

TÍTULO DE INVENCION
NUEVAS PROTEÍNAS INHIBIDORAS DE INSECTOS

REFERENCIA A LAS SOLICITUDES RELACIONADAS

5 Esta solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud Provisional de los Estados Unidos 62/082,504, presentada el 20 de noviembre de 2014, que se incorpora por completo en la presente con fines de referencia.

10 **INCORPORACIÓN DE LA LISTA DE SECUENCIAS**

Aquí se presenta un formulario en soporte informático de la lista de secuencias por envío electrónico. La lista de secuencias se incorpora por completo con fines de referencia, se encuentra en el archivo creado el 13 de noviembre de 2015,
15 con el nombre "MONS387WO_ST25.txt" y de 114 kilobytes de tamaño (medido por el sistema operativo MS-Windows).

ÁMBITO DE LA INVENCION

La invención se relaciona generalmente con el campo de las
20 proteínas inhibidoras de insectos. Se revela una nueva clase de proteínas que exhiben actividad inhibidora de insectos contra plagas de semillas y plantas de cultivo relevantes para la agricultura. En particular, la clase de proteínas revelada presenta acción insecticida activa contra plagas de semillas y

plantas de cultivo relevantes para la agricultura, en especial, las especies de plagas de insectos lepidópteros y coleópteros. Se proporcionan plantas, partes de plantas y semillas que contienen un constructo polinucleótido recombinante que
5 codifica una o más de las proteínas de toxina reveladas.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Mejorar el rendimiento del cultivo de plantas importantes para la agricultura, como el maíz, la soja, la caña de azúcar, el
10 arroz, el trigo, los vegetales y el algodón se ha vuelto cada vez más importante. Además de la necesidad de crecimiento de productos agrícolas para alimentar, vestir y proporcionar energía a una población humana en constante crecimiento, se prevé que los efectos relacionados con el clima y la presión
15 de una población cada vez mayor de usar la tierra con fines diferentes a las prácticas agrarias reduzcan la cantidad de tierra cultivable disponible para la ganadería. Estos factores han conducido a pronósticos desalentadores acerca de la seguridad de los alimentos, particularmente en ausencia de
20 mejoras importantes en materia de biotecnología de plantas y prácticas agronómicas. A la luz de estas presiones, las mejoras ecológicamente sustentables en la tecnología, las técnicas agrícolas y el manejo de plagas son herramientas fundamentales para aumentar la producción de cultivos en la

cantidad limitada de tierra cultivable disponible para la agricultura.

Se considera que los insectos, en particular los que están dentro del orden de los lepidópteros y coleópteros, son una de las causas más importantes del daño a los cultivos, disminuyendo, de esa forma, el rendimiento en áreas infestadas. Las especies plaga de lepidópteros que afectan negativamente a la agricultura incluyen, entre otras, *Helicoverpa zea*, *Ostrinia nubilalis*, *Diatraea saccharalis*, *Diatraea grandiosella*, *Anticarsia gemmatilis*, *Spodoptera frugiperda*, *Spodoptera exigua*, *Agrotis ipsilon*, *Trichoplusia ni*, *Chrysodeixis includens*, *Heliothis virescens*, *Plutella xylostella*, *Pectinophora gossypiella*, *Helicoverpa armigera*, *Elasmopalpus lignosellus*, *Striacosta albicosta* y *Phyllocnistis citrella*. Las especies plaga de coleópteros que afectan negativamente a la agricultura incluyen, entre otras, *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., *Otiorhynchus* spp., *Phlyctinus* spp., *Popillia* spp., *Psylliodes* spp., *Rhizopertha* spp., *Scarabeidae*, *Sitophilus* spp., *Sitotroga* spp., *Tenebrio* spp., *Tribolium* spp. y *Trogoderma* spp, particularmente cuando la plaga es *Diabrotica virgifera virgifera* (gusano de la raíz

del maíz del oeste), *Diabrotica barberi* (gusano de la raíz del maíz del norte), *Diabrotica virgifera zea* (gusano de la raíz del maíz mexicano), *Diabrotica balteata* (gusano de la raíz del maíz brasileño *Diabrotica undecimpunctata howardii* (gusano de la raíz del maíz del sur) y un complejo del gusano de la raíz del maíz brasileño, que consiste en *Diabrotica viridula* y *Diabrotica speciosa*).

Históricamente, la aplicación intensiva de insecticidas químicos sintéticos constituía el agente de control de plagas en la agricultura. Las preocupaciones acerca de la salud humana, además de los problemas de resistencia que están surgiendo, estimuló la investigación y el desarrollo de pesticidas biológicos. Este esfuerzo de investigación llevó al descubrimiento y uso progresivos de varias especies microbianas entomopatógenas, incluso bacterias.

El paradigma del control biológico viró cuando se descubrió el potencial de las bacterias entomopatógenas, en especial las pertenecientes al género *Bacillus*, y se desarrolló como agente biológico de control de plagas. Se utilizaron las cepas de la bacteria *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) como una fuente de proteínas que exhibe actividad pesticida, ya que se descubrió que las cepas de *Bt* presentan una alta toxicidad contra ciertos insectos. La principal característica de las *Bt* es la producción de cuerpos parasporales que contienen uno o más

cristales con endotoxinas insecticidas específicas (proteínas Cry) que actúan sobre la ingestión por parte de un insecto susceptible mediante un mecanismo de acción formador de poros, nocivo para el epitelio intestinal del insecto. Además de *Bt*,
5 otras especies de *Bacillus*, como *Bacillus sphaericus*, y otras especies de bacterias que contienen genes que contribuyen a un fenotipo entomopatógeno, como *Brevibacillus laterosporus*, han mostrado potencial para el manejo de plagas.

Se han utilizado proteínas de toxina insecticidas en varias
10 aplicaciones agrícolas para preservar plantas importantes y aumentar el rendimiento. Las proteínas de toxina insecticidas se emplean para controlar plagas de plantas de cultivos relevantes para la agricultura a través de métodos mecánicos, como por ejemplo, mediante pulverización para dispersar
15 formulaciones microbianas que contienen varias cepas de bacterias sobre la superficie de las plantas y técnicas de transformación genética para producir plantas y semillas transgénicas que expresan la proteína de toxina insecticida. El uso de plantas transgénicas que expresan proteínas de toxina
20 insecticidas se ha adoptado en todo el mundo. Por ejemplo, en 2012 se sembraron 26,1 millones de hectáreas de cultivos transgénicos que expresan toxinas *Bt* (James, C., Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2012. ISAAA Brief No. 44). El uso extendido de cultivos transgénicos protegidos contra

insectos y la cantidad limitada de proteínas toxinas insecticidas disponibles comercialmente está creando una presión de selección de alelos que imparten resistencia a las proteínas insecticidas utilizadas actualmente. El desarrollo de resistencia en las plagas objetivo a las proteínas de toxina insecticidas disminuye la efectividad y las ventajas de esta tecnología. Tales ventajas incluyen un mayor rendimiento del cultivo, una reducción del uso de pesticidas químicos y de los costos y el trabajo asociados con el uso de estos.

El descubrimiento y desarrollo de nuevas formas de proteínas de toxina insecticidas resulta central para el manejo del aumento de la resistencia de los insectos a los cultivos transgénicos que expresan proteínas toxinas insecticidas. Las nuevas toxinas proteicas, con una eficacia mejorada y capacidad de control sobre un espectro más amplio de especies de insectos susceptibles, reducirán la cantidad de insectos sobrevivientes que pueden desarrollar alelos de resistencia. Además, dos o más toxinas transgénicas que son tóxicas para la misma plaga de insectos y exhiben modos de acción diferentes en una planta reducen aún más la probabilidad de resistencia en una especie de insectos objetivo.

En consecuencia, existe una imperiosa necesidad de descubrir y desarrollar proteínas insecticidas efectivas con propiedades insecticidas mejoradas, tales como mayor eficacia contra un

espectro más amplio de plagas de insectos objetivo y diferentes modos de acción en comparación con las proteínas conocidas en la técnica. En esta solicitud, se revela una nueva familia de toxinas proteicas de *Brevibacillus laterosporus* (*B.* laterosporus), junto con proteínas de toxina similares, proteínas variantes y proteínas recombinantes ejemplares que exhiben actividad insecticida contra importante especies plaga de lepidópteros y coleópteros objetivo, particularmente contra el gusano de la raíz del maíz del oeste.

10

SÍNTESIS DE LA INVENCIÓN

En la presente se revela un nuevo grupo de moléculas de polinucleótidos recombinantes inhibidoras de insectos y los polipéptidos (proteínas de toxina) codificados por esta, referidos aquí como proteínas de tipo TIC3668, que han demostrado exhibir actividad inhibidora contra una o más plagas de plantas de cultivos. Cada proteína se puede usar sola o combinadas entre sí y con otras proteínas insecticidas y agentes tóxicos, en formulaciones y en planta, lo que proporciona alternativas a las proteínas y los químicos insecticidas actualmente en uso en los sistemas agrícolas.

20

Por un lado, la invención proporciona una molécula de polinucleótido recombinante que codifica un polipéptido inhibidor de insectos, que contiene una secuencia de

aminoácidos seleccionados del grupo que consta de SEC ID. NO:25, SEC ID. NO:23, SEC ID. NO:24, SEC ID. NO:26, SEC ID. NO:27, SEC ID. NO:28, SEC ID. NO:29, SEC ID. NO:30 y SEC ID. NO:31. En una presentación, la molécula de polinucleótido

5 recombinante codifica un polipéptido inhibidor de insectos que contiene al menos el 35% de la identidad, por ejemplo, al menos el 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o el 99% de la identidad en una secuencia

10 de aminoácidos seleccionada del grupo que consta de SEC ID. NO:25, SEC ID. NO:23, SEC ID. NO:24, SEC ID. NO:26, SEC ID. NO:27, SEC ID. NO:28, SEC ID. NO:29, SEC ID. NO:30 y SEC ID. NO:31. En otra presentación, la molécula de polinucleótido recombinante contiene una secuencia de nucleótidos

15 seleccionada del grupo que consta de SEC ID. NO:37, SEC ID. NO:33, SEC ID. NO:35, SEC ID. NO:39, SEC ID. NO:41, SEC ID. NO:43, SEC ID. NO:45, SEC ID. NO:47, SEC ID. NO:49, SEC ID. NO:64, SEC ID. NO:65, SEC ID. NO:66, SEC ID. NO:67, SEC ID. NO:68, SEC ID. NO:69, SEC ID. NO:70, SEC ID. NO:71 y SEC ID.

