láctico) o copolímeros de vinilacetato de etileno. Como alternativa, en lugar de incorporar estas composiciones en partículas poliméricas, es posible atrapar estos materiales en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli(metilmetacrilato), respectivamente, o en sistemas coloidales de administración, por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas o en macroemulsiones. Dichas técnicas son conocidas en este campo.

Las composiciones plaguicidas como se desvelan en el presente documento, (p. ej., toxinas plaguicidas) pueden producirse mediante la expresión de secuencias génicas de *Chromobacterium subtsugae* en hospedadores heterólogos para fermentación a escala de laboratorio, escala piloto y escala de fabricación (p. ej., *E. coli*, *Pseudomonas sp.*, levadura, etc.). Pueden producirse toxinas mediante procedimientos de fermentación conocidos en la técnica usando el hospedador heterólogo y formularse directamente o después de la extracción y purificación de la

toxina del caldo de fermentación. La formulación puede incluir célula vivas o células no viables.

Las composiciones plaguicidas desveladas en el presente documento pueden formularse de cualquier manera. Los ejemplos de formulación no limitantes incluyen, pero sin limitación, concentrados emulsionables (CE), polvos humectables (PH), líquidos solubles (LS), aerosoles, soluciones de concentrado de volumen ultrabajo (VUB), polvos solubles (PS), microencapsulados, gránulos dispersados en agua, fluidos (FL), microemulsiones (ME), nanoemulsiones (NE), etc. En cualquiera de las formulaciones descritas en el presente documento, el porcentaje del principio activo está en un intervalo de 0,01 % a 99,99 %. Puede encontrarse una descripción detallada de formulaciones plaguicidas en la Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology.; Knowles, A. 2005. New Developments in Crop Protection Product Formulation, Agrow Reports, Londres, Reino Unido; Valkenburg, W.van (ed.) 1973, Pesticide Formulation, Marcel Dekker, Nueva York, Estados Unidos; Knowles, D.A. (ed.) 1998, Chemistry and Technology of Agrochemical Formulations, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Países Bajos.

Formulaciones de polvo y polvo fino

Estas son formulaciones sencillas que contienen habitualmente 0,1-25 % del principio activo. Sin embargo, pueden usarse concentraciones mayores del principio activo dependiendo de la potencia y la aplicación en particular. La toxina plaguicida se mezcla con un vehículo sólido, preferentemente de tamaño de partícula pequeño. Los vehículos sólidos pueden incluir: arcillas de silicato (p. ej., atapulgita, bentonitas, ceniza volcánica, montmorillonita, caolín, talco, diatomitas, etc.), carbonatos (p. ej., calcita, dolomita, etc), productos sintéticos (sílice precipitada, sílice pirógena, etc.), productos botánicos molidos (p. ej., polvos de mazorcas de maíz, cascarillas de arroz, cáscaras de coco, etc.), harina orgánica (p. ej., harina de cáscara de nuez, corteza de madera, etc.) o mineral pulverizado (p. ej., azufre, diatomita, tripolita, cal, talco de yeso, pirofilita, etc.). Los ingredientes inertes usados en formulaciones de polvo fino también pueden venir de los enumerados en la lista de ingredientes inertes de EPA 4a (www.epa.gov/opprd001/inerts/inerts_list4Acas.pdf) para formulaciones convencionales y 4b (www.epa.gov/opprd001/inerts/inerts_list4Bname.pdf) para formulaciones orgánicas. Puede lograrse tamaño de partícula pequeño mezclando el principio activo con el vehículo y pulverizando en un molino. Los polvos finos se definen como con un tamaño de partícula menor de 100 micrómetros; y con el aumento del tamaño de la partícula, disminuye la toxicidad de la formulación. En la selección de una formulación de polvo fino, debería tenerse en consideración su compatibilidad, finura, densidad aparente, fluidez, abrasión, capacidad de absorción, gravedad específica y coste. Se proporcionan formulaciones ilustrativas de polvo fino en la tabla 1.

Tabla 1

| Componentes de la formulación | Formulación A | Formulación B | Formulación C | Formulación D |
|-------------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| Principio activo | 0,65 | 5 | 10 | 25 |
| Talco | 50 | | 90 | |
| caolín u otra arcilla | 49,35 | 95 | | 75 |

Una formulación de polvo fino también puede prepararse a partir de un concentrado de polvo fino (p. ej., 40 % de principio activo, 5 % de estabilizador, 20 % de sílice, 35 % de carbonato de magnesio) añadido a 1-10 % a una combinación de carga orgánica/talco 1:1.

La formulación en polvo fino se usa como un polvo de contacto (PC) o polvo de seguimiento (PS) contra insectos rastreros.

Una formulación de polvo con alta fluidez puede aplicarse mediante equipos neumáticos en invernaderos.

Formulaciones granulares y de microgránulos

La toxina plaguicida se aplica en forma líquida a partículas gruesas de material poroso (p. ej., arcilla, cáscaras de nuez, vermiculita, tierra de diatomeas, mazorcas de maíz, atapulgita, montmorillonita, caolín, talco, diatomitas, calcita, dolomita, sílices, cascarillas de arroz, cáscaras de coco, etc.). Los gránulos o microgránulos pueden ser dispersables en agua y pueden formarse mediante extrusión (para activos plaguicidas con baja solubilidad en agua), aglomeración o secado por pulverización. Los gránulos también pueden recubrirse o impregnarse con una solución a base de disolvente de la toxina plaguicida. Las partículas transportadoras pueden seleccionarse de las enumeradas en la lista de ingredientes inertes de EPA 4a (www.epa.gov/opprd001/inerts/inerts_list4Acas.pdf) para formulaciones convencionales y 4b (www.epa.gov/opprd001/inerts/inerts_list4Bname.pdf) para formulaciones orgánicas. El principio activo puede ser absorbido por el material transportador o aplicarse sobre la superficie del gránulo. El tamaño de partícula puede variar de 250 a 1250 micrómetros (0,25 mm a 2,38 mm) de diámetro. Las formulaciones contienen habitualmente una concentración de 2 a 10 por ciento del tóxico. Los gránulos se aplican en agua o verticilos de plantas o al suelo a la tasa de 10 kg/ha. Se usan formulaciones granulares de insecticidas sistémicos para el control de parásitos chupadores o del suelo mediante la aplicación al suelo. La aplicación en verticilos se realiza para el control de parásitos perforadores de cultivos tales como el sorgo, el maíz y la caña de azúcar, etc. Estos tipos de formulaciones

reducen la deriva y permiten una liberación más lenta de la composición plaguicida.

Se usan con más frecuencia plaguicidas granulares para aplicar productos químicos al suelo para combatir malas hierbas, hormigas rojas, nematodos e insectos que viven en el suelo o para la absorción en plantas a través de las raíces. En ocasiones se aplican formulaciones granulares mediante avión o helicóptero para minimizar la deriva o penetrar vegetación densa. Una vez aplicados, los gránulos liberan el principio activo lentamente. Algunos gránulos necesitan humedad en el suelo para liberar el principio activo. También se usan formulaciones granulares para combatir mosquitos larvarios y otras plagas acuáticas. Se usan gránulos en operaciones de control de plagas agrícolas, estructurales, ornamentales, de césped, acuáticas, de derecho de paso y de salud pública (insectos picadores).

La aplicación de formulaciones granulares es habitual en herbicidas preemergentes o como insecticidas del suelo para aplicación directa e incorporación en el suelo u otros sustratos sólidos donde crecen las plantas. También pueden aplicarse gránulos o microgránulos en surcos. Habitualmente se usan gránulos para aplicación al agua, tal como en campos de arroz anegados.

Una formulación de gránulos típica incluye (% p/p) 1-40 % del principio activo, 1-2 % de estabilizador, 0-10 % de resina o polímero, 0-5 % de tensioactivo, 0-5 % de aglutinante y se compone hasta 100 % con el material transportador.

Formulaciones de polvos humectables

El polvo humectable es una formulación en polvo que produce una suspensión más bien estable cuando se diluye con agua. Se formula mezclando el agente plaguicida con diluyentes tales como atapulgita, un agente tensioactivo y materiales adyuvantes tales como sales de sodio de sulfoácidos. Opcionalmente se añaden adhesivos para mejorar la retención en plantas y otras superficies. Pueden prepararse polvos humectables mezclando la toxina plaguicida (10-95 %) con un vehículo sólido, más 1-2 % de un agente tensioactivo para mejorar la capacidad de suspensión. La composición general de la formulación incluye el principio activo en forma sólida (5,0-75 %), un dispersante aniónico y un agente humectante aniónico o no iónico.

Un ejemplo típico de una formulación de polvo humectable incluye 10-80 % de principio activo, 1-2 % de agentes humectantes (p. ej., sulfonatos de benceno, sulfonatos de naftaleno, sulfosuccinatos alifáticos, alcohol etoxilatos alifáticos, etc.), 2-5 % de agente de dispersión (p. ej., lignosulfonatos, condensados de sulfonato de naftaleno-formaldehído, etc.), y 0,1-1 % de agente antiespumante (p. ej., isopar M (Exxon/Mobil), compuesto hasta 100 % con una carga o vehículo inerte (p. ej., tierra de diatomeas, sílice, etc.).

Formulaciones de concentrados emulsionables (CE)

Estas son formulaciones de plaguicidas concentrados que contienen un disolvente orgánico y un agente tensioactivo para facilitar la emulsión con agua. Cuando se pulverizan formulaciones de CE en partes de plantas, el disolvente se evapora rápidamente, dejando un depósito de toxina del que también se evapora agua. Los agentes emulsionantes ilustrativos en formulaciones insecticidas incluyen jabones alcalinos, aminas orgánicas, sulfatos de alcoholes de cadena larga y materiales tales como alginatos, hidratos de carbono, gomas, lípidos y proteínas. Pueden seleccionarse agentes emulsionantes de los enumerados en la lista de ingredientes inertes de EPA 4a (www.epa.gov/opprd001/inerts/inerts_list4Acas.pdf) para formulaciones convencionales y 4b (www.epa.gov/opprd001/inerts/inerts_list4Bname.pdf) para formulaciones orgánicas.

Formulaciones en solución

Una formulación en solución es una formulación plaguicida líquida concentrada que puede usarse directamente o necesitar dilución en el caso de un concentrado soluble. Los concentrados solubles y las soluciones son mezclas a base de agua o disolvente con miscibilidad completa en agua.

Un ejemplo típico de una formulación de concentrado en solución incluye 20-70 % de principio activo, 5-15 % de agente humectante, 5-10 % de anticongelante y se compone hasta 100 % con agua o un disolvente miscible en agua.

Dependiendo de la naturaleza y estabilidad de la toxina plaguicida, una formulaciones en solución puede incluir opcionalmente espesantes, conservantes, antiespumante, tampones de pH, filtros UV, etc.

Formulaciones en aerosol y fumigantes

En un aerosol insecticida, la toxina está suspendida como partículas minúsculas que tienen tamaños que varían de 0,1 a 50 micrómetros en el aire como una nebulización o vaporización. Esto se logra quemando la toxina o vaporizándola por calentamiento. El tóxico disuelto en un gas licuado, si se libera a través de un orificio pequeño, puede provocar que las partículas tóxicas floten en el aire con la evaporación rápida del gas liberado.

Un compuesto químico, que es volátil a temperaturas ambientales y suficientemente tóxico, se conoce como un fumigante. Los fumigantes entran en un insecto, en general, a través de su sistema traqueal. Se usan fumigantes para

el control de plagas de insectos en silos, edificios y determinados insectos y nematodos en el suelo. La mayoría de los fumigantes son líquidos contenidos en latas o tanques y, con frecuencia, comprenden mezclas de dos o más gases. Como alternativa, puede generarse gas de fosfina o fosfuro de hidrógeno en presencia de humedad de un comprimido hecho de fosfuro de aluminio y carbonato de amonio. La ventaja de usar un fumigante es que sitios que no son fácilmente accesibles para otros productos químicos pueden alcanzarse con fumigantes, debido a la penetración y dispersión del gas. Son fumigantes usados habitualmente EDCT, bromuro de metilo, fosfuro de aluminio y ácido cianhídrico.

Formulación en mezclas de fertilizantes

Una mezcla de fertilizantes se puede fabricar mediante la adición de una composición insecticida, como se desvela en el presente documento, a un fertilizante químico o mediante la diseminación de la composición directamente en el fertilizante. Se aplican mezclas de fertilizantes en el tiempo de fertilización regular y proporcionan tanto nutrientes vegetales como control de insectos del suelo. En una formulación fertilizante ilustrativa, se mezcla urea (solución al 2 %) con una composición insecticida y se pulveriza para aporte de nitrógeno a la planta y para realizar control eficaz de la plaga.

Formulación como cebo envenenado.

Los cebos envenenados consisten en un material básico o transportador atractivo para la especie nociva y un tóxico químico en cantidades relativamente pequeñas. Los cebos envenenados se usan para el control de las moscas de la fruta, insectos masticadores, gusanos de alambre, gusanos blancos en el suelo, plagas domésticas, ratas en el campo y babosas. Estas formulaciones son útiles para situaciones en las que la aplicación por pulverización es difícil. Una base habitual utilizada en cebos secos es el salvado de trigo con agua y melaza. Para el control de *Eudocima aurantia*, se usa una solución de fermentación de azúcar o melaza con una toxina.

Formulaciones para tratamientos de semillas

Los tratamientos de semillas incluyen la aplicación de una composición plaguicida, opcionalmente en combinación con otros agentes bioactivos, antagonistas o simbióticos, a la superficie de una semilla antes de la siembra. Las toxinas, proteínas y/o compuestos plaguicidas desvelados en el presente documento pueden formularse para tratamientos de semillas en cualquiera de los siguientes modos: polvo seco, polvo que puede suspenderse en agua, solución líquida, concentrado o emulsión fluidos, emulsión, microcápsulas, gel o gránulos dispersables en agua; o puede aplicarse a semillas pulverizando en la semilla antes de la siembra.

En el caso de un polvo seco, el principio activo se formula de manera similar a un polvo humectable, pero con la adición de un agente adhesivo, tal como aceite mineral, en lugar de un agente humectante. Por ejemplo: un kg de polvo de talco purificado (esterilizado durante 12 h), 15 g de carbonato de calcio y 10 g de carboximetil celulosa se mezclan en condiciones asépticas después del método descrito por Nandakumar *et al.* (2001). La proteína, las suspensiones de ácido nucleico u organismos que los expresan se mezclan en una relación 1:2,5 (suspensión con respecto a mezcla seca) y el producto se seca a la sombra para reducir el contenido de humedad a 20-35 %.

Las composiciones pueden estar en forma de un líquido, gel o sólido.

Una composición sólida puede prepararse suspendiendo un vehículo sólido en una solución de principio o principios activos y secando la suspensión en condiciones suaves, tales como evaporación a temperatura ambiente o evaporación al vacío a 65 °C o menos. Para composiciones líquidas, el principio activo puede disolverse en un vehículo o disolvente adecuado.

Una composición puede comprender un principio o principios activos encapsulados en gel. Dichos materiales encapsulados en gel pueden prepararse mezclando un agente formador de gel (p. ej., gelatina, celulosa o lignina) con una composición que comprende uno o más ácidos nucleicos y/o polipéptidos como se desvelan en el presente documento y opcionalmente un segundo pesticida o herbicida; e induciendo la formación de geles del agente.

La composición puede comprender adicionalmente un tensioactivo para usar para el fin de emulsión, dispersión, hidratación, dispersión, integración, control de la disgregación, estabilización de principios activos y mejora de la fluidez o inhibición de roya. En una realización particular, el tensioactivo es un tensioactivo no iónico no fitotóxico que pertenece preferentemente a la lista de EPA 4B. En otra realización particular, el tensioactivo no iónico es monolaurato de polioxietileno (20). La concentración de tensioactivos puede variar entre 0,1-35 % de la formulación total, p. ej., de 5-25 %. La elección de agentes de dispersión y emulsión, tales como agentes de dispersión y emulsión no iónicos, aniónicos, anfóteros y catiónicos, y la cantidad empleada, se determina por la naturaleza de la composición y la capacidad del agente para facilitar la dispersión de la composición.

Formulaciones que comprenden microorganismos

Las composiciones plaguicidas como se han expuesto anteriormente pueden combinarse con un microorganismo. El

microorganismo puede ser un promotor de crecimiento vegetal. Los microorganismos adecuados incluyen, pero sin limitación, *Bacillus* sp. (p. ej., *Bacillus firmus*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis*), *Paecilomyces* sp. (*P. lilacinus*), *Pasteuria* sp. (*P. penetrans*), *Pseudomonas* sp., *Brevibacillus* sp., *Lecanicillium* sp., *Ampelomyces* sp., *Pseudozyma* sp., *Streptomyces* sp. (*S. bikiniensis*, *S. costaricanus*, *S. avermitilis*), *Burkholderia* sp., *Trichoderma* sp., *Gliocladium* sp., avermectina, *Myrothecium* sp., *Paecilomyces* spp., *Sphingobacterium* sp., *Arthrobotrys* sp., *Chlorosplenium* sp., *Neobulgaria* sp., *Daldinia* sp., *Aspergillus* sp., *Chaetomium* sp., *Lysobacter* sp., *Lachnum papyraceum*, *Verticillium suchlasporium*, *Arthrobotrys oligospora*, *Verticillium chlamydosporium*, *Hirsutella rhossiliensis*, *Pochonia chlamydosporia*, *Pleurotus ostreatus*, *Omphalotus olearius*, *Lampteromyces japonicas*, *Brevudimonas* sp., *Muscodor* sp., *Photorhabdus* sp. y *Burkholderia* sp. También se pueden usar agentes obtenidos o procedentes de dichos microorganismos en combinación con los ácidos nucleicos y polipéptidos pesticidas desvelados en el presente documento.