20 NO:72. En otra presentación más, la molécula de polinucleótido recombinante contiene al menos el 35% de la identidad, por ejemplo, al menos el 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o el 99% de la identidad

en una secuencia de nucleótidos seleccionada de un grupo que consta de SEC ID. NO:37, SEC ID. NO:33, SEC ID. NO:35, SEC ID. NO:39, SEC ID. NO:41, SEC ID. NO:43, SEC ID. NO:45, SEC ID. NO:47, SEC ID. NO:49, SEC ID. NO:64, SEC ID. NO:65, SEC ID. NO:66, SEC ID. NO:67, SEC ID. NO:68, SEC ID. NO:69, SEC ID. NO:70, SEC ID. NO:71 y SEC ID. NO:72. En otra presentación, la molécula de polinucleótido recombinante contiene una secuencia que se hibrida con: (i) el complemento inverso de la secuencia de nucleótidos desde la posición 4-885 de una

10 secuencia seleccionada del grupo que consta de SEC ID NO:37, SEC ID NO:33, SEC ID NO:35, SEC ID NO:39, SEC ID NO:41, SEC ID. NO:43, SEC ID. NO:45, SEC ID. NO:47, SEC ID. NO:49, SEC ID. NO:64, SEC ID. NO:65, SEC ID. NO:66, SEC ID. NO:67, SEC ID. NO:68, SEC ID. NO:69, SEC ID. NO:70, SEC ID. NO:71 y SEC

15 ID. NO:72; o (ii) el complemento inverso que seleccionó una secuencia del grupo que consta de SEC ID. NO:52, SEC ID. NO:53, SEC ID. NO:54, SEC ID. NO:55, SEC ID. NO:56, SEC ID. NO:57, SEC ID. NO:58, SEC ID. NO:59, SEC ID. NO:60 y SEC ID. NO:61. En otra presentación, las condiciones de hibridación son

20 rigurosas, por ejemplo, pueden incluir hibridación de 4 a 12 horas en formamida al 50%, NaCl 1 M y SDS al 1% a 37 C y un lavado en SSC 0,1 X a 60 C-65 C. En otra presentación, la molécula de polinucleótido recombinante está unida operativamente a un promotor heterólogo.

Por otro lado, la invención proporciona un polipéptido recombinante inhibidor de insectos codificado por la molécula de polinucleótido recombinante que se provee en la presente. En una presentación, el polipéptido recombinante inhibidor de insectos contiene una secuencia de aminoácidos seleccionados del grupo que consta de SEC ID NO:25, SEC ID NO:23, SEC ID NO:24, SEC ID NO:26, SEC ID NO:27, SEC ID NO:28, SEC ID NO:29, SEC ID NO:30 y SEC ID NO:31. En otra presentación, el polipéptido recombinante inhibidor de insectos contiene al menos el 35% de la identidad, por ejemplo, al menos el 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o el 99% de la identidad en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consta de SEC ID NO:25, SEC ID NO:23, SEC ID NO:24, SEC ID NO:26, SEC ID NO:27, SEC ID NO:28, SEC ID NO:29, SEC ID NO:30 y SEC ID NO:31.

En una presentación adicional, el polipéptido recombinante inhibidor de insectos exhibe actividad inhibidora contra una especie de insectos del orden de los coleópteros, por ejemplo, el un gusano de la raíz del maíz del oeste, gusano de la raíz del maíz del sur, gusano de la raíz del maíz del norte, gusano de la raíz del maíz mexicano, gusano de la raíz del maíz brasileño o el complejo del gusano de la raíz del maíz brasileño que consiste en *Diabrotica viridula* y *Diabrotica speciosa*. En

otra presentación aún, el polipéptido recombinante inhibidor de insectos exhibe actividad inhibidora contra una especie de insectos del orden de los lepidópteros, por ejemplo, taladro de maíz europeo, taladro del maíz del suroeste, gusano cortador 5 grasiento negro, cogollero del maíz, gusano elotero y soja Looper.

En otro aspecto, la invención proporciona una célula huésped que comprende una molécula de polinucleótido recombinante de la invención, en la que dicha célula huésped se selecciona del 10 grupo que consta de una célula huésped bacteriana y una célula huésped de la planta. En ciertas presentaciones, las células huésped bacteriana incluyen *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Bacillus thuringiensis*, *Brevibacillus lacterosporus*, *Bacillus cereus*, *E. coli*, *Pseudomonas*, *Klebsiella* y *Erwinia*. En otras 15 presentaciones, las células de plantas incluyen célula vegetal de alfalfa, banana, cebada, frijol, brócoli, col, brassica, zanahoria, mandioca, ricino, coliflor, apio, garbanzo, col china, cítricos, coco, café, maíz, trébol, algodón, curcubitácea, pepino, abeto de Douglas, berenjena, eucalipto, 20 lino, ajo, uva, lúpulo, puerro, lechuga, pino Taeda, mijo, melones, nuez, avena, oliva, cebolla, pimienta, ornamental, palma, pastura, guisante, maní, pimienta, guandú, pino, papa, álamo, zapallo, pino radiata, rábano, colza, arroz, portainjerto, centeno, cártamo, arbusto, sorgo, pino sureño,

soja, espinaca, calabaza, frutilla, remolacha azucarera, caña de azúcar, girasol, maíz dulce, goma dulce, batata, hierbas de mijo, té, tabaco, tomate, triticale, césped, sandía y de trigo. La invención también provee una composición inhibidora de

5 insectos que puede incluir una molécula de polinucleótido recombinante de la invención actual. En una presentación, la composición inhibidora de insectos puede también incluir una secuencia de nucleótidos que codifiquen al menos otro agente

10 pesticida. En ciertas presentaciones, el otro agente pesticida es diferente del polipéptido inhibidor de insectos de tipo TIC3668 de la invención y se puede seleccionar del grupo que consta de una proteína inhibidora de insectos, una molécula de ARNdc inhibidora de insectos y una proteína auxiliar. En otras presentaciones, el otro agente plaguicida exhibe actividad

15 contra una o más especies de plagas de los órdenes de los lepidópteros, coleópteros o hemípteros. En ciertas presentaciones, el otro agente pesticida se selecciona del grupo que consta de una proteína Cry1A, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1A.105, Cry1B, Cry1C, Cry1D, Cry1E, Cry1F, Cry1G, Cry1H,

20 Cry1I, Cry1J, Cry1K, Cry1L, Cry2A, Cry2Ab, Cry3A, Cry3B, Cry4B, Cry6, Cry7, Cry8, Cry9, Cry15, Cry34, Cry35, Cry43A, Cry43B, Cry51Aa1, ET29, ET33, ET34, ET35, ET66, ET70, TIC400, TIC407, TIC417, TIC431, TIC800, TIC807, TIC834, TIC853, TIC900, TIC901, TIC1201, TIC1415, VIP3A y VIP3B. Por otro lado, la presente

invención proporciona una composición inhibidora de insectos que contiene un polipéptido recombinante inhibidor de insectos de la presente invención, como un polipéptido inhibidor de insectos de tipo TIC3668, en una cantidad efectiva para la inhibición de insectos.

Además, la invención brinda un método de controlar una plaga de las especies de coleópteros o lepidópteros, y controlar la infestación de la plaga de esas especies en una planta, por ejemplo, una planta de cultivo, en donde el método incluye contactar la plaga con una cantidad suficiente del polipéptido recombinante inhibidor de insectos de la invención, como el polipéptido inhibidor de insectos de tipo TIC3668.

También, la invención brinda una semilla que contiene una molécula de polinucleótido recombinante o polipéptido recombinante inhibidor de insectos, como un polipéptido inhibidor de insectos TIC3668, de la invención.

La invención brinda un producto de consumo que consiste en una cantidad detectable de la molécula de polinucleótido recombinante o del polipéptido recombinante inhibidor de insectos, como un polipéptido inhibidor de insectos TIC3668, de la invención. Un producto comercial de la invención puede incluir una célula huésped que contenga una molécula de polinucleótido recombinante de la invención, en donde el producto comercial contenga una cantidad detectable de la

molécula de polinucleótido recombinante o un polipéptido recombinante inhibidor de insectos codificado por el polinucleótido recombinante. En ciertas presentaciones, los productos comerciales pueden incluir productos básicos como el
5 maíz envasado por un comerciante de granos, copos de maíz, torta de maíz, harina de maíz, pasta de maíz, jarabe de maíz, aceite de maíz, cereal de maíz, etc. y los productos comerciales correspondientes a base de soja, arroz, trigo, sorgo, guandú, maní, fruta y vegetales, que incluyen (si
10 corresponde) jugos, concentrados, jaleas, gelatinas, mermeladas y otras formas comestibles de tales productos que contienen una cantidad detectable de los polinucleótidos y/o polipéptidos de esta solicitud.

En otro aspecto, la invención proporciona un método de producir
15 semillas que contengan el polinucleótido recombinante de la invención, donde el método incluye: (a) plantar al menos una semilla que contenga la molécula de polinucleótido recombinante; (b) cultivar plantas de esa semilla; y (c) cosechar las semillas de esas plantas, que contendrán la
20 molécula de polinucleótido recombinante.

La invención proporciona un vector recombinante que contiene la molécula de polinucleótido recombinante de la invención. En una presentación, el vector recombinante se selecciona del grupo que consta de un plásmido, un bácmido, un fagémido y un

cósmido.

La invención también brinda una planta resistente a la infestación de insectos, en la que las células de dicha planta contienen la molécula de polinucleótido recombinante o el
5 polipéptido inhibidor de insectos de la invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS ILUSTRACIONES

La figura 1 ilustra la alineación de la proteína collage
TIC4260 con cinco proteínas de tipo TIC3668 ejemplares. Las
10 posiciones de la diversidad de secuencias se resaltan en gris
en este alineamiento de secuencias.

La figura 2 ilustra la actividad inhibidora sobre el gusano de la raíz del maíz del oeste *en planta* de las proteínas ejemplares de tipo TIC3668 de longitud madura dirigidas y no dirigidas al
15 cloroplasto.

La figura 3 ilustra la actividad inhibidora sobre el gusano de la raíz del maíz del oeste *en planta* de una proteína ejemplar de tipo TIC3668 de longitud madura, dirigida y no dirigida al cloroplasto.

20

DESCRIPCIÓN BREVE DE LAS SECUENCIAS

La SEC ID NO:1 es una secuencia de polinucleótidos recombinantes obtenida de una especie de *Brevibacillus laterosporus* que codifica una proteína TIC3668 desde un marco

de lectura abierto en la posición 1-951 del nucleótido o un codón de terminación de la traducción.

La SEC ID NO:2 es la traducción de la secuencia de aminoácidos de la proteína precursora TIC3668 del marco de lectura abierto,
5 como se estableció en la SEC ID NO:1.

La SEC ID NO:3 es una secuencia de polinucleótidos recombinantes obtenida de una especie de *Brevibacillus laterosporus* que codifica una proteína TIC3669 desde un marco de lectura abierto en la posición 1-951 del nucleótido o un
10 codón de terminación de la traducción.

La SEC ID NO:4 es la traducción de la secuencia de aminoácidos de la proteína TIC3669 del marco de lectura abierto, como se estableció en la SEC ID NO:3.

La SEC ID NO:5 es una secuencia de polinucleótidos recombinantes obtenida de una especie de *Brevibacillus laterosporus* que codifica una proteína TIC3670 desde un marco de lectura abierto en la posición 1-951 del nucleótido o un
15 codón de terminación de la traducción.

La SEC ID NO:6 es la traducción de la secuencia de aminoácidos de la proteína precursora TIC3670 del marco de lectura abierto,
20 como se estableció en la SEC ID NO:5.

La SEC ID NO:7 es una secuencia de polinucleótidos recombinantes obtenida de una especie de *Brevibacillus laterosporus* que codifica una proteína TIC4076 desde un marco

de lectura abierto en la posición 1-951 del nucleótido o un codón de terminación de la traducción.

La SEC ID NO:8 es la traducción de la secuencia de aminoácidos de la proteína precursora TIC4076 del marco de lectura abierto,
5 como se estableció en la SEC ID NO:7.

La SEC ID NO:9 es una secuencia de polinucleótidos recombinantes obtenida de una especie de *Brevibacillus laterosporus* que codifica una proteína TIC4078 desde un marco de lectura abierto en la posición 1-951 del nucleótido o un
10 codón de terminación de la traducción.