Formulaciones que comprenden segundos plaguicidas

Las composiciones plaguicidas como se han expuesto anteriormente pueden combinarse con un segundo plaguicida (p. ej., nematocida, fungicida, insecticida, alguicida, mitocida o bactericida). Dicho agente puede ser un aceite natural o producto oleoso que tenga actividad fungicida, bactericida, nematocida, acaricida y/o insecticida (p. ej., aceite de parafina, aceite del árbol del té, aceite de hierba limón, aceite de clavo, aceite de canela, aceites de cítrico, aceite de romero, pelitre). Asimismo, el pesticida puede ser un agente antifúngico de un solo sitio que puede incluir, pero sin limitación, bencimidazol, un inhibidor de la desmetilación (DMI) (p. ej., imidazol, piperazina, pirimidina, triazol), morfolina, hidroxipirimidina, anilino pirimidina, fosforotiolato, inhibidor externo de quinona, quinolina, dicarboximida, carboximida, fenilamida, anilino pirimidina, fenilpirrol, hidrocarburo aromático, ácido cinámico, hidroxianilida, antibiótico, polioxina, acilamina, ftalimida, bencenoide (xililalanina); un inhibidor de la desmetilación seleccionado del grupo que consiste en imidazol, piperazina, pirimidina y triazol (p. ej., bitertanol, miclobutanilo, penconazol, propiconazol, triadimefón, bromuconazol, ciproconazol, diniconazol, fenbuconazol, hexaconazol, tebuconazol, tetraconazol), miclobutanilo, una diamida antranílica (p. ej., clorantranilipol) y un inhibidor externo de quinona (p. ej., estrobilurina). La estrobilurina puede incluir, pero sin limitación, azoxistrobina, cresoxim-metilo o trifloxistrobina. En otra realización particular más, el agente antifúngico es una quinona, p. ej., quinoxifeno (éter de 5,7-dicloro-4-quinolil 4-fluorofenilo). El agente antifúngico también puede obtenerse de un extracto de *Reynoutria*.

El fungicida también puede ser un fungicida no inorgánico multisitio seleccionado del grupo que consiste en cloronitrilo, quinoxalina, sulfamida, fosfonato, fosfito, ditiocarbamato, cloralquitos, fenilpiridin-amina y oxima de ciano-acetamida.

La composición puede, como se ha indicado anteriormente, comprender además un insecticida. El insecticida puede incluir, pero sin limitación, avermectina, Bt (p. ej., *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*), aceite de neem, espinosad, *Burkholderia* sp. (p. ej., como se expone en el documento WO2011/106491), hongos entomopatógenos tales como *Beauveria bassiana* e insecticidas químicos, incluyendo, pero sin limitación, compuestos organoclorados, compuestos organofosforados, carbamatos, piretroides, piretrinas y neonicotinoides.

Como se ha indicado anteriormente, la composición puede comprender adicionalmente un nematocida. Este nematocida puede incluir, pero sin limitación, avermectina, productos microbianos tales como bioma (*Bacillus firmus*), *Pasteuria* spp y productos orgánicos tales como saponinas.

Métodos para modular la infestación por plagas

Por tanto, según la presente divulgación, se proporcionan métodos para modular la infestación por plagas en una planta. Los métodos comprenden la aplicación a una planta o al suelo o sustrato en el que la planta está creciendo, de una composición pesticida que comprende un ácido nucleico como se desvela en el presente documento; es decir, cualquiera de las SEQ ID NO: 4-6.

Los métodos adicionales para modular la infestación por plagas en una planta comprenden la aplicación, a una planta o al suelo o sustrato en el que la planta está creciendo, de una composición pesticida que comprende un polipéptido como se desvela en el presente documento; es decir, cualquiera de las SEQ ID NO: 1-3.

Cuando se usan como agentes biológicos de control de insectos, pueden producirse toxinas insecticidas codificadas por el genoma de *C. subtsugae* por la expresión de una secuencia de nucleótidos de *C. subtsugae* en una célula hospedadora heteróloga capaz de expresar las secuencias de nucleótidos. En una realización, se insertan una o más secuencias de nucleótidos de *C. subtsugae* en un casete de expresión adecuado que comprende, p. ej., un promotor y una señal de terminación de la transcripción. La expresión de la secuencia o las secuencias de nucleótidos puede ser constitutiva o inducible, dependiendo del promotor y/o estímulos externos. En determinadas realizaciones, la célula en la que la toxina que se expresa es un microorganismo, tal como un virus, una bacteria o un hongo.

En determinadas realizaciones, un virus, tal como un baculovirus, se modifica por ingeniería genética para que contenga una secuencia de nucleótidos de *C. subtsugae* en su genoma. Dicho virus recombinante puede expresar grandes cantidades de, p. ej., una toxina insecticida después de la infección de células eucariotas apropiadas que son adecuadas para la replicación y expresión de la secuencia de nucleótidos. La toxina insecticida producida de este

modo se usa como un agente insecticida. Como alternativa, se usan baculovirus modificados por ingeniería genética para incluir la secuencia de nucleótidos para infectar insectos *in vivo* y matarlos, bien mediante expresión de la toxina insecticida o bien mediante una combinación de infección vírica y expresión de la toxina insecticida.

- 5 Por tanto, las composiciones expuestas anteriormente, que comprenden ácidos nucleicos y polipéptidos de *C. subtsugae*, también se pueden usar como pesticidas. En particular, las composiciones expuestas anteriormente pueden usarse como, por ejemplo, insecticidas y nematocidas, solos o en combinación con una o más segundas sustancias pesticidas como se expone en el presente documento.
- 10 De manera específica, los nematodos que pueden controlarse usando el método expuesto anteriormente incluyen, pero sin limitación, nematodos parasitarios tales como nematodos de los nudos de la raíz, quistes y lesiones, incluyendo, pero sin limitación, nematodos galígenos (*Afrina wevelli*), nematodos de los agrostis (*Anguina agrostis*), nematodos de agallas de los brotes (*Anguina spp.*), nematodos de agallas de las semillas (*Anguina spp.*, *A. amsinckiae*, *A. balsamophila*; *A. tritici*), nematodos de agallas de hojas de la festuca (*A. graminis*), nematodos de agallas del trigo (*Anguina tritici*), nematodos de las yemas y las hojas (o foliar) (*Aphelenchoides spp.*, *A. subtenuis*),
 15 nematodos de la hoja de la begonia (o helecho, o de rizo de primavera, o foliar de la fresa, o nematodos de la fresa, o del enanismo del verano) (*A. fragariae*), nematodos de helechos (*A. olesistus*), nematodos del arroz (*A. oryzae*), nematodos de la grosella (*A. ribes*), nematodos de la grosella negra (o el crisantemo) (*A. ritzemabosi*), nematodos foliares o de la hoja del crisantemo (*A. ritzemabosi*), nematodos de la punta blanca del arroz (o del enanismo de primavera o de la yema de la fresa) (*A. besseyi*), nematodos fungívoros (de las setas) (*Aphelenchoides composticola*), *Atalodera spp.* (*Atalodera loniceriae*, *Atalodera ucricri*), nematodos de espinas (*Bakerinema variabile*), nematodos de aguijón (*Belonolaimus spp.*, *B. gracilis*, *B. longicaudatus*), nematodos de la madera del pino (*Bursaphelenchus spp.*, *B. xylophilus*, *B. mucronatus*), nematodos sésiles (*Cacopaurus spp.*, *C. epacris*, *C. pestis*), nematodos de los quistes del amaranto (*Cactodera amaranthi*), nematodos de los quistes del abedul (*C. betulae*), nematodos de los quistes de los cactus (*C. cacti*), nematodos de los quistes estonio (*C. estonica*), nematodos de los quistes de Thorne (*C. thornei*),
 20 nematodos de los quistes de las poligonáceas (*C. betulae*), nematodos de anillos (*Criconema spp.*), nematodos de espinas (*Criconema spp.*, *C. civellae*, *C. decalineatum*, *C. spinalineatum*), nematodos de anillos (*Criconemella axeste*, *C. curvata*, *C. macrodora*, *C. parva*), nematodos de anillos (*Criconemoides spp.*, *C. citri*, *C. simile*), nematodos de espinas (*Crossonema fimbriatum*), nematodos quistoides del eucalipto (*Cryphodera eucalypti*), nematodos de brotes, tallos y bulbos (*Ditylenchus spp.*, *D. angustus*, *D. dipsaci*, *D. destructor*, *D. intermedius*), nematodos de los micelios (*D. myceliophagus*), nematodos de punzón (*Dolichodorus spp.*, *D. heterocephalus*, *D. heterocephalous*), nematodos de lanza (*Dorylaimus spp.*), nematodos de atrofia (*Geocenamus superbus*), nematodos de los quistes (*Globodera spp.*), nematodos de los quistes de la milenrama (*G. achilleae*), nematodos de los quistes de la milenrama (*G. millefolii*), nematodos de los quistes del manzano (*G. mali*), nematodos de los quistes blancos de la patata (*G. pallida*),
 30 nematodos dorados (*G. rostochiensis*), nematodos de los quistes del tabaco (*G. tabacum*), nematodos de los quistes de Osborne (*G. solanacearum*), nematodos de los quistes de Solanum (*G. tabacum virginiae*), nematodos de aguja (*Gracilacus spp.*, *G. idalimus*), nematodos espirales (*Helicotylenchus spp.*, *H. africanus*, *H. digonicus*, *H. dihystra*, *H. erythrinae*, *H. multicinctus*, *H. paragirus*, *H. pseudorobustus*, *H. solani*, *H. spicaudatus*), nematodos de vaina (*Hemicriconemoides spp.*, *H. biformis*, *H. californianus*, *H. chitwoodi*, *H. floridensis*, *H. wessonii*), nematodos de vaina (*Hemicyclophora spp.*, *H. arenaria*, *H. biosphaera*, *H. megalodiscus*, *H. parvana*, *H. poranga*, *H. sheri*, *H. similis*, *H. striatula*), nematodos de los quistes (*Heterodera spp.*), nematodos de los quistes del almendro (*H. amygdali*), nematodos de los quistes de la avena (o los cereales) (*H. avenae*), nematodos de los quistes de Cajanus (o guandú) (*H. cajani*), nematodos de los quistes de la grama (o en forma de corazón o de Valentine) (*H. cardiolata*), nematodos de los quistes de la zanahoria (*H. carotae*), nematodos de los quistes de la col o nematodos de la raíz de brassica (*H. cruciferae*),
 45 nematodos de los quistes de Cyperus (o ciperáceas) (*H. cyperi*), nematodos de los quistes japonés (*H. elachista*), nematodos de los quistes de la higera (o ficus o caucho) (*H. fici*), nematodos de los quistes de Galeopsis (*H. galeopsidis*), nematodos de los quistes de la soja (*H. glycines*), nematodos de la raíz de la alfalfa (o de los quistes del guisante) (*H. goettingiana*), nematodos de los quistes del alforfón (*H. graduni*), nematodos de los quistes de la cebada (*H. hordecalis*), nematodos de los quistes del lúpulo (*H. humuli*), nematodos de los quistes de los cereales mediterráneos (o trigo) (*H. latipons*), nematodos de los quistes de Lespedeza (*H. Iespedezae*), nematodos de los quistes de Kansas (*H. longicolla*), nematodos de las raíces de los cereales o nematodos de los quistes de la avena (*H. major*), nematodos de los quistes del pasto (*H. mani*), nematodos de los quistes de la alfalfa (*H. medicaginis*), nematodos de los quistes de la cipera (o motha) (*Heterodera mothi*), nematodos de los quistes del arroz (*H. oryzae*),
 50 nematodos de Amu-Darya (o de los quistes de Alhagi) (*H. oxiana*), nematodos de los quistes de la acedera (*H. rosii*), nematodos de los quistes de Rumex (*H. rumicis*), nematodos de los quistes de la remolacha azucarera (*H. schachtii*), nematodos de los quistes del sauce (*H. salixophila*), nematodos de los quistes de Scleranthus (*H. scleranthii*), nematodos de los quistes de la cerraña (*H. sonchophila*), nematodos de los quistes de Tayikistán (*H. tadshikistanica*), nematodos de los quistes de Turkmenistán (*H. turcomanica*), nematodos de los quistes del trébol (*H. trifolii*), nematodos de los quistes de la ortiga (*H. urticae*), nematodos de los quistes de Ustinov (*H. ustinovi*), nematodos de los quistes de la judía de careta (*H. vigni*), nematodos de los quistes del maíz (*H. zaeae*), nematodos de la raíz del arroz (*Hirschmanniella spp.*, *H. belli*, *H. caudacrena*, *H. gracilis*, *H. oryzae*), nematodos de lanza (*Hoplolaimus spp.*), nematodos de Columbia (*H. columbus*), nematodos de lanza de Cobb (*H. galeatus*), nematodos de lanza de cabeza en corona (*H. tylenchiformis*), pseudonematodos de nudos de las raíces (*Hypsoperine graminis*), nematodos de aguja (*Longidorus spp.*, *L. africanus*, *L. sylphus*), nematodos de anillos (*Macroposthonia (=Mesocriconema) xenoplax*),
 65 nematodos quistoides (*Meloidodera spp.*), nematodos quistoides del pino (*M. floridensis*), nematodos quistoides de Tayikistán (*M. tadshikistanica*), nematodos de cuerpos quistoides (*Meloidoderita spp.*), nematodos de atrofia (*Merlinius*

spp., *M. brevidens*, *M. conicus*, *M. grandis*, *M. microdorus*), nematodos de los nudos de la raíz (*Meloidogyne* spp., *M. acronea*, *M. arenaria*, *M. artiellia*, *M. brevicauda*, *M. camelliae*, *M. carolinensis*, *M. chitwoodi*, *M. exigua*, *M. graminicola*, *M. hapla*, *M. hispanica*, *M. incognita*, *M. incognita acrita*, *M. indica*, *M. inornata*, *M. javanica*, *M. kikuyuensis*, *M. konaensis*, *M. mali*, *M. microtyla*, *M. naasi*, *M. ovalis*, *M. platani*, *M. querciana*, *M. sasseri*, *M. tadshikistanica*, *M. thamesi*), nematodos de *Centaurea* (*Mesoanguina picridis*), nematodos del abeto de Douglas (*Nacobdodera chitwoodi*), falsos nematodos de los nudos de las raíces (*Nacobbus aberrans*, *N. batatififormis*, *N. dorsalis*), nematodos de pasta agria (*Panagrellus redivivus*), nematodos de la cerveza (*P. silusiae*), nematodos de aguja (*Paralongidorus microlaimus*), nematodos espirales (*Paratylenchus* spp.), nematodos de las raíces rechonchas (*Paratrichodorus allius*, *P. minor*, *P. porosus*, *P. renifer*), nematodos de aguja (*Paratylenchus* spp., *P. baldaccii*, *P. bukowinensis*, *P. curvatus*, *P. dianthus*, *P. elachistus*, *P. hamatus*, *P. holdemani*, *P. italiensis*, *P. lepidus*, *P. nanus*, *P. neoamplycephalus*, *P. similis*), nematodos de lesión (o de los prados) (*Pratylenchus* spp., *P. allenii*, *P. brachyurus*, *P. coffeae*, *P. convallariae*, *P. crenatus*, *P. flakkensis*, *P. goodeyi*, *P. hexincisus*, *P. leiocephalus*, *P. minyus*, *P. musicola*, *P. neglectus*, *P. penetrans*, *P. pratensis*, *P. scribneri*, *P. thornei*, *P. vulnus*, *P. zaeae*), nematodos de agallas de los tallos (*Pterotylenchus cecidogenus*), nematodos de los quistes del pasto (*Punctodera punctate*), nematodos de atrofia (*Quinisolcius acutus*, *Q. capitatus*), nematodos barrenadores (*Radopholus* spp.), nematodos de la raíz del banano (*R. similis*), nematodos de la raíz del arroz (*R. oryzae*), nematodos de anillos rojos (o del cocotero o de la palmera) (*Rhadinaphelenchus cocophilus*), nematodos reniformes (*Rotylenchulus* spp., *R. reniformis*, *R. parvus*), nematodos espirales (*Rotylenchus* spp., *R. buxophilus*, *R. christiei*, *R. robustus*), nematodos de lanza de Thorne (*R. uniformis*), *Sarisdodera hydrophylla*, nematodos espirales (*Scutellonema* spp., *S. blaberum*, *S. brachyurum*, *S. bradys*, *S. clathricaudatum*, *S. christiei*, *S. conicephalum*), nematodos de agallas de la raíz del pasto (*Subanguina radicecola*), nematodos quistoides redondos (*Thecavermiculatus andinus*), nematodos de las raíces rechonchas (*Trichodorus* spp., *T. christiei*, *T. kurumeensis*, *T. pachydermis*, *T. primitivus*), anguillulas (o nematodos) del vinagre (*Turbatrix aceti*), nematodos de atrofia (o estilete) (*Tylenchorhynchus* spp., *T. agri*, *T. annulatus*, *T. aspericutis*, *T. claytoni*, *T. ebriensis*, *T. elegans*, *T. golden*, *T. graciliformis*, *T. martini*, *T. mashhoodi*, *T. microconus*, *T. nudus*, *T. oleraceae*, *T. penniseti*, *T. punensis*), nematodos de cítricos (*Tylenchulus semipenetrans*) y nematodos de daga (*Xiphinema* spp., *X. americanum*, *X. bakeri*, *X. brasiliense*, *X. brevicolle*, *X. chambersi*, *X. coxi*, *X. diversicaudatum*, *X. index*, *X. insigne*, *X. nigeriense*, *X. radicecola*, *X. setariae*, *X. vulgariae*, *X. vuittenezi*).

Los insectos fitopatógenos controlados por los métodos expuestos anteriormente incluyen pero sin limitación insectos distintos de larvas de *Culicidae* del orden (a) Lepidópteros, por ejemplo, *Acleris* spp., *Adoxophyes* spp., *Aegeria* spp., *Agrotis* spp., *Alabama argillaceae*, *Amylois* spp., *Anticarsia gemmatalis*, *Archips* spp., *Argyrotaenia* spp., *Autographa* spp., *Busseola fusca*, *Cadra cautella*, *Carposina nipponensis*, *Chilo* spp., *Choristoneura* spp., *Clysia ambiguella*, *Cnaphalocrocis* spp., *Cnephasia* spp., *Cochylis* spp., *Coleophora* spp., *Crociodomia binotalis*, *Cryptophlebia leucotreta*, *Cydia* spp., *Diatraea* spp., *Diparopsis castanea*, *Earias* spp., *Ephestia* spp., *Eucosma* spp., *Eupoecilia ambiguella*, *Euproctis* spp., *Euxoa* spp., *Grapholita* spp., *Hedya nubiferana*, *Heliothis* spp., *Hellula undalis*, *Hyphantria cunea*, *Keferia lycopersicella*, *Leucoptera scitella*, *Lithocollethis* spp., *Lobesia botrana*, *Lynmantria* spp., *Lyonetia* spp., *Malacosoma* spp., *Mamestra brassicae*, *Manduca sexta*, *Operophtera* spp., *Ostrinia nubilalis*, *Pammene* spp., *Pandemis* spp., *Panolis flammea*, *Pectinophora gossypiella*, *Phthorimaea operculella*, *Pieris rapae*, *Pieris* spp., *Plutella xylostella*, *Prays* spp., *Scirpophaga* spp., *Sesamia* spp., *Sparganothis* spp., *Spodoptera* spp., *Synanthedon* spp., *Thaumetopoea* spp., *Tortrix* spp., *Trichoplusia ni* y *Yponomeuta* spp.; (b) Coleópteros, por ejemplo, *Agriotes* spp., *Anthonomus* spp., *Atomaria linearis*, *Chaetocnema tibialis*, *Cosmopolites* spp., *Curculio* spp., *Dermestes* spp., *Diabrotica* spp., *Epilachna* spp., *Eremnus* spp., *Leptinotarsa decemlineata*, *Lissorhoptrus* spp., *Melolontha* spp., *Oryzaephilus* spp., *Otiorthynchus* spp., *Phlyctinus* spp., *Popillia* spp., *Psylliodes* spp., *Rhizophthera* spp., *Scarabeidae*, *Sitophilus* spp., *Sitotroga* spp., *Tenebrio* spp., *Tribolium* spp. y *Trogoderma* spp.; (c) Ortópteros, por ejemplo, *Blatta* spp., *Blattella* spp., *Gryllotalpa* spp., *Leucophaea maderae*, *Locusta* spp., *Periplaneta* spp. y *Schistocerca* spp.; (d) Isópteros, por ejemplo, *Reticulitermes* spp.; (e) Psocópteros, por ejemplo, *Liposcelis* spp.; (f) Anopluros, por ejemplo, *Haematopinus* spp., *Linognathus* spp., *Pediculus* spp., *Pemphigus* spp. y *Phylloxera* spp.; (g) Mallophaga, por ejemplo, *Damalinea* spp. y *Trichodectes* spp.; (h) Tisanópteros, por ejemplo, *Frankliniella* spp., *Hercinotrrips* spp., *Taeniothrips* spp., *Thrips palmi*, *Thrips tabaci* y *Scirtothrips aurantii*; (i) Heterópteros, por ejemplo, *Cimex* spp., *Distantiella theobroma*, *Dysdercus* spp., *Euchistus* spp., *Eurygaster* spp., *Leptocoris* spp., *Nezara* spp., *Piesma* spp., *Rhodnius* spp., *Sahlbergella singularis*, *Scotinophara* spp. y *Tiatoma* spp.; (j) Homópteros, por ejemplo, *Aleurothrixus floccosus*, *Aleyrodes brassicae*, *Aonidiella* spp., *Aphididae*, *Aphis* spp., *Aspidiotus* spp., *Bemisia tabaci*, *Ceroplaster* spp., *Chrysomphalus aonidium*, *Chrysomphalus dictyospermi*, *Coccus hesperidum*, *Empoasca* spp., *Eriosoma larigerum*, *Erythroneura* spp., *Gascardia* spp., *Laodelphax* spp., *Lecanium corni*, *Lepidosaphes* spp., *Macrosiphus* spp., *Myzus* spp., *Nephotettix* spp., *Nilaparvata* spp., *Paratoria* spp., *Pemphigus* spp., *Planococcus* spp., *Pseudaulacaspis* spp., *Pseudococcus* spp., *Psylla* spp., *Pulvinaria aethiopica*, *Quadraspidotus* spp., *Rhopalosiphum* spp., *Saissetia* spp., *Scaphoideus* spp., *Sitizaphis* spp., *Sitobion* spp., *Trialeurodes vaporariorum*, *Trioza erythraeae* y *Unaspis citri*; (k) Himenópteros, por ejemplo, *Acromyrmex*, *Atta* spp., *Cephus* spp., *Diprion* spp., *Diprionidae*, *Gilpinia polytoma*, *Hoplocampa* spp., *Lasius* spp., *Monomorium pharaonis*, *Neodiprion* spp., *Solenopsis* spp. y *Vespa* spp.; (l) Dípteros, por ejemplo, *Aedes* spp., *Antherigona soccata*, *Bibio hortulanus*, *Calliphora erythrocephala*, *Ceratitis* spp., *Chrysomyia* spp., *Culex* spp., *Cuterebra* spp., *Dacus* spp., *Drosophila melanogaster*, *Fannia* spp., *Gastrophilus* spp., *Glossina* spp., *Hypoderma* spp., *Hyppobosca* spp., *Liriomyza* spp., *Lucilia* spp., *Melanagromyza* spp., *Musca* spp., *Oestrus* spp., *Orseolia* spp., *Oscinella frit*, *Pegomyia hyoscyami*, *Phorbia* spp., *Rhagoletis pomonella*, *Sciara* spp., *Stomoxys* spp., *Tabanus* spp., *Tannia* spp. y *Tipula* spp.; (m) Sifonápteros, por ejemplo, *Ceratophyllus* spp. y *Xenopsylla cheopis* y (n) del orden Tisanuros, por ejemplo, *Lepisma saccharina*.

Las composiciones plaguicidas desveladas en el presente documento pueden usarse para combatir los alticinos (*Phyllotreta* spp.), gusanos de las raíces (*Delia* spp.), gorgojo de la colza (*Ceutorhynchus* spp.) y áfidos en cultivos de semillas oleaginosas, tales como canola (colza), semilla de mostaza, e híbridos de los mismo, y también arroz y maíz. En una realización particular, el insecto es un miembro de *Spodoptera*, más en particular, *Spodoptera exigua*, *Myzus persicae*, *Plutella xylostella* o *Euschistus* sp.

Se proporciona aplicación de una cantidad eficaz de control plaguicida de una composición plaguicida como se desvela en el presente documento. Dicha composición plaguicida se aplica, sola o en combinación con otra sustancia plaguicida, en una cantidad eficaz de control de plagas o plaguicida. Una cantidad eficaz se define como la cantidad de composición plaguicida, sola o en combinación con otra sustancia plaguicida, que es suficiente para prevenir o modular la infestación por plagas. La cantidad y velocidad eficaz pueden verse afectadas por la especie de la plaga presentes, la etapa de crecimiento de la plaga, la densidad de población de la plaga y factores ambientales tales como temperatura, velocidad del viento, lluvia, hora del día y estacionalidad. La cantidad que estará dentro de un intervalo eficaz en un caso particular puede determinarse mediante pruebas de laboratorio o de campo.

Métodos de aplicación

Las composiciones plaguicidas desveladas en el presente documento, cuando se usan en métodos para modular la infestación por plagas, pueden aplicarse usando métodos conocidos en la técnica. De manera específica, estas composiciones pueden aplicarse a plantas o partes de plantas mediante pulverización, inmersión, aplicación al sustrato de crecimiento (p. ej., suelo) alrededor de la planta, aplicación a la zona de la raíz, inmersión de las raíces antes de plantar, aplicación a las plantas como un césped o un rociado, mediante irrigación o como gránulos del suelo. Debe entenderse que las plantas en el presente contexto significan todas las plantas y poblaciones de plantas tales como plantas silvestres o plantas de cultivo deseadas e indeseadas (incluyendo plantas de cultivo de origen natural). Las plantas de cultivo pueden ser plantas obtenidas mediante métodos convencionales de fitomejoramiento y optimización, mediante métodos biotecnológicos y de ingeniería genética o por combinaciones de estos métodos, incluyendo plantas transgénicas y cultivares de plantas que pueden ser protegidos o no por los derechos de los obtentores. Debe entenderse que las partes de plantas significan todas las partes y órganos de plantas por encima y por debajo del suelo, tales como brote, hoja, flor y raíz, siendo ejemplos que se pueden mencionar hojas, agujas, cañas, tallos, flores, cuerpos fructíferos, frutas, semillas, raíces, tubérculos y rizomas. Las partes de plantas también incluyen material cosechado y material de propagación vegetativa y generativa, por ejemplo, esquejes, tubérculos, rizomas, retoños y semillas.

La aplicación puede ser externa (p. ej., por pulverización, nebulización o pintura) o interna (p. ej., mediante inyección, transección o el uso de un vector de insecto). Cuando se aplica de manera interna, las composiciones pueden ser intracelulares o extracelulares (p. ej., presentes en el sistema vascular de la planta, presentes en el espacio extracelular).

Puede llevarse a cabo tratamiento de las plantas y partes de las plantas con las composiciones expuestas anteriormente de manera directa o permitiendo que las composiciones actúen en el entorno de la planta, su hábitat o el espacio de almacenamiento, por ejemplo, mediante inmersión, pulverización, evaporación, nebulización, dispersión, pintura, inyección. En el caso en que la composición se aplique a una semilla, la composición se puede aplicar a la semilla como una o más capas antes de plantar la semilla usando métodos conocidos en la técnica.

También se pueden aplicar a semillas composiciones plaguicidas como se desvelan en el presente documento; p. ej., como un recubrimiento de semilla. Pueden usarse diferentes adherentes ("adhesivos") en la fabricación de recubrimientos de semillas, incluyendo, por ejemplo, metilcelulosa, alginato, carragenina y alcohol polivinílico. El adherente se disuelve en agua hasta un porcentaje entre 1 y 10 % y se almacena a temperatura ambiente antes de la aplicación a las semillas. Las semillas se empapan en solución adherente (3 ml/100 semillas) durante 15 min, se extraen y se mezclan con materia orgánica (1,5 g/100 semillas) en bolsas de plástico y se agitan vigorosamente. Este proceso también puede automatizarse usando una máquina de recubrimiento de semillas.

Para preparar semillas con composiciones como se desvela en el presente documento, las semillas se empapan en dos veces el volumen de las semillas de agua destilada estéril que contiene suspensiones bacterianas/proteicas/de ácido nucleico o formulación de talco (formulación seca) (4-10 g kg⁻¹ de semillas, dependiendo del tamaño de la semilla) y se incuban a 25 ± 2 °C durante 12-24 h. Después se evacúa la suspensión y se secan las semillas a la sombra durante 30 min y se usan para siembra.

Las composiciones también se pueden usar como enmiendas del suelo, p. ej., en combinación con un vehículo tal como una formulación de talco. Las formulaciones para enmienda del suelo también incluyen arcillas, emulsionantes, tensioactivos y estabilizadores, como se conocen en la técnica. Para la preparación de formulaciones a base de talco, un kg de polvo de talco purificado (esterilizado durante 12 h), 15 g de carbonato de calcio y 10 g de carboximetil celulosa se mezclan en condiciones asépticas después del método descrito por Nandakumar *et al.* (2001). La proteína, las suspensiones de ácido nucleico u organismos que los expresan se mezclan en una relación 1:2,5 (suspensión con respecto a mezcla seca) y el producto se seca a la sombra para reducir el contenido de humedad a 20-35 %.

Para enmienda del suelo, se pueden aplicar formulaciones (p. ej., formulaciones de talco) a tasas entre 2,5 y 10 kg ha⁻¹ en el momento de la siembra y/o en momentos diferentes después de la aparición, o ambos, dependiendo de los cultivos.

5 Las composiciones desveladas en el presente documento también se pueden aplicar usando métodos conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, el sitio web de USDA en naldc.nal.usda.gov/download/43874/pdf, al que se accedió el 20 de febrero de 2013. Dichos métodos incluyen, pero sin limitación, fumigación, irrigación por goteo o quimigación, aplicación por difusión de gránulos o pulverizaciones, incorporación al suelo (p. ej., aplicación de gránulos), rociado del suelo, tratamiento y revestimiento de semillas e inmersión de raíces desnudas.

10

Transformación de plantas

Los ácidos nucleicos desvelados en el presente documento pueden introducirse, y opcionalmente expresarse, en plantas, usando cualquiera de varias técnicas de transformación de plantas. La transformación de plantas puede llevarse a cabo con una única especie de ADN o múltiples especies de ADN (es decir, cotransformación).

15

En determinadas realizaciones, se expresa una proteína o un polipéptido de *C. subtsugae* (p. ej., una toxina) en una planta y proporciona protección a la planta de plagas de insectos. Por ejemplo, puede insertarse una secuencia de nucleótidos como se desvela en el presente documento en un casete de expresión, que, opcionalmente, puede integrarse de manera estable en el cromosoma de una planta. En determinadas realizaciones, la secuencia de nucleótidos se incluye en un virus autorreplicante, no patógeno. Las plantas transformadas de acuerdo con la presente divulgación pueden ser monocotiledóneas o dicotiledóneas, e incluyen, pero sin limitación, maíz, trigo, cebada, centeno, batata, judía, guisante, achicoria, lechuga, repollo, coliflor, brócoli, nabo, rábano, espinaca, espárrago, cebolla, ajo, pimienta, apio, calabaza, calabaza gigante, cáñamo, calabacín, manzana, pera, membrillo, melón, ciruela, cereza, albaricoque, fresa, papaya, aguacate, mango, plátano, alfalfa, arroz, patata, berenjena, melocotón, algodón, zanahoria, tabaco, sorgo, nectarina, remolacha azucarera, caña de azúcar, girasol, soja, tomate, piña, uva, frambuesa, mora, pepino, *Arabidopsis* y plantas leñosas tales como coníferas y árboles caducifolios.

20

25

Una vez que la secuencia de nucleótidos deseada se ha introducido en una especie vegetal en particular, se puede propagar en esa especie o transferir a otras variedades de la misma especie, incluyendo, en particular, variedades comerciales, usando técnicas de cultivo tradicionales.

30

Se puede introducir ADN en células vegetales mediante el uso de varios métodos reconocidos en la técnica. Los expertos en la materia apreciarán que la elección de métodos puede depender del tipo de planta a la que se dirige la transformación. Los siguientes son métodos adecuados para transformar células vegetales.

35

Transformación mediada por *Agrobacterium*

Un método importante de transferencia de ADN en plantas es la transformación mediada por *Agrobacterium*. La bacteria del suelo natural *Agrobacterium tumefaciens* es capaz de infectar una amplia gama de especies vegetales, provocando enfermedades de agallas de corona. Cuando *A. tumefaciens* infecta una célula, transfiere una copia de su ADN-T, que es una sección pequeña de ADN portada en su plásmido Ti (inductor de tumor). El ADN-T está flanqueado por dos repeticiones (imperfectas) de 25 pares de bases. Cualquier ADN contenido en estos límites se transferirá a la célula hospedadora. Zupan y Zambryski, 1995. La sección de ADN-T del plásmido Ti puede reemplazarse por un transgén unido a una secuencia o secuencias reguladoras adecuadas. Puede usarse entonces *A. tumefaciens* recombinante que contiene un plásmido Ti que comprende secuencias de nucleótidos exógenas para infectar cultivos de células o protoplastos regenerativos (es decir, células vegetales esféricas sin pared). Pueden incluirse en la construcción plasmídica Ti genes marcadores tales como los que codifican resistencia a antibióticos, de modo que es posible seleccionar células que se han transformado por la bacteria. Se lleva a cabo regeneración de células a plantas en las células seleccionadas por métodos convencionales. Véase, por ejemplo, Zupan y Zambryski (1995) y Jones *et al.* (2005) *Plant Methods*.

40

45

50

Puede usarse *Agrobacterium tumefaciens* para transformar muchas especies de plantas dicotiledóneas con relativa facilidad. Hinchee *et al.*, *Biotechnology* 6: 915-921 (1988). Véase también Ishida *et al.*, *Nature Biotechnology* 14:745-750 (junio de 1996) para una descripción de la transformación del maíz.

55

Suministro biolístico

Este método, también conocido como "bombardeo de partículas", implica "disparar" directamente una molécula de ADN en el tejido vegetal receptor, usando una "pistola génica". Se recubren perlas de wolframio u oro (que son menores que las células vegetales en sí mismas) con el ADN de interés y se disparan a través de una pantalla de detención, aceleradas por helio, al tejido vegetal. Las partículas pasan a través de las células vegetales, dejando el ADN dentro. Este método puede usarse en especies tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas con éxito. Puede seleccionarse tejido transformado usando genes marcadores tales como los que codifican resistencia a antibióticos. Pueden regenerarse plantas completas, que contienen una copia del transgén en todas las células, a partir de las células transformadas totipotentes en cultivo, usando dispositivos disponibles de Agracetus, Inc. (Madison, WI) y

60

65

Dupont, Inc. (Wilmington, DE).