La SEC ID NO:10 es la traducción de la secuencia de aminoácidos de la proteína precursora TIC4078 del marco de lectura abierto, como se estableció en la SEC ID NO:9.

La SEC ID NO:11 es una secuencia de polinucleótidos
15 recombinantes obtenidos de la especie *Brevibacillus laterosporus* que codifican una proteína collage TIC4260 desde un marco de lectura abierto en la posición 1-951 del nucleótido y un codón de terminación de la traducción, creado por combinación de los segmentos de ADN de cada una de las
20 secuencias de codificación expuestas en SEC ID NO:1, SEC ID NO:3, SEC ID NO:5, SEC ID NO:7 y SEC ID NO:9 dentro del marco para incluir las variaciones de secuencia de estos cinco marcos de lectura abiertos diferentes.

La SEC ID NO:12 es la traducción de la secuencia de aminoácidos

de la proteína precursora de la proteína collage TIC4260 del marco de lectura abierto, como se estableció en la SEC ID NO:11.

La SEC ID NO:13 es una secuencia de polinucleótidos recombina-
5 tes obtenida de una especie de *Brevibacillus laterosporus* que codifica una proteína TIC4346 desde un marco de lectura abierto en la posición 1-951 del nucleótido o un codón de terminación de la traducción.

La SEC ID NO:14 es la traducción de la secuencia de aminoácidos
10 del marco de lectura abierto, como se estableció en la SEC ID NO:13.

La SEC ID NO:15 es una secuencia de polinucleótidos recombina-
tes obtenida de una especie de *Brevibacillus laterosporus* que codifica una proteína TIC4826 desde un marco
15 de lectura abierto en la posición 1-951 del nucleótido o un codón de terminación de la traducción.

La SEC ID NO:16 es la traducción de la secuencia de aminoácidos del marco de lectura abierto, como se estableció en la SEC ID NO:15.

20 La SEC ID NO:17 es una secuencia de polinucleótidos recombina-
tes obtenida de una especie de *Brevibacillus laterosporus* que codifica una proteína TIC4861 desde un marco de lectura abierto en la posición 1-918 del nucleótido o un codón de terminación de la traducción.

La SEC ID NO:18 es la traducción de la secuencia de aminoácidos del marco de lectura abierto, como se estableció en la SEC ID NO:17.

La SEC ID NO:19 es una secuencia de polinucleótidos recombina-
5 tes obtenida de una especie de *Brevibacillus laterosporus* que codifica una proteína TIC4862 desde un marco de lectura abierto en la posición 1-945 del nucleótido o un codón de terminación de la traducción.

La SEC ID NO:20 es la traducción de la secuencia de aminoácidos
10 del marco de lectura abierto, como se estableció en la SEC ID NO:19.

La SEC ID NO:21 es una secuencia de polinucleótidos recombina-
tes obtenida de una especie de *Brevibacillus laterosporus* que codifica una proteína TIC4863 desde un marco
15 de lectura abierto en la posición 1-951 del nucleótido o un codón de terminación de la traducción.

La SEC ID NO:22 es la traducción de la secuencia de aminoácidos del marco de lectura abierto, como se estableció en la SEC ID NO:21.

20 La SEC ID NO:23 es la secuencia de aminoácidos de una proteína TIC3668 madura, mTIC3668.

La SEC ID NO:24 es la secuencia de aminoácidos de una proteína TIC3669 madura, mTIC3669.

La SEC ID NO:25 es la secuencia de aminoácidos de una proteína

TIC3670 madura, mTIC3670.

La SEC ID NO:26 es la secuencia de aminoácidos de una proteína
TIC4076 madura, mTIC4076.

La SEC ID NO:27 es la secuencia de aminoácidos de una proteína
5 TIC4078 madura, mTIC4078.

La SEC ID NO:28 es la secuencia de aminoácidos de una proteína
TIC4260 madura, mTIC4260.

La SEC ID NO:29 es la secuencia de aminoácidos de una proteína
TIC4346 madura, mTIC4346.

10 La SEC ID NO:30 es la secuencia de aminoácidos de una proteína
TIC4826 madura, mTIC4826.

La SEC ID NO:31 es la secuencia de aminoácidos de una proteína
TIC4861 madura, mTIC4891.

15 La SEC ID NO:32 es una secuencia sintética de nucleótidos que
codifica una proteína TIC3668 diseñada para la expresión en
plantas.

La SEC ID NO:33 es una secuencia sintética de nucleótidos que
codifica una proteína TIC3668 madura, mTIC3668 diseñada para
20 la expresión en plantas.

La SEC ID NO:34 es una secuencia sintética de nucleótidos que
codifica una proteína TIC3669 diseñada para la expresión en
plantas.

La SEC ID NO:35 es una secuencia sintética de nucleótidos que

codifica una proteína TIC3669 madura, mTIC3669 diseñada para la expresión en plantas.

La SEC ID N0:36 es una secuencia sintética de nucleótidos que codifica una proteína TIC3670 diseñada para la expresión en
5 plantas.

La SEC ID N0:37 es una secuencia sintética de nucleótidos que codifica una proteína TIC3670 madura, mTIC3670 diseñada para la expresión en plantas.

La SEC ID N0:38 es una secuencia sintética de nucleótidos que
10 codifica una proteína TIC4076 diseñada para la expresión en plantas.

La SEC ID N0:39 es una secuencia sintética de nucleótidos que codifica una proteína TIC4076 madura, mTIC4076 diseñada para la expresión en plantas.

15 La SEC ID N0:40 es una secuencia sintética de nucleótidos que codifica una proteína TIC4078 diseñada para la expresión en plantas.

La SEC ID N0:41 es una secuencia sintética de nucleótidos que codifica una proteína TIC4078 madura, mTIC4078 diseñada para
20 la expresión en plantas.

La SEC ID N0:42 es una secuencia sintética de nucleótidos que codifica una proteína TIC4260 diseñada para la expresión en plantas.

La SEC ID N0:43 es una secuencia sintética de nucleótidos que

codifica una proteína TIC4260 madura, mTIC4260 diseñada para la expresión en plantas.

La SEC ID N0:44 es una secuencia sintética de nucleótidos que codifica una proteína TIC4346 diseñada para la expresión en
5 plantas.

La SEC ID N0:45 es una secuencia sintética de nucleótidos que codifica una proteína TIC4346 madura, mTIC4346 diseñada para la expresión en plantas.

La SEC ID N0:46 es una secuencia sintética de nucleótidos que
10 codifica una proteína TIC4826 diseñada para la expresión en plantas.

La SEC ID N0:47 es una secuencia sintética de nucleótidos que codifica una proteína TIC4826 madura, mTIC4826 diseñada para la expresión en plantas.

15 La SEC ID N0:48 es una secuencia sintética de nucleótidos que codifica una proteína TIC4861 diseñada para la expresión en plantas.

La SEC ID N0:49 es una secuencia sintética de nucleótidos que codifica una proteína madura TIC4861 (mTIC4861), una proteína
20 madura TIC4862 (mTIC4862) y una proteína madura TIC4863 (mTIC4863), diseñadas para la expresión en plantas.

La SEC ID N0:50 es una secuencia sintética de nucleótidos que codifica una proteína TIC4682 diseñada para la expresión en plantas.

La SEC ID N0:51 es una secuencia sintética de nucleótidos que codifica una proteína TIC4863 diseñada para la expresión en plantas.

La SEC ID N0:52 es una secuencia de nucleótidos que representa
5 un oligonucleótido sintético para hibridar con la cadena (-)
de un ADN que codifique una proteína revelada en esta solicitud
y correspondiente a las posiciones 1 a 36 de la SEC ID N0:1
(TIC3668 cebador directo).

La SEC ID N0:53 es una secuencia de nucleótidos que representa
10 un oligonucleótido sintético para hibridar con la cadena (+)
de un ADN que codifique una proteína revelada en esta solicitud
y correspondiente a las posiciones 920 a 954 de la SEC ID N0:1
(TIC3668 cebador inverso).

La SEC ID N0:54 es una secuencia de nucleótidos que representa
15 un oligonucleótido sintético para hibridar con la cadena (-)
de un ADN que codifique una proteína revelada en esta solicitud
y correspondiente a las posiciones 1 a 41 de la SEC ID N0:3
(TIC3669 cebador directo).

La SEC ID N0:55 es una secuencia de nucleótidos que representa
20 un oligonucleótido sintético para hibridar con la cadena (+)
de un ADN que codifique una proteína revelada en esta solicitud
y correspondiente a las posiciones 920 a 954 de la SEC ID N0:3
(TIC3669 cebador inverso).

La SEC ID N0:56 es una secuencia de nucleótidos que representa

un oligonucleótido sintético para hibridar con la cadena (-) de un ADN que codifique una proteína revelada en esta solicitud y correspondiente a las posiciones 1 a 36 de la SEC ID N0:5 (TIC3670 cebador directo).

5 La SEC ID N0:57 es una secuencia de nucleótidos que representa un oligonucleótido sintético para hibridar con la cadena (+) de un ADN que codifique una proteína revelada en esta solicitud y correspondiente a las posiciones 920 a 954 de la SEC ID N0:5 (TIC3670 cebador inverso).

10 La SEC ID N0:58 es una secuencia de nucleótidos que representa un oligonucleótido sintético para hibridar con la cadena (-) de un ADN que codifique una proteína revelada en esta solicitud y correspondiente a las posiciones 1 a 41 de la SEC ID N0:7 (TIC4076 cebador directo).

15 La SEC ID N0:59 es una secuencia de nucleótidos que representa un oligonucleótido sintético para hibridar con la cadena (+) de un ADN que codifique una proteína revelada en esta solicitud y correspondiente a las posiciones 920 a 954 de la SEC ID N0:7 (TIC4076 cebador inverso).

20 La SEC ID N0:60 es una secuencia de nucleótidos que representa un oligonucleótido sintético para hibridar con la cadena (-) de un ADN que codifique una proteína revelada en esta solicitud y correspondiente a las posiciones 1 a 36 de la SEC ID N0:9 (TIC4078 cebador directo).

La SEC ID NO:61 es una secuencia de nucleótidos que representa un oligonucleótido sintético para hibridar con la cadena (+) de un ADN que codifique una proteína revelada en esta solicitud y correspondiente a las posiciones 920 a 954 de la SEC ID NO:9
5 (TIC4078 cebador inverso).

La SEC ID NO:62 es una secuencia de polinucleótidos recombinantes obtenida de una especie de *Brevibacillus laterosporus* que codifica una proteína TIC2462 desde un marco de lectura abierto en la posición 1-951 del nucleótido o un
10 codón de terminación de la traducción.

La SEC ID NO:63 es la traducción de la secuencia de aminoácidos del marco de lectura abierto, como se estableció en la SEC ID NO:62.

La SEC ID NO:64 es una secuencia sintética de nucleótidos que
15 codifica una proteína madura TIC3668, mTIC3668 para la expresión en bacterias.

La SEC ID NO:65 es una secuencia sintética de nucleótidos que codifica una proteína madura TIC3669, mTIC3669 para la expresión en bacterias.

20 La SEC ID NO:66 es una secuencia sintética de nucleótidos que codifica una proteína madura TIC3670, mTIC3670 para la expresión en bacterias.

La SEC ID NO:67 es una secuencia sintética de nucleótidos que codifica una proteína madura TIC4076, mTIC4076 para la

expresión en bacterias.