- Se conocen en la técnica métodos para transformación de plantas por biolística. Véase, por ejemplo, Sanford *et al.*, patente de los Estados Unidos n.º 4.945.050; McCabe *et al.*, *Biotechnology* 6: 923-926 (1988); Weissinger *et al.*, Annual Rev Genet. 22:421-477 (1988); Sanford *et al.*, *Particulate Science and Technology* 5:27-37 (1987) (cebolla); Svab *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:8526-8530 (1990) (cloroplasto del tabaco); Christou *et al.*, *Plant Physiol* 87, 671-674 (1988) (soja); McCabe *et al.*, *BioTechnology* 6: 923-926 (1988) (soja); Klein *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 4305-4309 (1988) (maíz); Klein *et al.*, *BioTechnology* 6, 559-563 (1988) (maíz); Klein *et al.*, *Plant Physiol*, 91, 440-444 (1988) (maíz); Fromm *et al.*, *BioTechnology* 8: 833-839 (1990); Gordon-Kamm *et al.*, *Plant Cell* 2: 603-618 (1990) (maíz); Koziel *et al.*, *Biotechnology* 11: 194-200 (1993) (maíz); Shimamoto *et al.*, *Nature* 338: 274-277 (1989) (arroz); Christou *et al.*, *Biotechnology* 9: 957-962 (1991) (arroz); Datta *et al.*, *BioTechnology* 8: 736-740 (1990) (arroz); solicitud de patente europea EP 0 332 581 (*Dactylis* y otros Pooideae); Vasil *et al.*, *Biotechnology* 11: 1553-1558 (1993) (trigo); Weeks *et al.*, *Plant Physiol*, 102: 1077-1084 (1993) (trigo); Wan *et al.*, *Plant Physiol*, 104: 37-48 (1994) (cebada); Jahne *et al.*, *Theor. Appl. Genet.* 89: 525-533 (1994) (cebada); Umbeck *et al.*, *BioTechnology* 5: 263-266 (1987) (algodón); Casas *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 11212-11216 (diciembre de 1993) (sorgo); Somers *et al.*, *BioTechnology* 10: 1589-1594 (diciembre de 1992) (avena); Torbert *et al.*, *Plant Cell Reports* 14: 635-640 (1995) (avena); Weeks *et al.*, *Plant Physiol*, 102: 1077-1084 (1993) (trigo); Chang *et al.*, documento WO 94/13822 (trigo) y Nehra *et al.*, *The Plant Journal* 5:285-297 (1994) (trigo).
- Pueden encontrarse métodos para la introducción de moléculas de ADN recombinante en el maíz mediante bombardeo de microproyectiles en Koziel *et al.*, *Biotechnology* 11: 194-200 (1993), Hill *et al.*, *Euphytica* 85: 119-123 (1995) y Koziel *et al.*, *Annals of the New York Academy of Sciences* 792: 164-171 (1996).

Transformación por protoplastos y otros métodos

- Otro método para la introducción de moléculas de ácidos nucleicos en plantas es el método de transformación por protoplastos para el maíz como se desvela en el documento EP 0 292 435. Los sistemas adicionales de suministro de genes de transferencia incluyen electroporación (Riggs *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83,5602-5606 (1986), microinyección (Crossway *et al.*, *BioTechniques* 4, 320-334 (1986), transferencia de ADN mediada por carburo de silicio, transferencia génica directa (Paszkowski *et al.*, *EMBO J.* 3. 2717-2722 (1984); Hayashimoto *et al.*, *Plant Physiol* 93. 857-863 (1990) (arroz).

Transformación por plastidios

- En otra realización, una secuencia de nucleótidos como se desvela en el presente documento se transforma directamente en el genoma de un plastidio (p. ej., cloroplasto). Las ventajas de la transformación por plastidios incluyen la capacidad de los plastidios para expresar genes bacterianos sin modificación sustancial de las secuencias bacterianas y la capacidad de los plastidios para expresar múltiples fases abiertas de lectura bajo el control de un único promotor. Se describe la transformación por plastidios en las patentes de los Estados Unidos n.º 5.451.513; 5.545.817 y 5.545.818; en la solicitud de PCT n.º WO 95/16783 y en McBride *et al.* (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 7301-7305.

- La técnica básica para la transformación por cloroplastos implica introducir regiones de ADN de plastidios clonados que flanquean un marcador seleccionable, junto con el gen de interés, en un tejido diana adecuado usando, p. ej., biolística o transformación por protoplastos (p. ej., cloruro de calcio o transformación mediada por PEG). Las regiones flanqueantes de 1 a 1,5 kb, denominadas secuencias de direccionamiento, facilitan la recombinación homóloga con el genoma del plastidio y permiten, por tanto, el reemplazo o la modificación de regiones específicas del genoma del plastidio. Inicialmente, se utilizaron mutaciones puntuales en el ARNr 16S de cloroplasto y genes de *rps12* que confieren resistencia a espectinomicina y/o estreptomycinina como marcadores seleccionables para transformación (Svab, Z. *et al.*, (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 8526-8530; Staub, J. M. y Maliga, P. (1992) *Plant Cell* 4, 39-45); lo que da lugar a la producción de transformantes homoplásmicos estables a una frecuencia de aproximadamente uno por cada 100 bombardeos de hojas diana. La presencia de sitios de clonación entre estos marcadores permitió la creación de un vector de direccionamiento de plastidios para la introducción de genes exógenos. Staub, J. M. y Maliga, P. (1993) *EMBO J.* 12: 601-606. Se obtuvieron aumentos sustanciales en la frecuencia de transformación mediante el reemplazo del ARNr recesivo o genes de resistencia a antibióticos de proteína r con un marcador seleccionable dominante, el gen de AADA bacteriano que codifica la enzima destoxicante de espectinomicina aminoglucósido-3' adeniltransferasa. Svab, Z. y Maliga, P. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 913-917. Anteriormente, este marcador se ha usado con éxito para transformación de alta frecuencia del genoma del plastidio del alga verde *Chlamydomonas reinhardtii*. Goldschmidt-Clermont, M. (1991) *Nucl. Acids Res.* 19: 4083-4089.

- Se conocen en la técnica otros marcadores seleccionables útiles para la transformación por plastidios y están abarcados dentro del alcance de la presente divulgación. Normalmente, son necesarios aproximadamente 15-20 ciclos de división celular después de la transformación para alcanzar un estado homoplásmico. La expresión de plastidios, en la que se insertan genes mediante recombinación homóloga en todas las miles de copias del genoma de plastidio circular presente en cada célula vegetal, aprovecha la ventaja del enorme número de copias, en comparación con genes nucleares, para lograr niveles de expresión que pueden superar fácilmente 10 % de la proteína vegetal soluble.

Por tanto, en determinadas realizaciones, una secuencia de nucleótidos como se desvela en el presente documento se inserta en un vector de dirección de plastidios y se transforma en el genoma de plastidio de un hospedador vegetal deseado. Se obtienen plantas homoplásticas para genomas de plastidios que contienen una secuencia de nucleótidos de interés y tienen capacidad para expresión a alto nivel de la secuencia de nucleótidos.

5

Magnificación

La magnificación es un proceso de expresión transitoria que se basa en la expresión de replicones de ARN vírico suministrados a células vegetales de manera sistémica usando *Agrobacterium*. Este método permite la producción de proteínas recombinantes a rendimientos de hasta 5 g por kg de biomasa de hojas frescas, lo que se aproxima a los límites biológicos para la expresión de proteínas. Dichos rendimientos altos son posibles debido a la naturaleza transitoria del proceso, lo que permite el uso de amplicones muy potentes procedentes de virus de ARN tales como el virus del mosaico del tabaco (TMV) o virus X de la patata, sin limitar la acumulación de la biomasa, lo que tiene lugar antes de la infección. Véase, p. ej., Marillonnet *et al.* (2005) Nature Biotechnol. 23 (6): 718-723.

10

15

Se proporciona una divulgación adicional de métodos y composiciones para ingeniería genética de plantas en Bircher, JA (ed.) "Plant Chromosome Engineering: Methods and protocols". Methods in Molecular Biology, vol. 701, Springer Science + Business Media, 2011.

20

Plantas y semillas transgénicas

Pueden cultivarse plantas transgénicas procedentes de las células vegetales para generar plantas transgénicas que tienen un rasgo mejorado en comparación con una planta de control y producir semilla transgénica y polen haploide de la presente invención. Dichas plantas con rasgos mejorados se identifican mediante selección de plantas transformadas o semilla descendiente para el rasgo mejorado. Para mayor eficacia, se diseña un método de selección para evaluar múltiples plantas transgénicas (acontecimientos) incluyendo el ADN recombinante, por ejemplo, múltiples plantas de 2 a 20 o más acontecimientos transgénicos. Las plantas transgénicas cultivadas a partir de semillas transgénicas proporcionadas en el presente documento demuestran rasgos agronómicos mejorados que contribuyen al aumento del rendimiento u otro rasgo que proporcione mayor valor a la planta, incluyendo, por ejemplo, mejor calidad de la semilla. Son de interés particular plantas que tengan mejor eficacia de uso del agua, mejor tolerancia al frío, mayor rendimiento, mejor eficacia del uso del nitrógeno, mejor proteína de la semilla o mejor aceite de la semilla. Las plantas transgénicas incluyen, pero sin limitación, maíz, soja, algodón, canola, alfalfa, trigo, arroz, caña de azúcar, semilla de remolacha azucarera, mijo, cebada, cacahuete, guandú, sorgo, verduras (incluyendo, pero sin limitación, brócoli, coliflor, repollo, rábano, repollo chino, melones, sandías, pepino, calabazas, calabaza gigante, calabaza, pimienta, tomate, berenjena, cebolla, zanahoria, alubia, maíz dulce, guisante, alubia seca, oca, espinaca, puerro, lechuga e hinojo), uva, bayas (incluyendo arándano, zarzamora, frambuesa, morera, boysenberry, etc.), cereza y árboles frutales relacionados (incluyendo, pero sin limitación, ciruela, melocotón, albaricoque, kiwi, granada, mango, higo), árboles frutales (incluyendo, pero sin limitación, naranja, limón, cal, naranja sanguina, pomelo y similares), árboles de frutos secos (incluyendo, pero sin limitación, cocotero, nogal (europeo y negro americano), pacana, almendra, avellana, nuez de Brasil, nuez de caria, bellota y similares), girasol, otras plantas productoras de semillas oleaginosas o cualquier combinación de los mismos.

25

30

35

40

Promoción del crecimiento de plantas

Las composiciones desveladas en el presente documento, en particular, ácidos nucleicos y polipéptidos de *C. subtsugae*, pueden usarse para modular o, más en particular, promover el crecimiento de plantas, p. ej., cultivos tales como fruta (p. ej., fresa), verduras (p. ej., tomate, calabaza, pimienta, berenjena), cultivos de grano (p. ej., soja, trigo, arroz, maíz), árboles, flores, plantas ornamentales, arbustos (p. ej., algodón, rosas), plantas bulbosas (p. ej., cebolla, ajo), plantas trepadoras (p. ej., vid) y césped (p. ej., grama, poa de los prados, festucas). Las composiciones también se pueden usar para modular la germinación de una semilla o semillas en una planta o plantas.

45

50

Se pueden usar ácidos nucleicos y polipéptidos de *C. subtsugae* o un producto formulado de los mismos solos o en combinación con uno o más componentes adicionales como se describe posteriormente, tales como agentes promotores de crecimiento y/o agentes antifitopatógenos en una mezcla de tanque o en un programa (aplicación secuencial denominada rotación) con orden e intervalo de aplicación predeterminados durante la temporada de crecimiento. Cuando se usan en combinación con los productos anteriormente mencionados, a una concentración menor que la recomendada en la etiqueta del producto, la eficacia combinada de los dos o más productos (uno de los cuales es dicha composición desvelada en el presente documento) es, en determinadas realizaciones, mayor que la suma del efecto de cada componente individual. Por lo tanto, el efecto es mejorado por la sinergia entre estos dos (o más) productos y se reduce el riesgo para el desarrollo de resistencia a plaguicidas entre las cepas patógenas de plantas.

55

60

La composición se puede aplicar mediante inmersión de la raíz en el trasplante, específicamente al tratar una fruta o verdura con la composición al sumergir raíces de la fruta o verdura en una suspensión de dicha composición (de aproximadamente 0,25 a aproximadamente 1,5 % y, más en particular, de aproximadamente 0,5 % a aproximadamente 1,0 % en volumen) antes de trasplantar la fruta o verdura al suelo.

65

Como alternativa, la composición se puede aplicar mediante inmersión u otro sistema de irrigación. De manera específica, la composición se puede inyectar en un sistema de irrigación por goteo. En una realización particular, la composición se aplica en una solución que tiene una concentración de 1×10^8 UFC/ml a una tasa de aproximadamente 2,75 a aproximadamente 1 litro por hectárea (11 a 4 cuartos por acre).

En otra realización más, la composición puede añadirse como una aplicación en surcos. De manera específica, la composición puede añadirse como una pulverización en surcos en la siembra usando boquillas calibradas para suministrar una cantidad total de 18,71-56,12 l/ha (2-6 galones/acre). Las boquillas pueden situarse en la reja de la plantadora, de modo que la aplicación de plaguicida y la caída de la semilla en el surco son simultáneas.

Se preparan mezclas de las composiciones desveladas, por ejemplo, con un adyuvante sólido o líquido como se conoce en la técnica. Por ejemplo, pueden prepararse mezclas mezclando y/o moliendo de manera homogénea los principios activos con extensores tales como disolventes, vehículos sólidos y, cuando sea adecuado, compuestos activos en superficie (tensioactivos). Las composiciones también pueden contener ingredientes adicionales tales como estabilizadores, reguladores de la viscosidad, aglutinantes, adyuvantes así como fertilizantes u otros principios activos para obtener efectos deseados adicionales.

Combinaciones con agentes promotores del crecimiento de plantas

Las composiciones desveladas en el presente documento pueden usarse en combinación con otros agentes promotores del crecimiento tales como fertilizantes sintéticos u orgánicos (p. ej., fosfato diamónico, en forma granular o líquida), téis de compost, extractos de algas marinas, hormonas del crecimiento de plantas tales como IAA (ácido acético de indol) usadas en un tratamiento de hormonas del enraizamiento para trasplantes solos o en combinación con reguladores del crecimiento de plantas tales como IBA (ácido butírico de indol) y NAA (ácido acético de naftaleno), microbios promotores del crecimiento, tales como, por ejemplo, metilótrofos, PPFM (metilótrofos facultativos pigmentados en rosa), *Bacillus* spp., *Pseudomonas*, *Rhizobia* y *Trichoderma*.

Tratamiento de semillas/agentes de recubrimiento

Las composiciones desveladas en el presente documento también se pueden usar en combinación con agentes de recubrimiento de semillas. Dichos agentes de recubrimiento de semilla incluyen, pero sin limitación, etilenglicol, polietilenglicol, quitosano, carboximetil quitosano, musgo de turbera, resinas y ceras o fungicidas químicos o bactericidas con un modo de acción de un sitio individual, multisitio o desconocido.

Los métodos de tratamiento de semillas descritos en el presente documento pueden usarse en relación con cualquier especie de planta y/o las semillas de la misma. En diversas realizaciones, sin embargo, los métodos se usan en relación con semillas de especies vegetales que son agrónomicamente importantes, en particular, las semillas pueden ser de maíz, cacahuete, canola/colza, soja, cucurbitáceas, crucíferas, algodón, remolachas, arroz, sorgo, remolacha azucarera, trigo, cebada, centeno, girasol, tomate, caña de azúcar, tabaco, avena, así como otros cultivos de verduras y de cobertura. En algunas realizaciones, la semilla es semilla de maíz, soja o algodón. La semilla puede ser una semilla transgénica a partir de la que puede cultivarse una **planta transgénica** e incorpora un acontecimiento transgénico que confiere, por ejemplo, tolerancia a un herbicida o una combinación de herbicidas en particular, mayor resistencia a enfermedades, mayor tolerancia a la tensión y/o aumento del rendimiento. Las semillas transgénicas incluyen, pero sin limitación, semillas de maíz, soja y algodón.

Agentes antifitopatógenos

Las composiciones desveladas en el presente documento también se pueden usar en combinación con otros agentes antifitopatógenos, tales como extractos vegetales, bioplaguicidas, protectores de cultivos inorgánicos (tales como cobre), tensioactivos (tales como ramnolípidos; Gandhi *et al.*, 2007) o aceites naturales tales como aceite de parafina y aceite del árbol del té que poseen propiedades plaguicidas o fungicidas o bactericidas químicos con modo de acción de un solo sitio, multisitio o desconocido. Como se define en el presente documento, un "agente antifitopatógeno" es un agente que modula el crecimiento de un patógeno vegetal, en particular un patógeno que provoca enfermedad portada por el suelo en una planta o, como alternativa, previene la infección de una planta por un patógeno vegetal. Los patógenos vegetales incluyen, pero sin limitación, hongos, bacterias, actinomicetos y virus.