La SEC ID N0:68 es una secuencia sintética de nucleótidos que codifica una proteína madura TIC4078, mTIC4078 para la expresión en bacterias.

- 5 La SEC ID N0:69 es una secuencia sintética de nucleótidos que codifica una proteína madura TIC4260, mTIC4260 para la expresión en bacterias.

La SEC ID N0:70 es una secuencia sintética de nucleótidos que codifica una proteína madura TIC4346, mTIC4346 para la
10 expresión en bacterias.

La SEC ID N0:71 es una secuencia sintética de nucleótidos que codifica una proteína madura TIC4826, mTIC4826 para la expresión en bacterias.

La SEC ID N0:72 es una secuencia sintética de nucleótidos que
15 codifica una proteína madura TIC4861 (mTIC4861), TIC4862 (mTIC4862) y TIC4863 (mTIC4863) para la expresión en bacterias.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

El problema en la técnica de control de plagas agrícolas puede
20 ser caracterizado como una necesidad de nuevas proteínas toxinas que sean eficaces contra plagas objetivo, que exhiban una toxicidad de amplio espectro contra especies de plagas objetivo, que sean capaces de ser expresadas en las plantas sin causar problemas agronómicos indeseables, y proporcionar

un modo alternativo de acción en comparación con las toxinas actuales que se utilizan comercialmente en las plantas. En el presente documento se dan a conocer las proteínas insecticidas innovadoras ejemplificadas por TIC3668, y abordaremos cada una de estas necesidades, en particular contra un amplio espectro de plagas de insectos como Coleópteros y Lepidópteros, y más particularmente contra las especies de plagas gusano de la raíz del maíz.

La referencia que se haga en esta solicitud a "TIC3668",
10 "proteína TIC3668", "proteína toxinas TIC3668", "proteínas toxina TIC3668", "toxinas relacionadas TIC3668", "clase o familia de proteína toxina relacionada TIC3668", "proteínas toxina relacionadas TIC3668", "proteínas tipo TIC3668", "proteínas similares a TIC3668", "Polipéptidos toxinas
15 relacionadas TIC3668", "proteínas pesticidas relacionadas TIC3668", o "polipéptido inhibidor de insectos tipo TIC3668" y similares, se refieren a cualquier proteína inhibidora de insectos innovadora que comprenda, que consista en, que sea sustancialmente homóloga a, que sea similar a, o que se derive
20 de cualquier secuencia de polipéptido inhibidor de insectos de TIC3668 (SEC ID NO: 2) y los segmentos de inhibidores de insectos de los mismos, o combinaciones de los mismos, que confieran una actividad contra plagas de Coleópteros y Lepidópteros, incluyendo cualquier proteína que exhiba una

actividad inhibidora de insectos si dicha proteína se alinea con TIC3668 (SEC ID NO:2), TIC3669 (SEC ID NO:4), TIC3670 (SEC ID NO:6), TIC4076 (SEC ID NO:8), TIC4078 (SEC ID NO:10), TIC4346 (SEC ID NO:14), TIC4826 (SEC ID NO:16), TIC4861 (SEC ID NO:18), TIC4862 (SEC ID NO:20), y TIC4863 (SEC ID NO:22), resultados en la secuencia de aminoácidos identidad de cualquier porcentaje fracción de aproximadamente 35% a aproximadamente 100% por ciento. Las toxinas proteicas de tipo TIC3668 descritos en esta solicitud incluyen TIC3668, TIC3669, TIC3670, TIC4076, TIC4078, TIC4346, TIC4826, TIC4861, TIC4862, TIC4863, y la proteína collage TIC4260 (SEC ID NO: 12). La clase de proteína de tipo TIC3668 está destinada a incluir las formas precursoras, así como las formas de longitud maduras de las proteínas.

El término "segmento" o "fragmento" se utiliza en esta solicitud para describir las secuencias de aminoácidos o de ácido nucleico consecutivas que son más cortas que la secuencia de aminoácidos o de ácido nucleico completa que describe una proteína de tipo TIC3668. También se describe en esta solicitud un segmento o fragmento que exhibe actividad inhibidora de insectos si se alinea con dicho segmento o fragmento, con la sección correspondiente de la proteína de tipo TIC3668 expuesta en la SEC ID NO: 2, los resultados en la secuencia de aminoácidos identidad de cualquier fracción porcentaje de aproximadamente 35 a aproximadamente 100 por

ciento entre el segmento o fragmento y la sección correspondiente de la proteína de tipo TIC3668.

Referencia en esta solicitud a los términos "activo" o "actividad", "actividad pesticida" o "actividad insecticida",
5 "inhibidor de insectos" o "insecticida" se refieren a la eficacia de un agente tóxico, tal como una toxina de proteína, en la inhibición de (inhibir el crecimiento, la alimentación, la fecundidad, o viabilidad), la supresión (suprimir el crecimiento, la alimentación, la fecundidad, o viabilidad), el
10 control (control de la infestación de plagas, el control de las actividades de alimentación de plagas en un cultivo particular que contiene una cantidad eficaz de la proteína de tipo TIC3668) o matanza (haciendo que la morbilidad, la mortalidad o la reducción de la fecundidad de) una plaga. Estos
15 términos pretenden incluir el resultado de proporcionar una cantidad plaguicidamente eficaz de una proteína tóxica a una plaga, donde la exposición de la plaga a la proteína tóxica resulta en la morbilidad, la mortalidad, reducción de la fecundidad, o retraso en el crecimiento. Estos términos
20 también incluyen la repulsión de la plaga de la planta, un tejido de la planta, una parte de la planta, semilla, células vegetales, o desde la ubicación geográfica particular donde la planta puede estar creciendo, como resultado de proporcionar una cantidad plaguicidamente eficaz de la proteína tóxica en o

sobre la planta. En general, la actividad pesticida se refiere a la capacidad de una proteína tóxica para ser eficaz en la inhibición del crecimiento, desarrollo, viabilidad, el comportamiento de alimentación, comportamiento de apareamiento, la fecundidad, o cualquier disminución medible en los efectos adversos causados por una alimentación de insectos en esta proteína, fragmento de proteína, segmento de proteína o polinucleótido de una plaga objetivo en particular, incluyendo, pero no limitado a, insectos del orden Lepidoptera o Coleoptera. La proteína tóxica puede ser producida por la planta o puede aplicarse a la planta o al medio ambiente dentro de la ubicación donde se encuentra la planta. Los términos "bioactividad", "efectivo", "eficaz" o variaciones de los mismos son también términos indistintamente utilizados en esta solicitud para describir los efectos de las proteínas de la presente invención sobre plagas de insectos objetivo.

Una cantidad plaguicidamente eficaz de un agente tóxico, cuando se proporciona en la dieta de una plaga objeto, exhibe actividad pesticida cuando el agente tóxico entra en contacto con la plaga. Un agente tóxico puede ser una proteína pesticida o uno o más agentes químicos conocidos en la técnica. Los agentes químicos insecticidas y los agentes proteína insecticida pueden ser usados solos o en combinaciones entre sí. Los agentes químicos incluyen, pero no se limitan a

moléculas de dsRNA dirigidas a genes específicos para la supresión de una plaga objetivo, compuestos organoclorados, organofosfatos, carbamatos, piretroides, neonicotinoides, y ryanoides. Los agentes proteína insecticida incluyen las

5 toxinas proteicas establecidas en esta solicitud, así como otros agentes tóxicos proteináceos incluyendo aquellos que se dirigen a Lepidópteros y Coleópteros, así como toxinas proteicas que se utilizan para controlar otras plagas de plantas tales como proteínas Cry disponibles en la técnica para

10 utilizar en el control de especies de Hemípteros y Homópteros. Se pretende que la referencia a una plaga, especialmente una plaga de una planta de cultivo, signifique plagas de insectos de las plantas de cultivo, particularmente aquellas que están controladas por la clase toxina proteína relacionada con

15 TIC3668. Sin embargo, la referencia a una plaga también puede incluir Hemípteros y Homópteros plagas de insectos de las plantas, así como nematodos y hongos cuando los agentes tóxicos dirigidos a estas plagas están co-localizados o presentes junto con una o más proteínas de la clase toxina proteína relacionada

20 TIC3668.

Las proteínas individuales que comprenden la clase proteína relacionada TIC3668-están relacionadas por función común y muestran actividad insecticida hacia plagas de insectos de las especies de insectos Coleoptera y Lepidoptera, incluyendo

adultos, larvas, pupas, y los recién nacidos. Los insectos del orden Lepidoptera incluyen, pero no se limitan a, gusanos soldados, gusanos cortadores, orugas agrimensoras, y heliotines de la familia Noctuidae, *por ejemplo*, gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda*), gusano de la remolacha (*Spodoptera exigua*), gusano soldado bertha (*Mamestra configurata*), gusano cortador negro (*Agrotis ipsilon*), oruga agrimensora del repollo (*Trichoplusia ni*), oruga agrimensora de la soja (*Pseudoplusia includens*), oruga del frijol terciopelo (*Anticarsia gemmatilis*), verde del trébol (*Hypena scabra*), gusano cogollero del tabaco (*Heliothis virescens*), gusano cortador granulado (*Agrotis subterranea*), gusano cogollero (*Pseudaletia unipuncta*), gusano cortador occidental (*Agrotis orthogonia*); barrenadores, Coleophoridae, orugas, gusanos telarañeros, gusano de piña, gusano de repollo y polillas de la familia Pyralidae, *por ejemplo*, barrenador europeo del maíz (*Ostrinia nubilalis*), naranja de ombligo (*Amyelois transitella*), gusano telarañero de la raíz del maíz (*Crambus caliginosellus*), gusano telarañero de césped (*Licarsisalis Herpetogramma*), polilla del girasol (*Homeosoma electellum*), barrenador menor del tallo de maíz (*Elasmopalpus lignosellus*); enrolladores de hoja, gusanos de las yemas, gusanos de semillas y gusanos de la fruta de la familia Tortricidae, *ejemplo*, gusano de la manzana (*Cydia pomonella*),

polilla de la baya de la uva (*Endopiza viteana*), polilla
 oriental de la fruta (*Grapholita molesta*), girasol brote de
 polilla (*Suleima helianthana*); y muchos otros Lepidoptera de
 importancia económica, *ejemplo*, polilla de la col (*Plutella*
 5 *xylostella*), gusano rosado (*Pectinophora gossypiella*) y la
 polilla gitana (*Lymantria dispar*). Otras plagas de insectos
 del orden de los Lepidopteras incluyen, *por ejemplo*, *Alabama*
argillacea (gusano de la hoja de algodón), *Archips argyrospila*
 (rodillo de la hoja del árbol de la fruta), *Archips rosana*
 10 (enrollador de hoja europea) y otras especies de archip, *Chilo*
suppressalis (barrenador asiático de arroz o barrenador del
 tallo de arroz), *Cnaphalocrocis medinalis* (rodillos de la hoja
 de arroz), *Crambus caliginosellus* (gusano telarañero de raíz
 de maíz), *Crambus teterrellus* (gusano telarañero bluegrass),
 15 *Diatraea grandiosella* (barrenador del maíz del suroeste),
Diatraea saccharalis (barrenador surgarcane), *Earias Insulana*
 (gusano espinoso), *Earias vittella* (gusano descubierto),
Helicoverpa armigera (gusano americano), *Helicoverpa zea*
 (gusano del maíz o gusano del algodón), *Heliothis virescens*
 20 (gusano del tabaco), *Herpetogramma licarsisalis* (gusano
 telarañero de césped), *Lobesia botrana* (la polilla europea de
 vid de uva), *Phyllocnistis citrella* (minador de los cítricos),
Pieris brassicae (mariposa blanca grande), *Pieris rapae* (col
 importado, o pequeña mariposa blanca), *Plutella xylostella*

(polilla de la col), *Spodoptera exigua* (oruga de la remolacha), *Spodoptera litura* (gusano gris del tabaco, oruga clúster), y *Tuta absoluta* (minador del tomate). Los insectos del orden de los Coleoptera incluyen, pero no se limitan a, *Agriotes* spp.,

5 *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., *Otiorhynchus* spp., *Phlyctinus* spp., *Popillia* spp., *Psylliodes*

10 spp., *Rhizopertha* spp., *Scarabeidae*, *Sitophilus* spp., *Sitotroga* spp., *Tenebrio* spp., *Tribolium* spp. y *Trogoderma* spp, particularmente cuando la plaga es *Diabrotica virgifera virgifera* (gusano de la raíz del maíz occidental, WCR), *Diabrotica barberi* (gusano de la raíz del maíz del norte, NCR),

15 *Diabrotica virgifera zea* (gusano de la raíz del maíz mexicano, MCR), *Diabrotica balteata* (gusano de la raíz del maíz brasilero (BZR), *Diabrotica undecimpunctata howardii* (gusano de la raíz del maíz sureño, SCR) y un complejo del gusano de la raíz del maíz brasilero (BCR) que consiste en *Diabrotica viridula* y

20 *Diabrotica speciosa*).

La referencia que se haga en esta solicitud a una “molécula de ADN aislado”, “molécula aislada de polinucleótido”, o un término o frase equivalente, pretende referirse a que la molécula de ADN es una que está presente sola o en combinación

con otras composiciones, pero no dentro de su ambiente natural. Por ejemplo, los elementos de ácidos nucleicos tales como una secuencia codificante, secuencia de intrón, secuencia líder no traducida, la secuencia de promotor, secuencia de terminación de la transcripción, y similares, que se encuentran naturalmente en el ADN del genoma de un organismo no se consideran "aisladas" siempre y cuando el elemento esté dentro del genoma del organismo y en la ubicación dentro del genoma en la que se encuentra de forma natural. Sin embargo, cada uno de estos elementos, y sub-partes de estos elementos, sería "aislado" dentro del alcance de esta divulgación, siempre y cuando el elemento no esté dentro del genoma del organismo y en la ubicación dentro del genoma en la que se encuentra de forma natural. Del mismo modo, una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína insecticida o cualquier variante natural de insecticida de esa proteína sería una secuencia de nucleótidos aislada, siempre y cuando la secuencia de nucleótidos no esté dentro del ADN de la bacteria en la que se encuentra la secuencia que codifica la proteína de forma natural. Una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia sintética de aminoácidos de la proteína insecticida de origen natural será considerada aislada para los fines de esta divulgación. Para los fines de esta divulgación, cualquier secuencia de nucleótidos transgénica, *es decir*, la

secuencia de nucleótidos del ADN insertado en el genoma de las células de una planta o bacteria, o presente en un vector extracromosómico no deberá ser considerado una secuencia de nucleótidos aislada si está presente dentro del plásmido o

5 estructura similar utilizado para transformar las células, dentro del genoma de la planta o bacteria, o presentes en cantidades detectables en los tejidos, la progenie, muestras biológicas o productos de materias primas derivadas de la planta o bacteria.

10 Como se describe adicionalmente en esta solicitud, un marco de lectura abierto (ORF) (SEC ID NO: 1) que codifica TIC3668 (SEC ID NO: 2) fue descubierto en el ADN obtenido a partir de la cepa *Brevibacillus laterosporus* EG5552. Otros genomas bacterianos fueron examinados para secuencias que codifican la

15 proteína relacionada TIC3668. Varios otros marcos de lectura abierta se identificaron en estos otros genomas bacterianos que codifican secuencias de aminoácidos que se asemejan a la proteína EG5552 TIC3668, incluyendo las proteínas TIC3668 como TIC3669 que fue descubierta en el ADN obtenido de la cepa

20 *Brevibacillus laterosporus* EG5551 (SEC ID NO: 3 que codifica SEC ID NO: 4), TIC3670 que fue descubierta en el ADN obtenido a partir de la cepa *Brevibacillus laterosporu* EG5553 (SEC ID NO: 5 que codifica SEC ID NO: 6), TIC4076 que fue descubierta en el ADN obtenido a partir de la cepa *Brevibacillus laterosporus*

ATCC6456 (SEC ID NO: 7 que codifica SEC ID NO: 8), TIC4078 que fue descubierta en el ADN obtenido a partir de la cepa *Brevibacillus laterosporus* EG4227 (SEC ID NO: 9 que codifica SEC ID NO: 10), TIC4346 que fue descubierta en el ADN obtenido a
5 partir de la cepa *Brevibacillus laterosporus* EG5551 (SEC ID NO: 13 que codifica SEC ID NO: 14), TIC4826 que fue descubierta en el ADN obtenido a partir de la cepa *Brevibacillus laterosporus* AG0021D10 (SEC ID NO: 15 que codifica SEC ID NO: 16), TIC4861 (SEC ID NO: 17 que codifica SEC ID NO: 18), TIC4862 (SEC ID NO: 19 que
10 codifica SEC ID NO: 20) y TIC4863 (SEC ID NO: 21 que codifica SEC ID NO: 22), que fueron descubiertas en el ADN obtenido de la cepa *Brevibacillus laterosporus* EG4227. Una proteína similar a TIC3668 adicional, TIC4260 (SEC ID NO: 11 que codifica SEC ID NO: 12), fue creada por la combinación de la variación de la secuencia
15 de aminoácidos de origen natural de cinco proteínas nativas similares a TIC3668 diferentes para crear una proteína collage.

Las secuencias de codificación respectivas se clonaron y se expresaron en células huésped microbianas para producir proteínas recombinantes para su uso en bioensayos de insectos.
20 Como se describe adicionalmente en esta solicitud, se muestra que estas proteínas exhiben bioactividad frente a especies de *Diabrotica*, incluyendo gusano de la raíz del maíz del oeste (WCR, *Diabrotica virgifera virgifera*), barrenador del maíz del oeste europeo (BCE, *Ostrinia nubilalis*), barrenador del maíz

del suroeste (SWC, *Diatraea grandiosella*), y oruga agrimensora de la soja (SBL, *Chrysodeixis includens*).

Una característica sorprendente de las proteínas de tipo TIC3668 es la presencia de un segmento de ácido amino N-terminal correspondiente a la posición del aminoácido 1 a 23 para TIC3668, TIC3669, TIC3670, TIC4076, TIC4078, TIC4260, TIC4346, TIC4826, TIC4863; 1 a 12 para TIC4861; y de 1 a 21 para TIC4862. Cada uno de estos segmentos de aminoácidos N-terminal pueden omitirse de la proteína respectiva y la secuencia de polinucleótido que codifica el segmento respectivo también puede omitirse. Cuando se expresa *en plantas*, la omisión de estos segmentos respectivos sorprendentemente resultó en un incremento de la actividad insecticida contra las especies de gusano de la raíz del maíz en comparación con la expresión de la toxina proteína de longitud completa que contiene el segmento omitido. Los segmentos de toxina proteica que carecen de los segmentos de aminoácidos N-terminales antes mencionados se denominan en este documento "proteínas toxina de tipo TIC3668 maduras". En general, la referencia a la versión madura de una proteína de tipo TIC3668 está anotada en la presente memoria con la letra "m" que precede al nombre de la toxina, para diferenciar la referencia a la secuencia madura de la referencia a la secuencia nativa de longitud completa. Por ejemplo, la versión madura de la secuencia de aminoácidos

para TIC3668 (SEC ID NO: 2) es mTIC3668 (SEC ID NO:23). Las versiones maduras para TIC3669 (SEC ID NO:4), TIC3670 (SEC ID NO:6), TIC4076 (SEC ID NO:8), TIC4078 (SEC ID NO:10), TIC4260 (SEC ID NO:12), TIC4346 (SEC ID NO:14) y TIC4826 (SEC ID NO:16) son mTIC3669 (SEC ID NO:24), mTIC3670 (SEC ID NO:25), mTIC4076 (SEC ID NO:26), mTIC4078 (SEC ID NO:27), mTIC4260 (SEC ID NO:28), mTIC4346 (SEC ID NO:29) y mTIC4826 (SEC ID NO:30), respectivamente. Las proteínas de longitud completa TIC4861 (SEC ID NO: 18), TIC4862 (SEC ID NO: 20) y TIC4863 (SEC ID NO: 22) son variantes de longitud de secuencia de cada una de ellas y sólo difieren en la longitud de su segmento de ácido amino N-terminal. La eliminación del segmento de aminoácidos N-terminal en TIC4861, TIC4862, y TIC4863 crea una secuencia de aminoácidos madura idéntica para mTIC4861, mTIC4862, y mTIC4863. Por lo tanto, las secuencias de aminoácidos para mTIC4861, mTIC4862, y mTIC4863 están codificadas por la misma secuencia de polinucleótido (mTIC4861, SEC ID NO: 31). Las secuencias de proteínas maduras similares a TIC3668 son codificadas por SEC ID NO:64 (que codifica mTIC3668), SEC ID NO:65 (que codifica mTIC3669), SEC ID NO:66 (que codifica mTIC3670), SEC ID NO:67 (que codifica mTIC4076), SEC ID NO:68 (que codifica mTIC4078), SEC ID NO:69 (que codifica mTIC4260), SEC ID NO:70 (que codifica mTIC4346), SEC ID NO:71 (que codifica mTIC4826), y SEC ID NO.72 (que codifica mTIC4861,

mTIC4862, y mTIC4863) para la expresión en huéspedes bacterianos.

Los miembros adicionales a la familia de tipo TIC3668 pueden ser creados mediante el uso de las variaciones de aminoácidos presentes en la naturaleza de algunos o todos los miembros de la familia para crear nuevas proteínas de un mayor nivel de diversidad y cantidad de propiedades de la secuencia de aminoácidos. Las variantes de la clase toxina proteína de tipo TIC3668 fueron producidas mediante la alineación de las secuencias de aminoácidos de miembros de la familia de tipo TIC3668, la combinación de diferencias en el nivel de la secuencia de aminoácidos hacia una nueva secuencia de aminoácidos y la realización de los cambios apropiados a los polinucleótidos que codifican estas variantes. Un ejemplo de esto es TIC4260. SEC ID NO: 11 es la secuencia de polinucleótido que codifica la proteína TIC4260 (SEC ID NO: 12). La proteína madura (mTIC4260, SEC ID N.º:28) se codifica por la secuencia de polinucleótidos de SEC ID N.º:43.

Los fragmentos de las toxinas proteicas de tipo TIC3668 pueden ser formas truncadas donde uno o más aminoácidos se eliminan desde el extremo N-terminal, extremo C-terminal, el medio de la proteína, o combinaciones de los mismos con actividad inhibidora de insectos. Estos fragmentos pueden ser de origen natural o variantes sintéticas de TIC3668, TIC3669, TIC3670,

TIC4260, TIC4076, TIC4078, TIC4346, TIC4826, TIC4861, TIC4862 o TIC4863, pero deben conservar o mejorar la actividad inhibidora de insectos de TIC3668, TIC3669, TIC3670, TIC4260, TIC4076, TIC4078, TIC4346, TIC4826, TIC4861, TIC4862 o TIC4863.