Un agente antifitopatógeno puede ser un agente antifúngico de un solo sitio que puede incluir, pero sin limitación, bencimidazol, un inhibidor de la desmetilación (DMI) (p. ej., imidazol, piperazina, pirimidina, triazol), morfolina, hidroxipirimidina, anilino pirimidina, fosforotiolato, inhibidor externo de quinona, quinolina, dicarboximida, carboximida, fenilamida, anilino pirimidina, fenilpirrol, hidrocarburo aromático, ácido cinámico, hidroxianilida, antibiótico, polioxina, acilamina, ftalimida, bencenoide (xililalanina). En una realización más particular, el agente antifúngico es un inhibidor de la desmetilación seleccionado del grupo que consiste en imidazol, piperazina, pirimidina y triazol (p. ej., bitertanol, miclobutanilo, penconazol, propiconazol, triadimefón, bromuconazol, ciproconazol, diniconazol, fenbuconazol, hexaconazol, tebuconazol, tetraconazol). En una realización más particular, el agente antifúngico es miclobutanilo. En otra realización particular más, el agente antifúngico es un inhibidor externo de quinona (p. ej., estrobilurina). La

estrobilurina puede incluir, pero sin limitación, azoxistrobina, cresoxim-metilo o trifloxistrobina. En otra realización particular más, el agente antifúngico es una quinona, p. ej., quinoxifeno (éter de 5,7-dicloro-4-quinolil 4-fluorofenilo).

5 En una realización adicional más, el fungicida es un fungicida no inorgánico multisitio seleccionado del grupo que consiste en cloronitrilo, quinoxalina, sulfamida, fosfonato, fosfito, ditiocarbamato, cloralquitos, fenilpiridin-amina y oxima de ciano-acetamida.

10 En una realización adicional más, el agente antifitopatígeno puede ser estreptomicina, tetraciclina, oxitetraciclina, cobre o kasugamicina.

Biorremediación

15 El genoma de *C. subtsugae* codifica genes implicados en el metabolismo de, entre otros, fósforo, hierro y compuestos aromáticos. Véase, p. ej., tabla 6 mencionada anteriormente. Dichos genes y sus productos génicos pueden usarse en métodos de biorremediación. Por ejemplo, pueden introducirse en plantas, mediante ingeniería genética, genes y secuencias relacionados con el transporte de metales, la acumulación de metales, la degradación de compuestos orgánicos y otra transformación de metabolitos con el fin de aplicar la planta transformada a biorremediación de suelos, sedimento, agua y otros sustratos contaminados. Se conocen protocolos para la transformación de mostaza india (*Brassica juncea*), girasol (*Helianthus annuus*), tomate y tulípero (*Liriodendron tulipifera*). Véase, p. ej., Eapen y D'Souza (2005); Mello-Farias y Chavez (2008).

25 Las plantas pueden transformarse con genes que codifican el citocromo P450 para aumentar su resistencia a contaminantes en particular, tanto orgánicos como inorgánicos. La transformación con ácidos nucleicos que codifican enzimas implicadas en la conjugación del glutatión (por ejemplo, glutatión S-transferasas) puede aumentar las tasas de destoxificación xenobiótica. Pueden usarse plantas que expresan nitrorreductasas bacterianas para la destoxificación de compuestos orgánicos de nitrato, tales como explosivos.

30 Se han descrito usos de plantas transgénicas para aplicaciones de fitorremediación, por ejemplo, en Abhilash *et al.* (2009); Van Aken *et al.* (2010); Doty (2008) y Macek *et al.* (2008).

La tabla 2 a continuación indica información adicional de la presente divulgación sobre proteínas de *Chromobacterium substaque*.

Tabla 2

| Nombre de la proteína | Función | PM aparente (SDS-PAGE) | Secuencias de nucleótidos | Secuencias de aminoácidos | Homología |
|-----------------------|---------|------------------------|---|---|---------------------------------|
| Scotti | | ~20 kDa | <p>>fig16666666.22288.peg.2223[MBI-203 sp.] [proteína hipotética] atgtcttgaclaccgattttctggagAACCCGcaggttca tgcgttctcagcgatattgattccggcgaggtccgccc ggcaacggcaaataccagttccggcgaggtccgcca cggcggtgctgctgagtcaccgcccgccagccggaaca tcccggttttaccgctccatccggtggccaacaacatcaat ctgttctgctgccccaccgagccggccaaggtattacat gttaaccgagggcattgaaagcctgctgctgctccclac gggccggacagggcagcaatacaccgctcagacacaaca ctctatcggcgacccgacgctacgctcggcggcctgctg ggaggtgggtggcgaagccggcctctctgctgctatc agcccgctgggttcaataacaaccggccggccaatc aacagccagcaggggtgaacatcctgctggcgaaacgg ccaggccaacggctgctgctggtgctgggacagggt ggaaccagaaccaggcaccggtgctgctgctgctgtaa (SEQ ID NO: 4)</p> | <p>MSLTTDFLENPQA FMRSQAILIPAQVP PGNGKYQFAAQG AHAAVLQSTAAASP NIPGFYAHFVANN INLFVLTQQPAR YYMFTDGMINGCQ FLAYGPDRQHITV EHNFIGDPTRYA ARLAEVWALKPA YLLHISPSGVNNIP AGQYNSQQGVNI VGEYGOANGWRF WWRDRVDQINQGT VYGPL (SEQ ID NO: 1)</p> | <p>Extracelular, secretada.</p> |

(continuación)

| Nombre de la proteína | Función | PM aparente (SDS-PAGE) | Secuencias de nucleótidos | Secuencias de aminoácidos | Homología |
|-----------------------|---------|------------------------|--|--|--|
| | | | <p>atgagaaaacagcaatgatgctggtggtgctgctcc gccctgctgctgctcagctcggcggcctgctgcccggag cgtatcgaccctggaaaagctgggcaagatccaggccaac ggccgctgctgctcaccgctgaaaccagctgctg aagccctgctgctcagcaaccattcggcccgcaagtg gtagcccttcctcagcagtaactaccaggctgctgctat gggcgcaagcctgctgctgagaaaacacaggccggcgc cgtggccaagcaccagggcaactatccggccaatacat cgcggcatccagctcagaccctgctcggccaagccgac gttgacagcggcccgctgtagccaggccaaatcgt gaaggccaacggcaatcccaccctcaatcagaaagccg acctagctgctgctgaaacagcgaacacccggcccagc tggctacactgctgctgctgctgctgctgcaaggagccc agccggccaccctgctcagcagccaacacaggcca ggtgctgaagcagctgggaaggcctgaaccacggcaag ccaacggccggcggcaaccgaagaccggcaagat gctacggcaccgactacgctgctgctgctcaccagcg atgcaagatgtagcggcaacgctgcccacgctcaacct caacggcggcaacggcggcaaccacccgtaacagctg cctgcccgaacacacacacaaagcagatcaaggcgtt actgcccctgaaagcggcactactctcggcaagctggt gttcaacctgtaacaggaactgctcaacctgaagccgataca accagaagctgctgataaggctcactacagccgcaact acgaaaacgctctggaacggcaccgctgactctg ggaagcggccagcaacctctaccctgctgctgctg acgtgtccgctgcaatgagctcagccagctcaccgagc agaacctggcctgctcactcagcggccagctccgggca tcaacgaggcaactcctcagcagctgcccggcaagccg agtactacatgaaggcgaagaacgactcctgctgctg cggaaatctcaagaaagaccggcggcctgctgctgctg cgtaccgcaacagcggcaccatcagatggcaacgcca aggactactcagcggcctgacgtgcaactattccagcgg cgtgtaacaacaaggccttaccctgctcaccaccgccc aactggaacaccggcaaggctgtaagctgctgctgacg ccaacggcctgctcagcggcgaacccaccctacaaca ggcggctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctg ggctacaacagcggcagctcaccaggcctcaccgca gtcggctgactgcaataa (SEQ ID NO:6) proteasa (EC 3.4.24.25) en pseudolisina, proteasa de cinc extracelular (EC 3.4.24.26)]</p> | <p>ANGAVAFTGVNQ ADLKPLRSTQFAT GKVVTRFQQYYQ GVPVWGEAVVEE KQAGAVAKTSGK LSGQYIAGIQSDLA SAKPTLSSAQALS QAKSLKANGNPT YNEKADLVRLN ERNTAQLVLYVSF WDGKEPSRPHLII DANNQQVLKQWE GLNHAEANGPGG NAKTKYVYVYGD YGPLIVTSDCKMD SGNVATVNLNGG TSGTTPYKFCAPT NTKAINGAYSPL NDAHYFGNWFN LYKDWFLKPINQ KLLMKVHYSRNY ENAFWDGTAMTF GDGASTFYPLVSL DVSAHEVSHGFTE QNSGLVYDQSGG GINEAFSDMAGEA AEYVMKGNDFL VGAEIFKKTGALR YFADPTKDGQSIG NAKDYDGLDVH YSSGVYNKAFYLI ATSPNWNTRKAFE VFVDANRLYWTA NATYNSAACGGW KAADARGYNSAD VTKAFTAVGVTC K (SEQ ID NO: 3)</p> | <p>vibriolisina, pseudolisina extracelular, proteasa de cinc</p> |

Como se usa en la presente memoria descriptiva y en las reivindicaciones, las palabras "comprendiendo" (y cualquier forma de comprender, tal como "comprenden" y "comprende"), "teniendo" (y cualquier forma de tener, tal como "tienen" y "tiene"), "incluyendo" (y cualquier forma de incluyendo, tal como "incluye" e "incluyen") o "conteniendo" (y cualquier forma de conteniendo, tal como "contiene" y "contienen") son inclusivas o abiertas y no excluyen elementos o etapas de métodos adicionales que no se hayan mencionado.

La expresión "o combinaciones de los mismos" como se usa en el presente documento se refiere a todas las permutaciones y combinaciones de los artículos enumerados antes de la expresión. Por ejemplo, se entiende que "A, B, C o combinaciones de los mismos" incluye al menos uno de: A, B, C, AB, AC, BC o ABC, y, si el orden es importante en un contexto particular, también BA, CA, CB, CBA, BCA, ACB, BAC o CAB. Continuando con este ejemplo, se incluyen expresamente combinaciones que contienen repeticiones de uno o más artículos o términos, tales como BB, AAA, AB, BBC, AAABCCCC, CBBAAA, CABABB y así sucesivamente. El experto en la materia entenderá que normalmente no hay ningún límite para el número de artículos o términos en ninguna combinación, a menos que resulte evidente de otro modo por el contexto.

Todas las composiciones y/o métodos desvelados y reivindicados en el presente documento pueden realizarse y ejecutarse sin excesiva experimentación a la luz de la presente divulgación. Si bien las composiciones y los métodos de la presente invención se han descrito en términos de realizaciones preferidas, resultará evidente para los expertos en la materia que se pueden aplicar variaciones en las composiciones y/o los métodos, y en las etapas o en la secuencia de etapas del método descrito en el presente documento sin alejarse de las reivindicaciones de la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1: Cultivo celular y extracción de ADN

Se cultivó *Chromobacterium subtsugae* PRAA-1 en 200 ml de caldo de cultivo LB en matraces de 1 l a 26 °C con rotación a 150 rpm durante 24-48 horas. Se recogió biomasa del cultivo mediante centrifugación.

Se extrajo ADN genómico usando el equipo de extracción de ADN microbiano MoBio Power Maxi (MoBio Cat n.º 12223-25). Se eluyó ADN en 1,5 ml de tampón de elución (incluido en el equipo). Para evaluar la calidad y cantidad del ADN, se cargó una alícuota de 10 µl en un gel de agarosa al 1,5 % y se realizó electroforesis durante 30 minutos a 100 V. Se visualizó el ADN usando un transiluminador UV usando colorante de carga EZ-Vision. Se recuperaron más de 100 µg de ADN.

Ejemplo 2: Determinación y ensamblaje de la secuencia de ADN

Se determinaron secuencias de ADN usando un HiSeq 2000 (Illumina, San Diego, CA), con lecturas de secuencia de 100 pb, con extremos emparejados, orientadas a una cobertura mínima de 40x. Los datos finales consistieron en dos conjuntos de muestras de extremos emparejados en formato FASTQ, que proporcionan una cobertura aproximadamente 200x del genoma.

Se usaron los cuatro archivos de FASTQ para ensamblaje. Las secuencias de FASTQ se sometieron a control de calidad usando FASTQC y se calculó la distancia promedio entre pares comparando los primeros 10.000 pares de ambos conjuntos con los contigios ensamblados iniciales usando BWA. Li y Durbin (2009) *Bioinformatics* **25** (14): 1754-1760. Después se usó TrimGalore (Babraham Bioinformatics, Cambridge, Reino Unido) para generar dos conjuntos de extremos emparejados de alta calidad y cuatro archivos de única lectura para las secuencias cuya lectura de compañero fue menor que el umbral de calidad de al menos 50 nucleótidos después de cortar en Q2.

Se ensamblaron lecturas de secuencias usando el ensamblador Ray v2.0.0. Boisvert *et al.* (2010) *J Comput Biol.* **17** (11): 1519-1533. Se realizó una valoración de los tamaños en kmeros con un intervalo de kmeros de 19-63; lo que da lugar a ensamblajes exitosos en 19, 21, 31, 41, 47, 49 y 63. Se realizaron armazones adicionales usando SSPACE v1.1 usando todas las lecturas disponibles en los armazones producidos por el análisis de Ray. Boetzer *et al.* (2011) *Bioinformatics* **27** (4): 578-579. Los huecos se conectaron usando GapFiller, con una iteración máxima de veinte etapas. Boetzer y Pirovano (2012) *Genome Biol.* **13** (6): R56. Los armazones resultantes se mapearon frente al genoma de referencia de *Chromobacterium violaceum* ATCC 12742, usando CONTIGuator con un valor de e de 1e-10. Galardini *et al.* (2011) *Source Code Biol. Med.* **6**: 11.

Para confirmar los órdenes de contigios y armazones, las alineaciones se inspeccionaron manualmente usando ACT. Carver *et al.* (2008) *Bioinformatics* **24** (23): 2672-2676. El conjunto de datos original se mapeó de nuevo en la secuencia de *Chromobacterium subtsugae* usando BWA (Li y Durbin, mencionado anteriormente) con una longitud de semilla de 19.

Este proceso produjo un genoma de alta calidad de 4.690.330 bases con un total de 145.992 bases en contigios que no coinciden con el genoma de referencia (*Chromobacterium violaceum*) y 4.264 nucleótidos sin definir (N) en 42 huecos. El posterior relleno de los huecos n pseudocóntigos cerró 8 de los 42 huecos y extendió los pseudocóntigos hasta 4.704.820 bases donde la mayoría de los huecos son posiciones 'N' individuales con solo 2 huecos restantes

en las posiciones 2.153.178 - 2.153.283 (105 bases) y 2.474.439 - 2.474.486 (47 bases).

Ejemplo 3: Exploración de proteínas para determinar la actividad insecticida de falsos medidores

5 Las proteínas 1-3 (SEQ ID NO: 4-6, respectivamente) se fraccionaron mediante un procedimiento de FPLC convencional.

10 Se almacenaron placas de dieta en un recipiente tapado en el refrigerador de bioensayo (4 °C). Todas las pruebas de eficacia se realizaron con un mínimo de seis diluciones y dos repeticiones de las diluciones (pocillos) por placa y un mínimo de 40 pocillos en total para cada dilución. Se usó agua desionizada como control negativo. Todas las proteínas candidatas y el patrón se diluyeron en serie hasta un mínimo de seis diluciones, (es decir, 16 %, 8 %, 4 %, 2 %, 1 % y 0,05 %). Partiendo de la dilución más baja, se pipetearon 100 µl de cada dilución de tratamiento en cada pocillo. La placa se trasladó a una campana de gases con un ventilador de habitación pequeño. El ventilador se encendió y se apuntó hacia la placa en un ángulo tal que el líquido en los pocillos se viera afectado por el flujo de aire. Los pocillos estaban lo suficientemente secos para que pudiera colocarse una larva neonata en cada pocillo sin que se ahogara. Solo se usaron falsos medidores de primera etapa a segunda etapa temprana para las placas de 96 pocillos. Usando un pincel fino, se trasladó una única larva pequeña de su área de cría a un pocillo. La infestación continuó hasta que todos los pocillos tenían larvas. Se realizó un orificio pequeño en la tapa sobre cada pocillo para ventilación, usando un mondadientes u otra herramienta de punta pequeña. La placa se situó en una cámara de temperatura controlada a 26 °C y la mortalidad se puntuó a los 3 a 4 días después de la adición de insectos. La mortalidad de los insectos se determinó examinando las larvas en cada pocillo. Después se determinó la mortalidad promedio para cada dilución. 20 Las tablas 3-6 muestran la mortalidad de los falsos medidores lograda por la cantidad de Scott 1-3 (SEQ ID NO: 4-6).

Tabla 3 (Scott1; SEQ ID NO: 1 o 4)

| Descripción de la muestra | % de mortalidad | | % de mortalidad corregido | |
|--|-----------------|-------|---------------------------|--------|
| | Día 3 | Día 4 | Día 3 | Día 4 |
| Fracción de scott1 capturada, 0,22 mg/ml | 15,00 | 25,00 | 12,821 | 23,077 |
| Fracción de scott1 capturada, 0,11 mg/ml | 5,00 | 5,00 | 2,564 | 2,564 |
| Fracción de scott1 capturada, 0,06 mg/ml | 5,00 | 5,00 | 2,564 | 2,564 |
| Fracción de scott1 capturada, 0,03 mg/ml | 5,00 | 5,00 | 2,564 | 2,564 |
| Control negativo (agua) | 2,50 | 2,50 | | |
| Fracción de scott1 capturada, 0,224 mg/ml | 9,17 | 8,33 | 9,167 | 8,333 |
| Fracción de scott1 capturada, 0,448 mg/ml | 16,67 | 20,83 | 16,667 | 20,833 |
| Fracción de scott1 capturada, 0,896 mg/ml | 41,25 | 65,42 | 41,250 | 65,417 |
| Control negativo (agua) | 0,00 | 0,00 | | |
| Scott1 parcialmente purificado, 2,9 mg/ml | 31,67 | 53,70 | 28,696 | 51,691 |
| Scott1 parcialmente purificado, 5,7 mg/ml | 46,67 | 94,44 | 44,348 | 94,203 |
| Scott1 parcialmente purificado, 11,5 mg/ml | 48,33 | 88,89 | 46,087 | 88,406 |
| Control negativo (agua) | 4,17 | 4,17 | | |

25

Tabla 4 (scott2; SEQ ID NO: 2 o 5)

| Descripción de la muestra | % de mortalidad | | % de mortalidad corregido | |
|--|-----------------|-------|---------------------------|-------|
| | Día 3 | Día 4 | Día 3 | Día 4 |
| Proteasa de 20 k parcialmente purificada 0,5 mg/ml | 33,33 | 33,33 | 30,43 | 30,43 |
| Proteasa de 20 k parcialmente purificada 0,5 mg/ml con Ca y Zn 10 mM | 55,56 | 72,22 | 53,62 | 71,01 |
| Control negativo (agua) | 4,17 | 4,17 | | |

(continuación)

| Descripción de la muestra | % de mortalidad | | % de mortalidad corregido | |
|--|-----------------|-------|---------------------------|-------|
| | Día 3 | Día 4 | Día 3 | Día 4 |
| Proteasa de 20 kDa parcialmente purificada 0,5 mg/ml con Ca y Zn 10 mM | 71,33 | 83,00 | 71,33 | 82,11 |
| Control negativo (agua) | 0,00 | 5,00 | | |
| Proteasa de 20 kDa parcialmente purificada 0,5 mg/ml | 22,22 | 22,22 | 21,13 | 20,00 |
| Control negativo (agua) | 1,39 | 2,78 | | |
| Proteasa de 20 kDa parcialmente purificada 0,5 mg/ml | 22,22 | 22,22 | 19,71 | 17,65 |
| Control negativo | 3,13 | 5,56 | | |

Tabla 5 (scott3, SEQ ID NO: 3 o 6)

| Descripción de la muestra | % de mortalidad | | % de mortalidad corregido | |
|---|-----------------|-------|---------------------------|-------|
| | Día 3 | Día 4 | Día 3 | Día 4 |
| Proteasa de 35 kDa parcialmente purificada, 0,25 mg/ml | 7,41 | 7,41 | 3,38 | 3,38 |
| Proteasa de 35 kDa parcialmente purificada, 0,25 mg/ml con Ca y Zn 10 mM | 18,52 | 24,07 | 14,98 | 20,77 |
| Control negativo (agua) | 4,17 | 4,17 | | |
| Proteasa de 35 kDa parcialmente purificada, 0,125 mg/ml | 0,00 | 0,00 | 0,00 | -5,26 |
| Proteasa de 35 kDa parcialmente purificada, 0,125 mg/ml con Ca y Zn 10 mM | 4,00 | 6,67 | 4,00 | 1,75 |
| Control negativo (agua) | 0,00 | 5,00 | | |
| Proteasa de 35 kDa parcialmente purificada 0,5 mg/ml | 74,07 | 74,07 | 73,71 | 73,33 |
| Control negativo (agua) | 1,39 | 2,78 | | |
| Proteasa de 35 kDa parcialmente purificada 0,5 mg/ml | 51,85 | 57,41 | 50,30 | 54,90 |
| Control negativo (agua) | 3,13 | 5,56 | | |

Ejemplo 4: Transformación de tomate (*Solanum lycopersicum*) con *Agrobacterium*

5 El siguiente procedimiento está adaptado a partir de Sharma, M.K. *et al.* 2009. "A simple and efficient *Agrobacterium*-mediated procedure for transformation of tomato". *Journal of Biosciences* 34: 423-433.

Medios y soluciones

10 La composición de diversos medios se describe en la tabla 6. Los componentes de los medios, excepto agar, se combinan según la tabla 6 y se ajustan a pH 5,8 usando IN KOH, antes de añadir agar de uso en cultivo de tejido vegetal. Se preparan soluciones de reserva de BAP (6-bencilamino purina) y zeatina en dimetilsulfóxido (DMSO). Se preparan soluciones de reserva de antibióticos en agua desionizada y se esterilizan por filtración. Se cultiva la cepa de *Agrobacterium* AGL1 en agar YEM o caldo de cultivo que contiene rifampicina 100 mg/l y kanamicina 50 mg/l.

Preparación de *Agrobacterium*

20 Se cultiva *Agrobacterium tumefaciens*, transformado con el gen o los genes de interés (p. ej., cualquiera de los genes desvelados en las SEQ ID NO: 1-6) en medio YEM con rifampicina y kanamicina, en cultivo de agitación durante 72 h a 28 °C y 200 rpm. Las células se sedimentan mediante centrifugación, se lavan y se resuspenden en medio WS. La densidad bacteriana se determina midiendo la DO₆₀₀ y la concentración celular final se ajusta a ~10⁸ células/ml diluyendo con medio WS.

Transformación de plantas

25 Se recogen trozos intermedios (0,7 x 1,0 cm) de cotiledones de 10 días escindiendo en la punta y la base. Las secciones se precultivan durante 48 horas a 28 °C en medio M1, con la superficie adaxial en contacto directo con el

medio.

5 Se seleccionan plantas sanas y se incuban en suspensión de *Agrobacterium* durante 30 minutos, con inversión cada 10 minutos. Los explantes se secan en papel de seda estéril y se devuelven a agar M1 (50-80 explantes por placa) durante 72 horas más. Después los explantes se lavan 4-5 veces en medio WS, se secan en papel de seda estéril y se transfirieron a SM que contenía trans-zeatina 1 mg/l para regeneración (20-25 explantes por placa de regeneración).

10 Se incuban placas de regeneración a 28 °C en un ciclo de luz/oscuridad 16/8. La regeneración se demuestra por el desarrollo de un callo. Se seleccionan explantes regenerados y se transfieren a medio SM nuevo cada 15 días.

Pueden escindir-se brotes regenerados del callo y transferirse a medio RM.

15 Se seleccionan plántulas que están al menos a 5,08 cm (2 pulgadas) de altura y tienen raíces fuertes para transferencia a macetas. El sustrato de siembra consiste en suelo de siembra en maceta mezclado 1:1 con vermiculita 1:1:1: perlita: esfagno.

Tabla 6

| | M1 | M2 | WS | SM | RM |
|---------------------------------------|------|-----|----|-----|-----|
| Sales de MS (Murashige y Skoog, 1962) | 0,5x | 1x | 1x | 1x | 1x |
| Vitaminas B5 de Gamborg | 0,5x | 1x | 1x | 1x | 1x |
| Sacarosa (g/l) | 15 | 30 | 30 | 30 | 30 |
| Agar (% p/v) | 0,8 | 0,8 | 0 | 0,8 | 0,8 |
| BAP (mg/l) | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| Kanamicina (mg/l) | 0 | 0 | 0 | 100 | 100 |
| Cefotaxima (mg/l) | 0 | 0 | 0 | 500 | 500 |

20 **Ejemplo 5: Creación de plantas de soja transgénica que comprenden un gen insecticida de *Chromobacterium subtsugae***

25 Las semillas de *Glycine max* maduras se esterilizan en superficie con gas de cloro dentro de un vidrio abombado bajo una campana de gases. Las semillas se mantienen en placas de Petri de 100 x 20 mm con gas de cloro producido al verter 100 ml de hipoclorito de sodio 4 % en un vaso de precipitados y añadiendo 5 ml de ácido clorhídrico 12 N. Después de la esterilización, se sitúan semillas en medio de germinación (GM; sales basales de MS con vitaminas, sacarosa al 3 %, agar de plantas 0,8 % y BAP 1 mg/l, optimizado a partir del experimento de regeneración, pH 5,8). Murashige y Skoog, 1962. Las semillas se germinan bajo luz fluorescente y oscuridad a 24 ± 1 °C durante 5-7 días para comparar la frecuencia de transformación.

30 El método descrito aquí es una modificación del descrito en Zhang *et al.* (1999) Plant Cell, Tissue and Organ Culture 56: 37-46. Se obtienen dos explantes de cotiledones realizando un corte horizontal a través del hipocótilo con una hoja quirúrgica del n.º 11. A continuación se retira el hipocótilo y se realizan diez raspados en la superficie de regiones de nódulos de los cotiledones. Los explantes se sumergen durante 30 minutos en una suspensión de *A. tumefaciens* que se ha modificado por ingeniería genética para que comprenda el gen de interés, p. ej., un gen que codifica una proteína insecticida o una proteína que está implicada en la síntesis de un compuesto insecticida. Véase tabla 2 para listados de genes de interés ilustrativos. Después de la inmersión, se colocan aleatoriamente diez explantes en papel de filtro estéril situado en medio de cocultivo sólido (CM; sales basales B5 de Gamborg con vitaminas, sacarosa al 3 %, MES 20 mM, L-cisteína 3,3 mM, ditiotreititol 1 mM, acetosiringona 0,1 mM, agar vegetal al 0,8 %, pH 5,4) (Gamborg *et al.*, 40 1968) en placas de Petri de 100 x 20 mm y se incubaron a 24 ± 1 °C durante 5 días en condiciones de oscuridad.

45 Después de 5 días de cocultivo, los explantes se lavaron brevemente en medio de inducción de brotes líquido (SIM; sales basales B5 de Gamborg con vitaminas, sacarosa al 3 %, MES 3 mM, BAP 1,67 mg/l, cefotaxima 250 mg/l, pH 5,7) para eliminar el exceso de *A. tumefaciens* en explantes. Después se transfieren explantes a SIM solidificado sin PPT para estimular la inducción de brotes durante los primeros 14 días, después de lo cual los explantes se subcultivan en SIM nuevo que contiene 5 mg/l de PPT para selección de brotes transformados. Los brotes organogénicos de los explantes se recortan y después se transfieren a medio de elongación de brotes (SEM; sales basales de MS con vitaminas, sacarosa al 3 %, MES 3 mM, ácido giberélico 0,5 mg/l, asparagina 50 mg/l, zeatina 1 mg/l, ácido indol-3- 50 acético 0,1 mg/l, cefotaxima 250 mg/l, vancomicina 50 mg/l, agar vegetal al 0,8 %, PPT 5 mg/l, pH 5,7). Los explantes se transfieren a medio SEM nuevo cada 14 días y los brotes supervivientes se plantan en medio de inducción de raíces (RIM; sales basales de MS con vitaminas, sacarosa al 3 %, ácido naftaleno acético 1 mg/l, agar vegetal al 0,8 %, pH 5,7) y se cultivan hasta que se desarrollan raíces. Tras la aclimatación, las plantas transgénicas se trasplantan a suelo

de siembra en macetas y se mantienen en un invernadero. Se lleva a cabo selección mediante PCR. Véase también Lee, *et al.* (2011) J. of Korean Soc. Appl. Biol. Chem. 54: 37-45.

Ejemplo 6: Exploración de proteínas con respecto a actividad insecticida para falsos medidores (*Trichoplusia ni*) (CL), *Lygus* (*Lygus hesperus*), gardamas de la remolacha (*Spodoptera exigua*) (BAW) y palomilla de dorso diamante (*Plutella xylostella*) (DBM)

Las proteínas se purificaron parcialmente mediante intercambio catiónico fuerte y cromatografía de interacción hidrófoba. Se estimó la concentración de proteína usando el ensayo de Invitrogen Quant-iT o Qubit calibrado con BSA. A menos que se indique otra cosa, scott1 (SEQ ID NO: 1 o 4) se presentó para bioensayo a 5 mg/ml, scott2 (SEQ ID NO: 2 o 5) a 1 mg/ml y scott3 (SEQ ID NO: 3 o 6) a 1 mg/ml de cantidades totales de proteína. Las proteínas se tamponaron a pH 6 en MES 20 mM o pH 7,5 con Tris 20 mM. A scott2 se añadió ZnCl₂ y CaCl₂ hasta 5 mM.

La actividad contra los falsos medidores (repetida en comparación con el ejemplo 3), la gardama de la remolacha y la palomilla de dorso diamante se probó en bioensayos de superposición de dieta. La dieta artificial adecuada para el insecto se distribuyó en cada pocillo de una placa de 96 pocillos convencional y se dejó secar. Una vez que la dieta se hubo solidificado, se pipetearon 100 ul del tratamiento en el número adecuado de pocillos y se dejó secar. Se administró una única larva de primera etapa a cada pocillo de una placa de 96 pocillos. Se puntuó la mortalidad a los 4 días después del tratamiento.

La actividad contra *Lygus* se probó en un bioensayo de dieta artificial de la siguiente manera: Se prepararon paquetes de dietas combinando la cantidad adecuada de dieta artificial de *Lygus* y solución de tratamiento de reserva. Las mezclas se agitaron vorticialmente y se distribuyeron uniformemente entre los paquetes de dieta. Las ninfas, 10-12 *Lygus* de segunda o tercera etapa, se colocaron en una placa de Petri, se cubrieron con una tapa de malla y se sellaron con Parafilm. La mortalidad se puntuó a los 4 días después de la exposición a la dieta tratada.

La eficacia se expresa como el porcentaje de mortalidad a los 4 días después del tratamiento. Los resultados (por duplicado) en % de mortalidad se muestran en la tabla 7. Scott1 se preparó a 4,9 mg/ml para el primer ensayo de *Lygus*. Scott3 se preparó a 0,42 mg/ml para el primer ensayo de *Lygus* y a 0,82 mg/ml para el primer ensayo de falso medidor.

Tabla 7

| | % de mortalidad de CL | | Lygus | | BAW | | DBM | |
|--------|-----------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Scott1 | 90,91 | 100 | 21,98 | 12,5 | 8,33 | 0 | 95,83 | 77,08 |
| Scott2 | 100 | 92,86 | 22,88 | 19,3 | 25 | 33,33 | 58,33 | 95,83 |
| Scott3 | 63,64 | 100 | 7,54 | 15,21 | 29,17 | 33,33 | 95,83 | 70,83 |

Las invenciones descritas y reivindicadas en el presente documento no están limitadas en su alcance por los aspectos específicos desvelados en el presente documento, ya que se pretende que estos aspectos sean ilustrativos. De hecho, diversas modificaciones de los métodos y composiciones mostrados y descritos en el presente documento resultarán evidentes para los expertos en la materia a partir de la descripción anterior. En caso de conflicto, prevalecerá la presente divulgación, incluyendo las definiciones.

Bibliografía:

Martin, P. A. W., D. Gundersen-Rindal, *et al.* (2007a). "Chromobacterium subtsugae sp. nov., a betaproteobacterium toxic to Colorado potato beetle and other insect pests". Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 57: 993-999.

Martin, P.A.W., A. D. S. Shropshire, *et al.*, (2007b). "Chromobacterium subtsugae sp. nov for control of insect pests" patente de los Estados Unidos 7244607 B2.

Martin, P. A. W., (2004). "A freeze-dried diet to test pathogens of Colorado potato beetle" Biological Control. 29: 109-114.

Hegedus, D., Erlandson, M., Gillott, C., Toprak, U.; (2009). "New insights into peritrophic matrix synthesis, architecture, and function". Annu Rev Entomol. 54: 285-302.

Lepore, L. S., Roelvink, P. R., Granados, R. R.; (1996). "Enhancin, the granulosis virus protein that facilitates nucleopolyhedrovirus (NPV) infections, is a metalloprotease". J Invertebr Pathol. 68: 131-40.

Wang, P., Granados, R. P.; (1997). "An intestinal mucin is the target substrate for a baculovirus enhancin". Proc Natl Acad Sci USA. 94: 6977-6982.