5 Variantes de supresión truncadas de N-terminal o C-terminal incluyen, pero no se limitan a, TIC3668, TIC3669, TIC3670, TIC4260, TIC4076, TIC4078, TIC4346, TIC4826, TIC4861, TIC4862 o TIC4863 proteínas que carecen de restos de aminoácidos de cualquiera de los extremos N- terminal y/o C-terminal. Por
10 ejemplo, los residuos de aminoácidos N-terminal 1 a 23 de una proteína TIC3668 se pueden eliminar dando como resultado una proteína toxina que tiene los aminoácidos 24-317 de la SEC ID NO: 2. La extracción de 10 o 20 aminoácidos desde el extremo amino ácido C-terminal de una proteína TIC3668 resultó en una
15 pérdida de actividad insecticida, mientras que la eliminación de un solo aminoácido no afectó a la actividad.

Las proteínas de la clase proteína de tipo TIC3668, y proteínas que se asemejan a las proteínas de la clase proteína de tipo TIC3668, se pueden identificar por comparación con cada una de
20 ellas utilizando diversos algoritmos basados en informática conocidos en la técnica (ver Tablas 1 y 2). Las identidades de la secuencia de aminoácidos presentadas en este documento son el resultado de una alineación Clustal W usando estos parámetros por defecto: Matriz peso: blosum, penalidad por

apertura de hueco: 10.0, penalidad por extensión de hueco: 0.05, huecos hidrófilos: En, residuos hidrófilos: GPSNDQERK, penalidades de hueco específicas de residuo: En (Thompson, *et al.* (1994) Nucleic Acids Research, 22:4673-4680). La identidad de aminoácidos porcentual se calcula adicionalmente por el producto de 100% multiplicado por (identidades de aminoácidos/longitud de la proteína sujeto). Otros algoritmos de alineación también están disponibles en la técnica y proporcionan resultados similares a los obtenidos utilizando una alineación Clustal W.

Se pretende que una proteína que presenta actividad inhibidora de insectos contra una especie de insectos Lepidópteros sea un miembro de la clase toxina proteína de tipo TIC3668 si la proteína se utiliza en una consulta, *por ejemplo*, en una alineación Clustal W, y si al menos una de las proteínas de la presente invención ya que se describe como mTIC4260 se identifica y cómo impacta en tal alineación en la que las proteínas de consulta exhiben al menos aproximadamente 85% a aproximadamente 100% de identidad de secuencia de aminoácidos a lo largo de la longitud de la proteína de consulta, es decir 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%, o cualquier porcentaje fracción en este rango; o al menos una de las proteínas de la presente invención ya que se establece como mTIC3668 se identifica y cómo impacta

en tal alineación en la que las proteínas de consulta exhiben al menos aproximadamente 89% a aproximadamente 100% de identidad de secuencia de aminoácidos a lo largo de la longitud de la proteína de consulta, es decir 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%, o cualquier fracción de porcentaje en este rango; o al menos una de las proteínas de la presente invención ya que se establece como mTIC3669 y/o mTIC3670 son identificadas y cómo impacta en dicha alineación en la que la proteína de consulta exhibe al menos aproximadamente 90% a aproximadamente 100% de aminoácidos de identidad de secuencia a lo largo de la longitud de la proteína de consulta, que es 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%, o cualquier fracción de porcentaje en este rango; o al menos una de las proteínas de la presente invención ya que se establece como mTIC4826 se identifica y cómo impacta en dicha alineación en la que las proteínas de consulta exhiben al menos aproximadamente 91% a aproximadamente 100% de aminoácidos de identidad de secuencia a lo largo de la longitud de la proteína de consulta, es decir 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%, o cualquier fracción de porcentaje en este rango.

Se pretende que una proteína que presenta actividad inhibidora de insectos contra una especie de insectos Coleópteros sea un miembro de la clase toxina proteína de tipo TIC3668 si la

proteína se utiliza en una consulta, *por ejemplo*, en una alineación Clustal W, y al menos una de las proteínas de la presente invención que se establece como mTIC3668, mTIC3669, mTIC3670, mTIC4076, mTIC4078, mTIC4260, mTIC4346, mTIC4826, 5 mTIC4861, mTIC4862 y mTIC4863 se identifican como impactos de tal alineación en la que las proteínas de consulta exhiben al menos aproximadamente 35% a aproximadamente 100% identidad de aminoácidos a lo largo de la longitud de la proteína de consulta que es de aproximadamente 35%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 76%, 10 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 85%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%, o cualquier fracción de porcentaje en este rango.

Los ejemplos de proteínas de la clase toxina proteína de tipo TIC3668 fueron alineados entre sí utilizando un algoritmo 15 Clustal W. Se creó una matriz de pares de porcentajes de identidades de secuencias de aminoácidos para cada par de las proteínas de longitud completa, según se aprecia en la Tabla 1. Se creó una matriz de pares de porcentajes de identidades

de secuencias de aminoácidos para cada par de las proteínas de longitud madura, según se aprecia en la Tabla 2.

Tabla 1. Pantalla de matriz de pares de ejemplares de proteínas de longitud completa

5			N										
	SEC ID	M	2	6	4	8	14	18	20	22	16	10	12
	2	TIC	-	99.4	97.8	96.2	97.2	93.1	95.6	96.5	97.2	94.	96
	6	TIC	99.4	-	98.4	96.8	97.2	93.7	96.2	97.2	97.8	95	95
	4	TIC	97.8	98.4	-	96.8	96.8	93.4	96.2	97.2	97.5	94.	95
10	8	TIC	96.2	96.8	96.8	-	98.4	94.3	97.2	98.1	98.1	96.	93
	14	TIC	97.2	97.2	96.8	98.4	-	94.3	97.2	98.1	98.7	96.	93
	18	TIC	96.4	97.1	96.7	97.7	97.7	-	99.7	99.7	98.4	95.	92
	20	TIC	96.2	96.8	96.8	97.8	97.8	96.8	-	99.7	98.4	95.	92
	22	TIC	96.5	97.2	97.2	98.1	98.1	96.2	99.1	-	98.7	95.	92
15	16	TIC	97.2	97.8	97.5	98.1	98.7	95	97.8	98.7	-	95.	93
	10	TIC	94.3	95	94.6	96.2	96.2	92.1	94.6	95.6	95.9	-	96
	12	TIC	96.2	95.6	95.3	93.4	93.7	89.3	91.8	92.7	93.4	96.	-
20													

Descripción de la Tabla: La alineación Clustal W entre (X) e (Y) se presenta en una matriz de pares. Las columnas (N) se refieren a SEC ID N0. La columna (M) se refiere al nombre de

la proteína (TIC#). Se calcula la identidad de ácido amino porcentual entre todos los pares y se representa por el primer número en cada caja. El segundo número (entre paréntesis) en cada cuadro representa el número de aminoácidos idénticos entre el par.

Tabla 2. Pantalla de matriz de pares de ejemplares de proteínas maduras

		N								
SEC ID										
NO:	M	26	29	30	31	23	25	24	27	28
26	mTIC4076	-	98.3 (290)	98 (289)	98 (289)	96.3 (284)	96.9 (286)	96.6 (285)	96.3 (284)	93.2 (275)
29	mTIC4346	98.3 (290)	-	98.6 (291)	98 (289)	97.3 (287)	97.3 (287)	96.6 (285)	96.3 (284)	93.6 (276)
30	mTIC4826	98 (289)	98.6 (291)	-	98.6 (291)	97.3 (287)	98 (289)	97.3 (287)	95.9 (283)	93.2 (275)
31	mTIC4861 mTIC4862 mTIC4863	98 (289)	98 (289)	98.6 (291)	-	96.6 (285)	97.3 (287)	96.9 (286)	95.6 (282)	92.5 (273)
23	mTIC3668	96.3 (284)	97.3 (287)	97.3 (287)	96.6 (285)	-	99.3 (293)	98 (289)	93.9 (277)	95.9 (283)
25	mTIC3670	96.9 (286)	97.3 (287)	98 (289)	97.3 (287)	99.3 (293)	-	98.6 (291)	94.6 (279)	95.3 (281)

24	mTIC3669	96.6 (285)	96.6 (285)	97.3 (287)	96.9 (286)	98 (289)	98.6 (291)	-	94.6 (279)	95.3 (281)
27	mTIC4078	96.3 (284)	96.3 (284)	95.9 (283)	95.6 (282)	93.9 (277)	94.6 (279)	94.6 (279)	-	95.9 (283)
28	mTIC4260	93.2 (275)	93.6 (276)	93.2 (275)	92.5 (273)	95.9 (283)	95.3 (281)	95.3 (281)	95.9 (283)	-

Descripción de la Tabla: La alineación Clustal W entre (X) e (Y) se presenta en una matriz de pares. Las columnas (N) se refieren a SEC ID NO. La columna (M) se refiere al nombre de la proteína (TIC#). Se calcula la identidad de ácido amino porcentual entre todos los pares y se representa por el primer número en cada caja. El segundo número (entre paréntesis) en cada cuadro representa el número de aminoácidos idénticos entre el par.

10

Las proteínas de longitud completa y maduras de la clase toxina proteína de tipo TIC3668 también pueden estar relacionadas por la estructura primaria (motivos de aminoácidos conservados), por la longitud (alrededor de 295 aminoácidos para las proteínas maduras y alrededor de 317 aminoácidos para las proteínas de longitud completa) y por otras características. Las proteínas de longitud completa de la presente invención tienen una masa medida de aproximadamente 35k-Dalton cuando se ejecutan en geles de proteínas en condiciones de

15

desnaturalización, y las proteínas maduras tienen una masa medida de aproximadamente 32 kDa. Las características de las de larga duración y las formas maduras de la clase toxina proteína de tipo TIC3668 se presentan en las tablas 3 y 4.

5

Tabla 3 – Características de las Proteínas de Longitud Completa

<u>Pro-</u> <u>teín</u> <u>a</u>	<u>Peso</u> <u>Molecu</u> <u>lar</u> (en Dal- tons)	<u>Lon</u> <u>-</u> <u>gi-</u> <u>tud</u> <u>del</u> <u>Áci</u> <u>-do</u> <u>Ami</u> <u>-no</u>	<u>Punto</u> <u>Iso-</u> <u>eléc-</u> <u>trico</u>	<u>Car</u> <u>-ga</u> <u>a PH</u> <u>7.0</u>	<u>Núme-</u> <u>ro de</u> <u>Aminoá</u> <u>cidos</u> <u>(-)</u> <u>Fuer-</u> <u>temen-</u> <u>te</u> <u>Bási-</u> <u>cos</u>	<u>Númer</u> <u>o de</u> <u>Ami-</u> <u>no-</u> <u>áci-</u> <u>dos</u> <u>Fuer-</u> <u>temen</u> <u>te</u> <u>Áci-</u> <u>dos</u>	<u>Número</u> <u>de</u> <u>Aminoá</u> <u>cidos</u> <u>Hidro-</u> <u>fóbi-</u> <u>cos</u>	<u>Númer</u> <u>o de</u> <u>Amino</u> <u>-</u> <u>ácido</u> <u>s</u> <u>Pola-</u> <u>res</u>
TIC3 668	34770. 96	317	9.049	5.2 29	34	29	95	111
TIC3 669	34769. 91	317	8.898	4.2 31	34	30	95	111
TIC3 670	34788. 89	320	8.898	4.2 31	34	30	93	112

TIC4 076	34652. 83	317	8.721	3.2 32	32	29	95	112
TIC4 078	34676. 86	317	8.936	4.3 97	32	28	96	110
TIC4 260	34743. 98	317	9.077	5.3 95	33	28	96	109
TIC4 826	34734. 97	317	8.899	4.2 31	33	29	95	111
TIC4 861	33448. 24	306	8.439	2.2 33	31	29	87	110
TIC4 862	34392. 43	315	8.439	2.2 33	31	29	94	112
TIC4 863	34648. 77	317	8.899	4.2 31	33	29	94	112
TIC4 346	34717. 95	317	8.437	2.2 35	32	30	97	109

Tabla 4 - Características de las Proteínas Maduras

<u>Proteína</u>	<u>Peso Mole- cular</u> (en Daltons)	<u>Longitud del Ácido Amino- no</u>	<u>Punto Iso- eléctrico</u>	<u>Carga a a PH 7.0</u>	<u>Número de Amino ácidos Fuertes Básicos</u>	<u>Número de Amino ácidos Fuertes Ácidos</u>	<u>Número de Amino ácidos Hidrofóbicos</u>	<u>Número de Amino ácidos Polares</u>
mTIC3 668	32317 .06	295	8.722	3.06 4	32	29	83	104
mTIC3 669	32303 .95	295	8.436	2.06 7	32	30	82	105
mTIC3 670	32334 .99	295	8.436	2.06 7	32	30	81	105
mTIC4 076	32186 .87	295	8.000	1.06 8	30	29	82	106
mTIC4 078	32222 .96	295	8.466	2.23 3	30	28	84	103
mTIC4 260	32290 .07	295	8.747	3.23 0	31	28	84	102

mTIC4 826	32269 .01	295	8.436	2.06 6	31	29	82	105
mTIC4 861 mTIC4 862 mTIC4 863	32182 .81	295	8.436	2.06 6	31	29	81	106
mTIC4 346	32251 .99	295	7.092	0.07 1	30	30	84	103

Las proteínas de la TIC3668 de tipo clase toxina proteína descrita representan una nueva clase de proteínas insecticidas. Con referencia a la Tabla 5, todos los números encima de la

5 línea diagonal que corresponden a 100% de identidad representan el número de diferencias de aminoácidos entre las proteínas correspondientes que se comparan en la intersección de esa fila y columna particular. Los números debajo de la línea diagonal que corresponden a 100% de identidad representan la identidad

10 porcentual de las proteínas correspondientes que se comparan en la intersección de esa fila y columna particular. Los miembros de longitud madura de esta clase de proteínas exhiben una identidad de aminoácidos no mayor a 90,54% a cualquier otra proteína insecticida conocida en la técnica, como se demuestra

en la alineación proporcionada en la Tabla 5. La proteína insecticida que exhibe la identidad más cercana a cualquiera de las proteínas de longitud madura de la presente invención es SEC ID NO: 50 en la Solicitud de Patente de Estados Unidos

5 Número de Publicación 20110030093 (AXMI-209) con 90,5% de identidad de secuencia mTIC4076, mTIC4346, mTIC4826, y mTIC4863. Esta divulgación solo demuestra una actividad contra el Lepidoptera, mientras que las proteínas ejemplares de la presente invención demuestran una actividad contra el

10 Coleoptera. H0UDD3_BRELA, F7TVP6_BRELA, y U4WSU1_BRELA son secuencias de proteínas no anotadas previstas de la fase de lectura abierta en secuencias del genoma reportados por haber sido obtenidos a partir de *B. laterosporous*. No se reporta actividad insecticida para estas proteínas.

15

Tabla 5 - Alineación de Proteínas de Longitud Madura TIC3886 con Proteínas Arte Anteriores

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
mTIC 3668	1	100	6	2	11	18	12	8	8	10	36	32	32	33
mTIC 3669	2	98.0	100	4	10	16	14	10	8	9	35	32	32	32

mTIC 3670	3	99.3	98.6	100	9	16	14	8	6	8	34	30	30	31
mTIC 4076	4	96.3	96.6	97. 0	10 0	11	20	5	6	6	30	28	30	29
mTIC 4078	5	93.9	94.6	94. 6	96 .3	10 0	12	11	1	13 2	37	34	36	34
mTIC 4260	6	95.9	95.3	95. 3	93 .2	95 .9	10 0	19	2 0	22	48	44	44	43
mTIC 4346	7	97.3	96.6	97. 3	98 .3	96 .3	93 .6	10 0	4	6	30	26	28	29

mTIC 4826	8	97 .3	97 .3	98 .0	98 .0	95 .9	93. 2	98. 6	10 0	4	30	24	24	25
mTIC 4863	9	96 .6	97 .0	97 .3	98 .0	95 .6	92. 5	98. 0	98 .6	100	30	28	28	27
AXMI _209	1 0	88 .6	89 .0	89 .3	90 .5	88 .3	84. 9	90. 5	90 .5	90. 4	100	6	8	7
H0UD D3_ BREL A	1 1	89 .9	89 .9	90 .5	91 .2	89 .3	86. 1	91. 8	92 .4	91. 2	98. 1	10 0	2	3
F7TV P6_ BREL	1 2	89 .9	89 .9	90 .5	90 .5	88 .6	86. 1	91. 2	92 .4	91. 2	97. 5	99 .4	10 0	3

A														
U4WS														
U1_		89	89	90	90	89	86.	90.	92	91.	97.	99	99	10
BREL	1	.6	.9	.2	.9	.3	4	9	.1	5	8	.1	.1	0
A	3													

Las proteínas TIC3668 descritas en esta aplicación exhiben actividad en bioensayos de dieta contra Coleópteros, incluyendo WCR. En algunos casos, se puede observar actividad

5 Lepidopterana.

Como se describe adicionalmente en los Ejemplos de esta solicitud, las secuencias de polinucleótidos que codifican las proteínas de toxina TIC3668 fueron diseñados para su uso en plantas. Los polinucleótidos ejemplares que fueron diseñados

10 para la expresión en plantas y que codifican la longitud completa del inhibidor de insectos de las proteínas TIC3668, TIC3669, TIC3670, TIC4260, TIC4076, TIC4078, TIC4346, TIC4826, TIC4861, TIC4862, y TIC4863 que son descritas en SEC ID NO:32, SEC ID NO:34, SEC ID NO:36, SEC ID NO:38, SEC ID NO:40, SEC ID NO:42, SEC ID NO:44, SEC ID NO:46, SEC ID NO:48, SEC ID NO:50, y SEC ID

15 NO:51. Los polinucleótidos ejemplares que fueron diseñados para la expresión en plantas y que codifican una forma madura del inhibidor

de insectos de las proteínas mTIC3668, mTIC3669, mTIC3670, mTIC4260, mTIC4076, mTIC4078, mTIC4346, mTIC4826, mTIC4861, mTIC4862, y mTIC4863 que son descritas en SEC ID NO:33, SEC ID NO:35, SEC ID NO:37, SEC ID NO:39, SEC ID NO:41, SEC ID NO:43, SEC ID NO:45,
5 SEC ID NO:47, y SEC ID NO:49.

Los casetes de expresión y vectores que contienen estas secuencias de polinucleótidos se construyeron e introdujeron en células de plantas de maíz de acuerdo con métodos y técnicas de transformación conocidas en la técnica. Las células
10 transformadas se regeneraron en plantas transformadas que fueron observadas para expresar proteínas toxinas TIC3668. Para probar la actividad plaguicida, los bioensayos se realizaron en presencia de larvas de plagas de Lepidópteros o Coleópteros usando discos de hojas de plantas obtenidas a
15 partir de las plantas transformadas.

La actividad inhibidora de insectos de miembros ejemplares de la clase toxina proteína de tipo TIC3668 se describe con más detalle en los Ejemplos. Las proteínas ejemplares están relacionadas por función común y muestran actividad insecticida
20 hacia especies de insectos Coleoptera y Lepidoptera, incluyendo adultos, larvas, pupas y recién nacidos.

Las composiciones polinucleótidas recombinantes que codifican proteínas de tipo TIC3668 son contempladas. Por ejemplo, las proteínas de tipo TIC3668 se pueden expresar con construcciones

de ADN recombinante en la que una molécula de polinucleótido con una ORF que codifica la proteína está unida operativamente a elementos de expresión genéticos tales como un promotor y cualquier otro elemento regulador necesario para la expresión

5 en el sistema para el cual la construcción está diseñada. Los ejemplos no limitativos incluyen un promotor funcional en planta unido operablemente a las secuencias de codificación de proteína tipo TIC3668 para la expresión de la proteína en plantas o un promotor funcional en *Bt* unido operablemente a

10 una secuencia de codificación de una proteína tipo TIC3668 para la expresión de la proteína en una bacteria *Bt* u otras especies de *Bacillus*. Otros elementos pueden unirse operablemente a las secuencias de codificación de la proteína tipo TIC3668, incluyendo, pero sin limitarse a, estimulantes, intrones,

15 líderes no traducidos, etiquetas de inmovilización de proteínas codificadas (HIS-tag), péptidos de translocación (*p. ej.*, péptidos de tránsito de plástido, péptidos señal), secuencias de polipéptidos para enzimas modificadoras post-translacionales, sitios de unión ribosómica, y lugares objetivo

20 de iARN. Los ejemplos de las moléculas polinucleótidas recombinantes provistas en este documento incluyen, pero no se limitan a, un promotor heterólogo unido operablemente a un polinucleótido tales como SEC ID N.º:1, SEC ID N.º:3, SEC ID N.º:5, SEC ID N.º:7, SEC ID N.º:9, SEC ID N.º:11, SEC ID N.º:13,

SEC ID N.º:15, SEC ID N.º:17, SEC ID N.º:19, y SEC ID N.º:21, que codifican los polipéptidos o proteínas respectivas con la secuencia de aminoácidos según lo establecido en SEC ID N.º: 2, SEC ID N.º:4, SEC ID N.º:6, SEC ID N.º:8, SEC ID N.º:10, SEC ID N.º:12, SEC ID N.º:14, SEC ID N.º:16, SEC ID N.º:18, SEC ID N.º:20, y SEC ID N.º:22. Los codones de una molécula polinucleótida recombinante que codifican las proteínas reveladas en este documento pueden sustituirse por codones sinónimos (conocida en la técnica como sustitución silenciosa). Los ejemplos no limitativos de los polinucleótidos modificados que codifican cualquiera de las proteínas tipo TIC3668 reveladas en esta aplicación se exponen en la SEC ID N.º: 32, SEC ID N.º:34, SEC ID N.º:36, SEC ID N.º:38, SEC ID N.º:40, SEC ID N.º:42, SEC ID N.º:44, SEC ID N.º:46, SEC ID N.º:48, SEC ID N.º:50, y SEC ID N.º:51 para las secuencias de proteína de extensión completa y SEC ID N.º:33, SEC ID N.º:35, SEC ID N.º:37, SEC ID N.º:39, SEC ID N.º:41, SEC ID N.º:43, SEC ID N.º:45, SEC ID N.º:47, y SEC ID N.º:49 para las secuencias de proteína madura.