- Galloway, C. S., Wang, P., Winstanley, D., Jones, I. M.; (2005). "Comparison of the bacterial Enhancin-like proteins from *Yersinia* and *Bacillus* spp. with a Baculovirus Enhancin". *J Invertebr Pathol.* 90: 134-7.
- 5 Hajaj-Ellouze, M., Fedhila, S., Lereclus, D., Nielsen-LeRoux, C.; (2006). "The enhancin-like metalloprotease from the *Bacillus cereus* group is regulated by the pleiotropic transcriptional activator P1cR but is not essential for larvicidal activity". *FEMS Microbiol Lett.* 260: 9-16.
- 10 Konno, K., Hirayama, C., Nakamura, M., Tamura, Y., Hattori, M., Kohno, K.; (2004). "Papain protects papaya trees from herbivorous insects: role of cysteine proteases in latex". *The Plant Journal*, 37: 370-378.
- Harrison, R. L., Bonning, B. C.; (2010). "Proteases as Insecticidal Agents" *Toxins (Basel)*. 2: 935-953.
- 15 Freimoser F.M., Screen S., Bagga S., Hu G., St Leger R.J.; (2003) "Expressed sequence tag (EST) analysis of two subspecies of *Metarhizium anisopliae* reveals a plethora of secreted proteins with potential activity in insect hosts". *Microbiology.* 149: 239-247.
- 20 Cho, E-M., Liu, L., Farmerie, W., Keyhani, N. O.; (2006). "EST analysis of cDNA libraries from the entomopathogenic fungus *Beauveria (Cordyceps) bassiana* I. Evidence for stage-specific gene expression in aerial conidia, *in vitro* blastospores and submerged conidia". *Microbiology*, 152: 2843-2854.
- Leger, R. J. S., Charnley, A. K., Cooper, R. M.; (1987) "Characterization of cuticle-degrading proteases produced by the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*". *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 253: 221-232.
- 25 Leger, R. J. S., Joshi, L., Bidochka, M. J., Roberts, D. W.; (1996) "Construction of an improved mycoinsecticide overexpressing a toxic protease" *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93: 6349-6354.
- Harrison R.L., Bonning B.C (2004). "Basement membrane degrading proteases as insect toxins and methods of use for same". patente de los Estados Unidos n.º 6.673.340 B1
- 30 Lu, D., Pava-Ripoll, M., Li, Z., Wang, C.; (2008). "Insecticidal evaluation of *Beauveria bassiana* engineered to express a scorpion neurotoxin and a cuticle degrading protease". *Applied Microbiology and Biotechnology.* 81: 515-522.
- 35 Abad A. R. *et al* (2009). "Nucleic acids encoding CRY8BB1 endotoxins engineered to have insect-specific protease recognition sequences". patente de los Estados Unidos n.º 7.473.821 B2
- Harrison, R. L., Bonning, B.; (2001). "Use of Proteases to Improve the Insecticidal Activity of Baculoviruses". *Biological Control.* 20: 199-209.
- 40 Homma, K-I., Natori, S.; (1996). "Identification of Substrate Proteins for Cathepsin L that are Selectively Hydrolyzed During the Differentiation of Imaginal Discs of *Sarcophaga peregrina*". *Eur. J. Biochem.* 240: 443-447.
- 45 Li, Z., Yi, Y., Yin, X., Zhang, Z., Liu, J.; (2008). "Expression of Foot-and-Mouth Disease Virus Capsid Proteins in Silkworm-Baculovirus Expression System and Its Utilization as a Subunit Vaccine". *PLoS ONE*, 3: e2273
- Tang, H., Li, H., Lei, S. M., Harrison, R. L., Bonning, B. C.; (2007). "Tissue specificity of a baculovirus-expressed, basement membrane-degrading protease in larvae of *Heliothis virescens*". *Tissue Cell.* 39: 431-43.
- 50 Philip, J. M., Fitches, E., Harrison, R. L., Bonning, B., Gatehouse, J. A.; (2007). "Characterisation of functional and insecticidal properties of a recombinant cathepsin L-like proteinase from flesh fly (*Sarcophaga peregrina*), which plays a role in differentiation of imaginal discs". *Insect Biochem Mol Biol.* 37: 589-600.
- 55 Price, D. R., Bell, H. A., Hinchliffe, G., Fitches, E., Weaver, R., Gatehouse, J. A.; (2009). "A venom metalloproteinase from the parasitic wasp *Eulophus pennicornis* is toxic towards its host, tomato moth (*Lacanobia oleraceae*)". *Insect Mol Biol.* 18: 195-202.
- Kutsukake, M., Nikoh, N., Shibao, H., Rispe, C., Simon, J. C., Fukatsu, T.; (2008). "Evolution of soldier-specific venomous protease in social aphids". *Mol Biol Evol.* 25: 2627-41.
- 60 Caldas, C., Cherqui, A., Pereira, A., Simões, N.; (2002). "Purification and characterization of an extracellular protease from *Xenorhabdus nematophila* involved in insect immunosuppression". *Appl Environ Microbiol.* 68: 1297-304.
- 65 Duchaud, E. *et al.*, (2003). "The genome sequence of the entomopathogenic bacterium *Photorhabdus luminescens*". *Nature Biotechnology*, 21: 1307-1313

- Henrissat, B., Bairoch, A.; (1993). "New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities". *Biochem. J.* 293 (Pt 3): 781-788.
- 5 Samues, R., Reynolds, S. E.; (1993). "Molting fluid enzymes of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*: Timing of proteolytic and chitinolytic activity in relation to pre-ecdysial development". *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 24: 33 - 44.
- 10 Merzendorfe, H., Zimoch, L.; (2003). "Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases". *J Exp Biol.* 206 (Pt 24): 4393-412.
- Lysenko, O.; (1976). "Chitinase of *Serratia marcescens* and its toxicity to insects". *J Invertebr Pathol* 27: 385-386
- 15 Ding, X., Gopalakrishnan, B., Johnson, L. B., White F.F., Wang, X., Morgan, T. D., Kramer, K. J., Muthukrishnan, S.; (1998). "Insect resistance of transgenic tobacco expressing an insect chitinase gene". *Transgenic Research*, 7: 77-84.
- Kramer, K. J., Hopkins, T. L., Schaefer, J.; (1995). "Applications of solids NMR to the analysis of insect sclerotized structures". *Insect Biochemistry and Molecular Biology.* 25: 1067-1080.
- 20 Leger, R. J. S., Cooper, R. M., Charnley, A. K.; (1986). "Cuticle-degrading Enzymes of Entomopathogenic Fungi: Regulation of Production of Chitinolytic Enzymes". *Microbiology* 132: 1509-1517.
- 25 Leger, R. J. S., May, B., Allee, L. L., Staples, R. C., Roberts, D. W.; (1992). "Genetic differences in allozymes and in formation of infection structures among isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*". *Journal of Invertebrate Pathology.* 60: 89-101.
- 30 Campos, R. A., Arruda, W., Boldo, J. T., Boldo, J. T., Da Silva, M. V., Da Barros, N. M., Da Azevedo, J. L., Schrank, A., Vainstein, M. H.; (2005). "Boophilus microplus Infection by *Beauveria amorpha* and *Beauveria bassiana*: SEM Analysis and Regulation of Subtilisin-like Proteases and Chitinases". *Current Microbiol.* 50: 257-261.
- 35 Kim, H. O., Yun, J. W.; (2005). "A comparative study on the production of exopolysaccharides between two entomopathogenic fungi *Cordyceps militaris* and *Cordyceps sinensis* in submerged mycelial cultures". *Applied Microbiolgy.* 99: 728-238.
- Kim, J. S., Roh, J. Y., Choi, J. Y., Wang, Y., Shim, H. J., Je, Y. H.; (2010). "Correlation of the aphicidal activity of *Beauveria bassiana* SFB-205 supernatant with enzymes". *Fungal Biology.* 114: 120-128.
- 40 Krishnan, A., Nair, P. N., Jones, D.; (1994). "Isolation, cloning, and characterization of new chitinase stored in active form in chitin-lined venom reservoir". *The Journal of Biological Chemistry* 269: 20971-20976.
- Wang, P., Granados, R. R.; (2001). "Molecular structure of the peritrophic membrane (PM): Identification of potential PM target sites for insect control". *Archives of insect Biochemistry and physiology.* 110-118.
- 45 Huber, M., Cabib, E., Miller, L. H.; (1991). "Malaria parasite chitinase and penetration of the mosquito peritrophic membrane". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 2807-2810.
- 50 Shahabuddin, M., Kaslow, D. C.; (1993) "Chitinase: a novel target for blocking parasite transmission?" *Parasitology Today* 9, 252-255.
- Regev, A., Keller, M., Strizhov, N., Sneh, B., Prudovsky, E., Chet, I., Ginzberg, I., Koncz-Kalman, Z., Koncz, C., Schell, J., Zilberstein, A; (1996). "Synergistic activity of a *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin and a bacterial endochitinase against *Spodoptera littoralis* larvae". *Applied & Environmental Microbiology.* 3581-3586.
- 55 Nandakumar, R., Babu, S., Viswanathan, R., Sheeka, J., Raguchander, T., Samiyappan, R. (2001), "A new bioformulation containing plant growth promoting rhizobacterial mixture for the management of sheath blight and enhanced grain yield in rice". *Bicontrol*, 46: 493-510.
- 60 Smirnov, W. A.; (1973). "The Possible Use of *Bacillus thuringiensis* Plus Chitinase Formulation for the Control of Spruce Budworm Outbreaks". *Journal of the New York Entomological Society* 81: 196-200.
- Sneh, B., Schuster, S., y Gross, S. (1983). Improvement of the insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* var. *entomocidus* on larvae of *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera-Noctuidae) by addition of chitinolytic bacteria, a phagostimulant and a UV-protectant. *Zeitschrift Fur Angewandte Entomologie*, 96: 77-83.
- 65 Zupan J. R. y Zambryski P.; (1995) "Transfer of T-DNA from *Agrobacterium* to the plant cell". *Plant Physiol.* 107,

1041-1047.

- 5 Busby, J. N., Landsberg, M. J., Simpson, R. M., Jones, S. A., Hankamer B., Hurst, M. R. H.M., SanunLott, J.; (2012). "Structural Analysis of Chi1 Chitinase from Yen-Tc: The Multisubunit Insecticidal ABC Toxin Complex of *Yersinia entomophaga*". *J. Mol. Biol.* 415: 359-371.
- 10 Jones, H.D., Angela, D., Wu, H.; (2005). "Review of methodologies and a protocol for the *Agrobacterium*-mediated transformation of wheat". *Plant Meth.* 1: 5.
- 15 Hawtin, R., Zarkowska, T., Arnold, K., Thomas, C. J., Gooday, G. W., King, L. A., Kuzio, J. A., Possee, R. D.; (1997). "Liquefaction of *Autographa californica* Nucleopolyhedrovirus-Infected Insects Is Dependent on the Integrity of Virus-Encoded Chitinase and Cathepsin Genes". *Virology*, 238: 243-253.
- 20 Assenga, S. P., You, M., Shy, C. H., Yamagishi, J., Sakaguchi, T. Zhou, J., Kibe, M. K., Xuan, X. Fujisaki, K.; (2006). "The use of a recombinant baculovirus expressing a chitinase from the hard tick *Haemaphysalis longicornis* and its potential application as a bioacaricide for tick control". *Parasitology Research.* 98: 111-118.
- 25 Lin, R-L., Capage, M., Hill, C. W.; (1984). "A repetitive DNA sequence, rhs, responsible for duplications within the *Escherichia coli* K-12 chromosome". *J. Mol. Biol.* 177: 1-18.
- 30 Jackson, A. P., Thomas, G. H., Parkhill, J., Thomson N. R.; (2009) "Evolutionary diversification of an ancient gene family (rhs) through C-terminal displacement". *BMC Genomics.* 10: 584.
- 35 Wang, Y-D., Zhao, S., Hill, C. W.; (1998). "Rhs Elements Comprise Three Subfamilies Which Diverged Prior to Acquisition by *Escherichia coli*". *J. Bacteriology.* 180: 4102-4110.
- 40 Hill, C. H., Sandt, C. H., Vlazny, D. A.; (1994). "Rhs elements of *Escherichia coli*: a family of genetic composites each encoding a large mosaic protein". *Molecular Biology.* 12: 865-871
- 45 Forst, S., Dowds, B., Boemare, N., Stackebrandt, E.; (1997). "XENORHABDUS AND PHOTORHABDUS SPP.: Bugs That Kill Bugs". *Annual Review of Microbiology.* 51: 47-72.
- 50 Bowen, D., Rocheleau, T. A., Blackburn, M., Andreev, O., Golubeva, E., Bhartia, R., Ffrench-Constant, R. H.; (1998). "Insecticidal toxins from the bacterium *Photorhabdus luminescens*". *Science.* 280: 2129-2132.
- 55 Bowen, D., Ensign, J. C.; (1998). "Purification and Characterization of a High-Molecular-Weight Insecticidal Protein Complex Produced by the Entomopathogenic Bacterium *Photorhabdus luminescens*". *Appl Environ Microbiol.* 64: 3029-3035.
- 60 Waterfield, N., Dowling, A., Sharma, S., Daborn, P. J., Potter, U., Ffrench-Constant R. H.; (2001). "Oral Toxicity of *Photorhabdus luminescens* W14 Toxin Complexes in *Escherichia coli*". *Appl Environ Microbiol.* 67: 5017-5024.
- 65 Waterfield, N. R., Bowen, D. J., Fetherston, J. D., Perry, R. D., Ffrench-Constant, R.H.; (2001). "The tc genes of *Photorhabdus*: A growing family". *Trends Microbiol.* 9: 185-191
- 70 Ffrench-Constant, R. H., Waterfield, N. R., Daborn, P., Joyce, S., Bennett, H., Au, C., Dowling, A., Boundy, S., Reynolds, S., Clarke, D.; (2003). "*Photorhabdus*: towards a functional genomic analysis of a symbiont and pathogen". *FEMS Microbiology Reviews.* 26: 433-456.
- 75 Grimont, P. D., Jackson T. A., Ageron, E., Noonan, M. J.; (1988). "*Serratia entomophila* sp. nov. Associated with Amber Disease in the New Zealand Grass Grub *Costelytra zealandica*". *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* 38: 1-6,
- 80 Glare, T. R., Corbett, G. E., Sadler, T. J.; (1993). "Association of a Large Plasmid with Amber Disease of the New Zealand Grass Grub, *Costelytra zealandica*, Caused by *Serratia entomophila* and *Serratia proteamaculans*". *Journal of Invertebrate Pathology* 62: 165-170
- 85 Hurst, M. R., Glare, T. R., Jackson, T. A., Ronson, C. W.; (2000). "Plasmid-Located Pathogenicity Determinants of *Serratia entomophila*, the Causal Agent of Amber Disease of Grass Grub, Show Similarity to the Insecticidal Toxins of *Photorhabdus luminescens*". *J. Bacteriol.* 182: 5127-5138.
- 90 Harada, H., Oyaizu, H., Ishikawa, H.; (1996). "A consideration about the origin of aphid intracellular symbiont in connection with gut bacterial flora". *J Gen Appl Microbiol* 42: 17-26.
- 95 Stayrinides, J., No, A., Ochman, H.; (2010). "A single genetic locus in the phytopathogen *Pantoea stewartii* enables gut colonization and pathogenicity in an insect host". *Environ. Microbiol.* 12: 147-155.

- Sun, J. S., Helene, C.; (1993). "Oligonucleotide-directed triple-helix formation". *Current Opinion in Structural Biology*. 3: 345-356.
- 5 Devereux, J., Haeblerli, P., Smithies, O.; (1984). "A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX". *Nucleic Acids Research*. 12: 387-395.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., Lipman, D. J.; (1990). "Basic local alignment search tool". *Journal of Molecular Biology*. 215: 403-410.
- 10 Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D. J.; (1997). "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs". *Nucleic Acids Research*. 25: 3389-3402.
- 15 Thompson, J. D., Higgins, D. G., Gibson, T. J.; (1994). "CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice". *Nucleic Acids Research*. 22: 4673-4680.
- 20 Fields, S., Song, O. K.; (1989). "A novel genetic system to detect protein-protein interactions". *Nature*. 340: 245-246.
- Merrifield, R. B.; (1963). "Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide". *J. Am. Chem. Soc.* 85: 2149-2154.
- 25 Bai, C., Elledge, S. J.; (1996). "Gene identification using the yeast two-hybrid system". *Methods in Enzymology*, 273: 331-347.
- Luo, Y., Batalao, A., Zhou, H., Zhu, L.; (1997). "Mammalian Two-Hybrid System: A Complementary Approach to the Yeast Two-Hybrid System". *BioTechniques*, 22.
- 30 Stanford, A., Bevan, M., Northcote, D.; (1989). "Differential expression within a family of novel wound-induced genes in potato". *Molecular and General Genetics MGG*. 15: 200-208
- 35 Xu, D., McElroy, D., Thornburg, R. W., Wu, R.; (1993). "Systemic induction of a potato pin2 promoter by wounding, methyl jasmonate, and abscisic acid in transgenic rice plants". *Plant Molecular Biology*. 22: 573-588
- Logemann, J., Lipphardt, S., Lörz, H., Häuser, I., Willmitzer, L., Schell, J.; (1993). "5' upstream sequences from the wun1 gene are responsible for gene activation by wounding in transgenic plants". *Plant cells*. 1: 151-158.
- 40 Rohrmeier T.; Lehle L.; (1993). "WIP1, a wound-inducible gene from maize with homology to Bowman-Birk proteinase inhibitors". *Plant Molecular Biology*. 22: 783-92.
- 45 Firek S., Ozcan., S., Warner, S.A.J., Draper J.; (1993). "A wound-induced promoter driving npt-II expression limited to dedifferentiated cells at wound sites is sufficient to allow selection of transgenic shoots". *Plant Molecular Biology*. 22: 129-42.
- 50 Warner, S. A. J., Scott, R., Draper, J.; (1993). "Isolation of an asparagus intracellular PR gene (AoPR1) wound-responsive promoter by the inverse polymerase chain reaction and its characterization in transgenic tobacco". *Plant J*. 3: 191-201.
- Gandhi, N. R., Skebba, V., Takemoto, J., Bensaci, M.; (2005). "Antimycotic rhamnolipid compositions and related methods of use". US20070191292A1.
- 55 Eapen, S., D'Souza, S. F.; (2005). "Prospects of genetic engineering of plants for phytoremediation of toxic metals". *Biotechnology Advances*. 23: 297-114.
- de Mello-Farias, P. C., Chaves, A., L., S.; (2008). "Advances in Agrobacterium-mediated plant transformation with emphasis on soybean". *Sci. Agric. (Piracicaba, Bras.)*. 65: 95-106.
- 60 Abhilash, P. C., Tamil, S., Singh, N.; (2009). "Transgenic plants for enhanced biodegradation and phytoremediation of organic xenobiotics". *Biotechnology Advances*. 27: 474-488.
- Van Aken, B., Tehrani, R., Schnoor, J. L. (Endophyte-Assisted Phytoremediation of Explosives in Poplar Trees by *Methylobacterium populi* BJ001. *Endophytes of Forest Trees*. págs. 217-234.
- 65 Doty, S. L.; (2008). "Enhancing phytoremediation through the use of transgenics and endophytes". *New Phytologist*. 179: 318-333.

Macek, T., Kotrba, P., Svatos, A., Novakova, M., Demnerova, K., Mackova, M.; (2008). "Novel roles for genetically modified plants in environmental protection". Trends in Biotechnology. 26: 146-152.

5 Gamborg, O. L., Miller, R. A., Ojima, K.; (1968). "Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells". Experimental Cell Research. 50: 151-158.

10 Nagarajikumar, M., Bhaskaran, R., Velazhahan, R.; (2004). "Involvement of secondary metabolites and extracellular lytic enzymes produced by *Pseudomonas fluorescens* in inhibition of *Rhizoctonia solani*, the rice sheath blight pathogen". Microbiol. Res. 159: 73-81.

LISTADO DE SECUENCIAS

15 <110> Marrone Bio Innovations, Inc.
Burman, Scott
Wilk, Debora
Cordova, Ana Lucia

20 <120> GENES DE CHROMOBACTERIUM SUBTSUGAE

<130> MBI-206-0005-US-PR1

<160> 6

25 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 183

<212> PRT

30 <213> *Chromobacterium subtsugae*

<400> 1

ES 2 811 914 T3

Met Ser Leu Thr Thr Asp Phe Leu Glu Asn Pro Gln Ala Phe Met Arg
 1 5 10 15

Ser Gln Ala Ile Leu Ile Pro Ala Gln Val Pro Pro Gly Asn Gly Lys
 20 25 30

Tyr Gln Phe Ala Ala Gln Gly Ala His Ala Ala Val Leu Gln Ser Thr
 35 40 45

Ala Ala Ser Pro Asn Ile Pro Gly Phe Tyr Ala His Pro Val Ala Asn
 50 55 60

Asn Ile Asn Leu Phe Val Leu Pro Thr Gln Gln Pro Ala Arg Tyr Tyr
 65 70 75 80

Met Phe Thr Asp Gly Met Asn Gly Cys Gln Phe Leu Ala Tyr Gly Pro
 85 90 95

Asp Arg Gln His Ile Thr Val Glu His Asn Asn Phe Ile Gly Asp Pro
 100 105 110

Thr Arg Tyr Ala Ala Arg Leu Ala Glu Val Val Ala Leu Lys Pro Ala
 115 120 125

Tyr Leu Leu His Ile Ser Pro Ser Gly Val Asn Asn Ile Pro Ala Gly
 130 135 140

Gln Tyr Asn Ser Gln Gln Gly Val Asn Ile Val Gly Glu Tyr Gly Gln
 145 150 155 160

Ala Asn Gly Trp Arg Phe Trp Val Arg Asp Arg Val Asp Gln Asn Gln
 165 170 175

Gly Thr Val Tyr Gly Pro Leu
 180

<210> 2
 <211> 364
 5 <212> PRT
 <213> *Chromobacterium subtsugae*
 <400> 2

ES 2 811 914 T3

Met Asp Lys Arg Leu Pro Ala Val Ala Ala Ala Leu Leu Leu Ala Ala
1 5 10 15

Ser Ala Ala His Ala Gly Asp Leu Gln Val Ser Leu Gly Gln Pro Val
20 25 30

Val Ser Ala Gly Gln Asp Val Asp Val Ala Leu Thr Tyr Arg Asn Thr
35 40 45

Gly Lys Glu Thr Leu His Val Tyr Arg Trp Phe Val Pro Gly Lys Glu
50 55 60

Leu Gln Glu Gln Phe Leu Ala Val Asn Val Asn Gly Lys Pro Ala Glu
65 70 75 80

Tyr Leu Gly Pro Arg Tyr Lys Arg Val Val Pro Ser Leu Arg Asp Thr
85 90 95

Val Ala Leu Ala Pro Gly Ala Thr Leu Asn Ala Lys Val Arg Val Ser
100 105 110

Glu Tyr Tyr Asp Leu Ser Lys Pro Gly Gln Leu Ser Val Arg Phe Glu
115 120 125

Ser Ser Ser Asn Lys Val Leu Asn Arg Ser Leu Pro Ala Gly Val Asn
130 135 140

Ala Lys Gln Ala Ala Ala Pro Gln Ala Asp Glu Ala Ile Ser Ser Asn
145 150 155 160

Val Val Gly Ala Tyr Ser Ala Gly Ser Val Ser Pro Leu Leu Thr Lys
165 170 175

Ser Lys Ala Ala Lys Gln Glu Trp Gln Val Leu Ser Arg Ser Ala Val
180 185 190

Ser Gly Val Ser Tyr Ala Gly Asn Cys Ser Val Ser Gln Gln Ser Gln

ES 2 811 914 T3

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|--|--|
| | 195 | | 200 | | 205 | | | | | | | | | | | | | | |
| Ser | Arg | Asp | Gly | Val | Leu | Ala | Ala | Ser | Ala | Met | Ala | Ser | Glu | Thr | Ala | | | | |
| | 210 | | | | | 215 | | | | | 220 | | | | | | | | |
| Ala | Tyr | Leu | Ala | Gly | Thr | Pro | Ser | Gly | Thr | Pro | Arg | Phe | Thr | Thr | Trp | | | | |
| | 225 | | | | 230 | | | | | 235 | | | | | 240 | | | | |
| Phe | Gly | Lys | Tyr | Ser | Gln | Ala | Asn | Trp | Thr | Thr | Ala | Lys | Ser | His | Tyr | | | | |
| | | | | 245 | | | | | 250 | | | | | 255 | | | | | |
| Val | Asn | Ile | Lys | Asp | Ala | Leu | Asp | Ser | Lys | Pro | Ile | Lys | Leu | Asp | Cys | | | | |
| | | | 260 | | | | | 265 | | | | | 270 | | | | | | |
| Ser | Cys | Thr | Asp | Gly | Gly | Thr | Tyr | Ala | Tyr | Val | Tyr | Pro | Gly | Gln | Pro | | | | |
| | | 275 | | | | | 280 | | | | | 285 | | | | | | | |
| Tyr | Thr | Val | Tyr | Leu | Cys | Gly | Ala | Phe | Trp | Thr | Ala | Pro | Thr | Lys | Gly | | | | |
| | 290 | | | | | 295 | | | | | 300 | | | | | | | | |
| Thr | Asp | Ser | Lys | Gly | Gly | Thr | Leu | Val | His | Glu | Leu | Ser | His | Phe | Thr | | | | |
| | 305 | | | 310 | | | | | | 315 | | | | | 320 | | | | |
| Val | Val | Ala | Gly | Thr | Gln | Asp | His | Val | Tyr | Gly | Gln | Ala | Gly | Ala | Lys | | | | |
| | | | | 325 | | | | | 330 | | | | | 335 | | | | | |
| Ser | Leu | Ala | Lys | Ser | Asn | Pro | Ala | Gln | Ala | Leu | Asp | Asn | Ala | Asp | Asn | | | | |
| | | | 340 | | | | | 345 | | | | | 350 | | | | | | |
| His | Glu | Tyr | Phe | Ala | Glu | Asn | Thr | Pro | Ala | Gln | Gln | | | | | | | | |
| | | 355 | | | | | 360 | | | | | | | | | | | | |

<210> 3
 <211> 489
 <212> PRT
 <213> *Chromobacterium subtsugae*

 <400> 3

5

ES 2 811 914 T3

Met Arg Lys Gln Gln Leu Met Leu Arg Gly Leu Val Leu Ser Ala Leu
1 5 10 15

Ala Val Phe Ser Ser Ala Ala Leu Ala Ala Glu Arg Ile Asp Leu Glu
20 25 30

Lys Leu Gly Lys Ile Gln Ala Asn Gly Ala Val Ala Phe Thr Gly Val
35 40 45

Asn Gln Ala Asp Leu Lys Pro Leu Arg Ser Thr Gln Phe Ala Thr Gly

ES 2 811 914 T3

Phe Trp Asp Gly Thr Ala Met Thr Phe Gly Asp Gly Ala Ser Thr Phe
 305 310 315 320

Tyr Pro Leu Val Ser Leu Asp Val Ser Ala His Glu Val Ser His Gly
 325 330 335

Phe Thr Glu Gln Asn Ser Gly Leu Val Tyr Asp Gly Gln Ser Gly Gly
 340 345 350

Ile Asn Glu Ala Phe Ser Asp Met Ala Gly Glu Ala Ala Glu Tyr Tyr
 355 360 365

Met Lys Gly Lys Asn Asp Phe Leu Val Gly Ala Glu Ile Phe Lys Lys
 370 375 380

Thr Gly Ala Leu Arg Tyr Phe Ala Asp Pro Thr Lys Asp Gly Gln Ser
 385 390 395 400

Ile Gly Asn Ala Lys Asp Tyr Tyr Asp Gly Leu Asp Val His Tyr Ser
 405 410 415

Ser Gly Val Tyr Asn Lys Ala Phe Tyr Leu Ile Ala Thr Ser Pro Asn
 420 425 430

Trp Asn Thr Arg Lys Ala Phe Glu Val Phe Val Asp Ala Asn Arg Leu
 435 440 445

Tyr Trp Thr Ala Asn Ala Thr Tyr Asn Ser Ala Ala Cys Gly Val Val
 450 455 460

Lys Ala Ala Asp Ala Arg Gly Tyr Asn Ser Ala Asp Val Thr Lys Ala
 465 470 475 480

Phe Thr Ala Val Gly Val Thr Cys Lys
 485

<210> 4
 <211> 552
 <212> ADN
 <213> *Chromobacterium subtsugae*

<400> 4

5

10

ES 2 811 914 T3

| | |
|--|-----|
| atgtctttga ctaccgattt tctggagaac cgcaggctt tcatgcgttc tcaggcgata | 60 |
| ttgattccgg cgcaggttcc gcccggaac ggcaaatacc agttcgcggc gcagggcgcg | 120 |
| cacgcggcgg tgctgcagtc caccgccgcc agcccgaaca tccccggttt ttacggcat | 180 |
| ccggtggcca acaacatcaa tctgttcgtg ctgccaccc agcagccggc aaggtattac | 240 |
| atgttcaccg acggcatgaa cggctgccag tttctggcct acgggcccga caggcagcac | 300 |
| atcaccgtcg agcacaacaa cttcatcggc gacccgacgc gctacgcggc gcggtcggcg | 360 |
| gaggtggtgg cgctgaagcc ggcctatctg ctgcatatca gcccgtcggg ggtcaataac | 420 |
| atccccggccg gccaatacaa cagccagcag ggggtgaaca tcgtcggcga atacggccag | 480 |
| gccaacggct ggcgcttctg ggtgcgggac aggggtggacc agaaccaggg cacggtgtac | 540 |
| gggccgctgt aa | 552 |

<210> 5
 <211> 1095
 <212> ADN
 <213> *Chromobacterium subtsugae*

5

<400> 5

ES 2 811 914 T3

| | |
|---|------|
| atggacaaga gattgccagc cgtggcccgcg gctttgctgt tggcggcttc cgccgctcac | 60 |
| gccggcgacc tgcaggtcag cctggggcag ccggtggtca gcgcgggtca ggacgttgac | 120 |
| gtcgctttga cttaccgcaa taccggcaag gagaccttgc acgtgtaccg ctggttcgtg | 180 |
| cccggcaagg aactgcagga gcagtttctg gcggtgaatg tgaacggcaa gccggccgag | 240 |
| tacctggggc cgcgctacaa gcgcgtggtg ccgtcgctgc gcgacaccgt ggcgctggcg | 300 |
| cccggcgcca cgctgaacgc caaggtgagg gtgtccgagt attacgacct gtccaagccg | 360 |
| ggccagctga gcgtccgttt tgaaagcagc agcaacaagg tgctcaaccg cagcctgccg | 420 |
| gccggcgtca atgccaaagca ggcggcccgcg ccgcaggccg acgaggccat ttcctccaat | 480 |
| gtggtgggcg cctacagcgc cggcagcgtc agccccttgc tgaccaagtc caaggcggcc | 540 |
| aagcaggagt ggcagggtgct cagccgcagc gcggtcagcg gcgtcagcta cgccggcaat | 600 |
| tgctcggta gccagcagtc gcaatcgcgc gacggcgtgc tggccgccag cgccatggcc | 660 |
| agcgaaacgg cggcctacct ggccggcagc ccgtccggca cgccgcgctt caccacttgg | 720 |
| ttcggcaagt acagccaggc caactggacc accgccaaagt cgcattacgt caacatcaag | 780 |
| gatgcgctgg acagcaagcc gatcaagctg gattgcagct gcaccgacgg cggcacttat | 840 |
| gcctacgtct atccggggca gccgtacacc gtctatctgt gcggcgcttt ctggaccgcg | 900 |
| ccgaccaagg gcaccgactc caagggcggc accctggtgc atgagttgtc gcacttcacc | 960 |
| gtggtggcgg gcacccagga ccatgtctat ggccaggccg gcgccaagag cctggccaag | 1020 |
| agcaaccggg cccaggcctt ggacaatgcc gacaaccatg aatacttcgc cgagaacacc | 1080 |
| ccggcgcagc agtaa | 1095 |

<210> 6
 <211> 1470
 <212> ADN
 <213> *Chromobacterium subtsugae*
 <400> 6

5

ES 2 811 914 T3

| | |
|--|------|
| atgagaaaac agcaattgat gttgctggt ttggtcctgt ccgccctggc tgtgttcagc | 60 |
| tcggcggcgc tggcggccga gcgtatcgac ctggaaaagc tgggcaagat ccaggccaac | 120 |
| ggcgcggtgg cgttcaccgg cgtgaaccag gctgatctga agcccctgcg cagcacccaa | 180 |
| ttcgccaccg gcaaagtgtt gacccgcttc cagcagtact accagggcgt gccggtatgg | 240 |
| ggcgaagccg tggtcgagga aaaacaggcc ggcccggtgg ccaagaccag cggcaacta | 300 |
| tccggccaat acatcgccgg catccagtcc gacctggctt ccgccaagcc gacgttgagc | 360 |
| agcggcccag cgttgagcca ggccaaatcg ctgaaggcca acggcaatcc cacctacaac | 420 |
| gagaaagccg acctagtgtt gcgcctgaac gagcgcaaca ccgccagct ggtctaccta | 480 |
| gtgtccttcg tggtcgacgg caaggagccc agccgcccgc acctgatcat cgacgccaac | 540 |
| aacggccagg tgctgaagca gtgggaaggc ctgaaccacg ccgaagccaa cggccccggc | 600 |
| ggcaacgcca agaccggcaa gtatgtctac ggaccgact acggtccgct gatcgtcacc | 660 |
| agcgattgca agatggatag cggcaacgtc gccaccgtca acctcaacgg cggcaccagc | 720 |
| ggcaccaccc cgtacaagtt cgcctgcccg accaacacct acaaagcgat caacggcgct | 780 |
| tactcgccgc tgaacgacgc gcactacttc ggcaacgtgg tgttcaacct gtacaaggac | 840 |
| tggttcaacc tgaagccgat caaccagaag ctgctgatga aggtgacta cagccgcaac | 900 |
| tacgaaaacg cgttctggga cggcaccgcg atgaccttcg gcgacggcgc cagcaccttc | 960 |
| taccgctgg tgtcgctgga cgtgtccgcg catgaagtca gccacggctt caccgagcag | 1020 |
| aactccggcc tggctctacga cggccagtcc ggccgcatca acgaggcatt ctccgacatg | 1080 |
| gccggcgaag ccgccgagta ctacatgaag ggcaagaacg acttcctggt gggcgcggaa | 1140 |
| atcttcaaga agaccggcgc gctgcgctac ttcgccgatc cgaccaagga cggccaatcg | 1200 |
| atcggcaacg ccaaggacta ctacgacggc ctggacgtgc actattccag cggcgtgtac | 1260 |
| aacaaggcct tttaacctgat cgccaccagc ccgaactgga acaccgcaa ggcgtttgaa | 1320 |
| gtgttcgctc acgccaaccg gctgtactgg accgccaacg ccacctaaa cagcgcgct | 1380 |
| tgcggcgtgg tcaaggcggc cgacgcccgc ggctacaaca gcgccgacgt caccaaggcc | 1440 |
| ttcaccgcag tcggcgtgac ttgcaaataa | 1470 |

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una célula vegetal que comprende un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID NO: 1, 2 o 3.
2. La célula vegetal de la reivindicación 1, en donde la célula vegetal presenta actividad insecticida contra falsos medidores, *Lygus*, gardamas de la remolacha y palomilla de dorso diamante.
- 10 3. La célula vegetal de la reivindicación 1, en donde la célula vegetal se selecciona del grupo que consiste en una célula monocotiledónea y una célula dicotiledónea.
4. Una composición insecticida que comprende un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID NO: 1, 2 o 3;
un vehículo, diluyente o adyuvante;
15 y al menos una de una proteína insecticida o una molécula de ARN bicatenario insecticida.
5. La composición insecticida de la reivindicación 4, en donde la composición presenta actividad inhibidora contra falsos medidores, *Lygus*, gardamas de la remolacha y palomilla de dorso diamante.
- 20 6. Una semilla o un agente de recubrimiento de la semilla que comprende el polipéptido de la reivindicación 1.
7. La semilla o el agente de recubrimiento de la semilla de la reivindicación 6, en donde el polipéptido está codificado por la secuencia de nucleótidos como se expone en las SEQ ID NO: 4, 5 o 6.
- 25 8. Un método para modular la infestación por plagas en una planta que comprende presentar al insecto una cantidad eficaz de un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID NO: 1, 2 o 3.
9. El método de la reivindicación 8, en donde el insecto comprende falsos medidores, *Lygus*, gardamas de la remolacha y palomilla de dorso diamante.
- 30 10. El método de la reivindicación 8, en donde dicha presentación es mediante la expresión de una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido en una planta de maíz, soja, algodón, canola, arroz, cebada, avena, trigo, hierba de césped, alfalfa, remolacha azucarera, girasol o caña de azúcar.
- 35 11. Un método para producir una planta resistente a insectos que comprende la etapa de transformar un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID NO: 1, 2 o 3 en una célula vegetal.