Una construcción de ADN recombinante que comprende secuencias codificadoras de proteína tipo TIC3668 también puede incluir una región de ADN que codifica para uno o más agentes inhibitorios de insectos que pueden configurarse para expresar en forma concomitante o co-expresar con una secuencia de ADN que codifica una proteína tipo TIC3668, una proteína distinta

de la proteína tipo TIC3668, una molécula ARNds inhibidora de insectos, o una proteína secundaria. Las proteínas secundarias incluyen, pero no se limitan a, co-factores, enzimas, ligandos y otros agentes que funcionan para asistir en la efectividad del agente inhibidor de insectos, por ejemplo, ayudando a su expresión, influenciando su estabilidad en plantas, optimizando la energía libre para la oligomerización, incrementando su toxicidad y su espectro de actividad. Una proteína secundaria puede facilitar la absorción de uno o más agentes inhibidores de insectos, por ejemplo, o potenciar los efectos tóxicos del agente tóxico.

Una construcción de ADN recombinante puede montarse de modo que todas las proteínas o moléculas ARNds se expresen desde un promotor o cada proteína o que las moléculas ARNds estén bajo control del promotor o alguna combinación de los mismos. Las proteínas de esta invención pueden expresarse a partir de un sistema de expresión de varios genes en el que una o más proteínas de las proteínas TIC3668 se expresan a partir de un segmento de nucleótidos común que también contiene otros marcos de lectura y promotores abiertos, según el tipo de sistema de expresión seleccionado. Por ejemplo, un sistema de expresión de varios genes bacterianos pueden utilizar un promotor individual para impulsar la expresión de marcos de lectura de enlace múltiple/en conjunto abiertos desde adentro de un solo

operón (*p. ej.*, expresión policistronica). En otro ejemplo, un sistema de expresión de planta varios genes puede utilizar cassettes de expresión de enlace múltiple/desvinculado, cada uno expresando una proteína diferente u otro agente tal como una o más moléculas ARNs

Los polinucleótidos recombinantes o construcciones de ADN recombinantes que comprenden una secuencia codificadora de proteína tipo TIC3668 pueden repartirse a células huésped mediante vectores, *p. ej.*, un vector plasmídico, de baculovirus, de cromosoma sintético, de virión, cósmido, fagómido, fagémido o viral. Dichos vectores pueden utilizarse para conseguir una expresión estable o transitoria de la secuencia codificadora de la proteína TIC3668 en una célula huésped, o la expresión subsiguiente del polipéptido codificado. Un polinucleótido recombinante exógeno o construcción de ADN recombinante que comprende una secuencia codificadora de proteína tipo TIC3668 y que se introduce en una célula huésped es referida aquí como "transgen".

Las bacterias transgénicas, las células vegetales transgénicas y las partes de plantas transgénicas que contienen un polinucleótido recombinante que expresa una o más de las secuencias codificadoras de proteína TIC3668 se describen en este documento. El término "célula bacteriana" o "bacteria" puede incluir, pero no se limita a, una célula *Agrobacterium*,

Bacilos, Escherichia, Salmonella, Pseudomonas, o Rhizobium. El término “célula vegetal” o “planta” puede incluir, sin limitarse a, célula vegetal o planta monocotiledónea, dicotiledónea, de alfalfa, banana, cebada, frijol, brócoli, col, brassica, zanahoria, mandioca, ricino, coliflor, apio, garbanzo, col china, cítricos, coco, café, maíz, trébol, algodón, curcubitácea, pepino, abeto de Douglas, berenjena, eucalipto, lino, ajo, uva, lúpulo, puerro, lechuga, pino Taeda, mijo, melones, nuez, avena, oliva, cebolla, pimienta, ornamental, palma, pastura, guisante, maní, pimienta, guandú, pino, papa, álamo, zapallo, pino radiata, rábano, colza, arroz, portainjerto, centeno, cártamo, arbusto, sorgo, pino sureño, soja, espinaca, calabaza, frutilla, remolacha azucarera, caña de azúcar, girasol, maíz dulce, goma dulce, batata, hierbas de mijo, té, tabaco, tomate, triticales, césped, sandía y de trigo. En ciertas presentaciones, se proporcionan plantas transgénicas y partes de plantas transgénicas regeneradas a partir de una célula vegetal transgénica. En ciertas presentaciones, las plantas transgénicas pueden obtenerse de una semilla transgénica, mediante el corte, quiebre, molienda o disociación de dicha parte de la planta. En ciertas presentaciones, la parte de la planta puede ser una semilla, una bellota, una hoja, una flor, un tallo, una raíz, o cualquier porción de la misma, de una porción no regenerable de una parte

de la planta transgénica. Como se utiliza en este contexto, una porción "no regenerable" de la parte de una planta transgénica es una porción que no puede ser inducida para formar una planta entera o que no puede inducirse para formar una planta entera capaz de reproducirse sexual o asexualmente. En ciertas presentaciones, una porción no-regenerable de una parte de la planta es una porción de una semilla, una bellota, una hoja, una flor, un tallo o una raíz transgénica.

Se proveen métodos para crear plantas transgénicas que comprenden cantidades inhibidoras de coleópteros o lepidópteros y de insectos de una proteína tipo TIC3668. Dichas plantas pueden generarse mediante la introducción de un polinucleótido recombinante que codifica cualquiera de las proteínas tipo TIC3668 provistas en esta aplicación en una célula vegetal y a través de la selección de una planta derivada de dicha célula vegetal que expresa una cantidad inhibidora de insecto, coleópteros o lepidópteros de las proteínas tipo TIC3668. Las plantas pueden derivar de células vegetales a través de técnicas de transformación de regeneración, semilla, polen o meristemo. Los métodos para transformar plantas son reconocidas en la técnica.

Los productos vegetales procesados, en donde el producto procesado comprende una cantidad detectable de proteína tipo TIC3668, un segmento inhibidor de insectos o un fragmento del

mismo, o cualquier porción característica del mismo, también se revelan en esta aplicación. En ciertas presentaciones, el producto procesado es seleccionado del grupo que consiste en partes de plantas, biomasa vegetal, aceite, maicena, azúcar, alimento animal, harina, hojuelas, salvado, pelusa, cáscaras, semillas procesadas, y semillas. En ciertas presentaciones, el producto procesado no es regenerable. El producto vegetal puede comprender materias primas u otros productos comerciales derivados de una planta transgénica o parte de una planta transgénica, en donde la materia prima u otros productos pueden ser localizados a través del comercio detectando segmentos de nucleótidos o ARN expresado o proteínas que codifican o comprenden porciones características de una proteína tipo TIC3668.

Las plantas que expresan las proteínas TIC3668 pueden ser atravesadas mediante cultivo con eventos transgénicos que expresan otras toxinas de la proteína o que expresan otras características transgénicas tales como genes tolerantes a herbicidas, genes que confieren rasgos de tolerancia al estrés y rendimiento, y similares, o dichas características pueden combinarse en un vector individual de modo que todas las características se enlacen.

Las secuencias codificadoras de proteína tipo TIC3668 y las secuencias que tienen un porcentaje de identidad sustancial a

las secuencias codificadoras de proteína tipo TIC3668 pueden identificarse utilizando métodos conocidos por aquellos expertos en la técnica, tal como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), amplificación e hibridización térmica. Por ejemplo, las proteínas de la clase de toxina de la proteína TIC3668. pueden utilizarse para producir anticuerpos que se unen específicamente a esta clase de proteínas, y pueden ser implementadas para examinar y encontrar otros miembros de la clase.

Además, las secuencias nucleóticas que codifican la clase de toxina de la proteína TIC3668 (y las secuencias reversas complementarias) pueden ser utilizadas en sondas y cebadores para examinar e identificar otros miembros de la clase utilizando métodos de ampliación e hibridización isotérmica o de ciclo térmico. Concretamente, los oligonucleótidos que derivan de secuencias que se encuentran previstas en alguna de las SEC ID N.º 52 a 61 pueden utilizarse para determinar la presencia o ausencia de un transgen tipo TIC3668 en una muestra de ácido desoxirribonucleico derivado de un producto de consumo. Dada la sensibilidad de ciertos métodos de detección de ácidos nucleicos que utilizan oligonucleótidos, se anticipa que los oligonucleótidos derivados de las secuencias que se establecen en cualquiera de las SEC ID N.º:52, SEC ID N.º:53, SEC ID N.º:54, SEC ID N.º:55, SEC ID N.º:56, SEC ID N.º:57, SEC ID

N.º:58, SEC ID N.º:59, SEC ID N.º:60, y SEC ID N.º:61 pueden utilizarse para detectar un transgen TIC3668, TIC3669, TIC3670, TIC4076, TIC4078, o TIC4260 en productos de consumo derivados de fuentes combinadas donde sólo una fracción del producto de consumo deriva de una planta transgénica que contiene alguna de las SEC ID N.º:52, SEC ID N.º:53, SEC ID N.º:54, SEC ID N.º:55, SEC ID N.º:56, SEC ID N.º:57, SEC ID N.º:58, SEC ID N.º:59, SEC ID N.º:60, y SEC ID N.º:61. Además, se reconoce que dichos oligonucleótidos pueden utilizarse para introducir una variación de secuencia de nucleótidos en cada una de las SEC ID N.º: 52, SEC ID N.º:53, SEC ID N.º:54, SEC ID N.º:55, SEC ID N.º:56, SEC ID N.º:57, SEC ID N.º:58, SEC ID N.º:59, SEC ID N.º:60, y SEC ID N.º:61. Dichos oligonucleótidos "mutagénesis" son útiles para la identificación de TIC3668, TIC3669, TIC3670, TIC4076, TIC4078, o TIC4260, variantes de secuencias de aminoácidos que exhiben un rango de actividad inhibidora de insectos o una expresión variada en células huésped vegetales transgénicas.

Los homólogos de secuencias nucleóticas, *como p. ej.*, proteínas insecticidas codificadas por secuencias de nucleótidos que se hibridizan a cada una o a alguna de las secuencias reveladas en esta aplicación en condiciones de hibridización estrictas, también son una presentación de esta invención. La invención también proporciona un método para

detectar la primera secuencia nucleóticas que se hibridiza a una segunda secuencia de, donde la primera secuencia de nucleótidos (o su secuencia reversa complementaria) codifica una proteína insecticida o un fragmento insecticida del mismo y se hibridiza en condiciones de hibridización estrictas con la segunda secuencia de nucleótidos. En tal caso, la segunda secuencia de nucleótidos puede ser cualquiera de las secuencias de nucleótidos reveladas en la clase de toxina de la proteína TIC3668 en condiciones de hibridización estrictas. Las secuencias que codifican nucleótidos se hibridizan entre sí bajo condiciones de hibridización adecuadas y las proteínas codificadas por dichas secuencias de nucleótidos tienen reacciones cruzadas con antisuero contra cualquiera de las otras proteínas. Las condiciones de hibridización estrictas son conocidas en la técnica y pueden variar en base a la aplicación y resultado deseado y pueden comprender una variedad de reactivos y condiciones. Por ejemplo, los lavados a altas temperaturas constituyen condiciones más rigurosas. En ciertas presentaciones, las condiciones de hibridización de la presente invención puede incluir al menos una hibridización a 42 °C seguida por dos lavados de cinco minutos de duración cada uno a temperatura ambiente en 2X SSC, 0,1% de SDS, seguidos por dos lavados de 30 minutos cada uno a 65 °C en 0,5X SSC, 0,1% de SDS; o una hibridización a 68°C, seguido por un lavado a

68°C, en 2X SSC con 0,1% de SDS; o una forma de hibridización de 4 a 12 horas en 50% formamida, 1 M NaCl y 1% de SDS a 37 C y un lavado en 0,1 X SSC a 60- 65 C.

Un experto en la técnica reconocerá que, debido a la
5 redundancia del código genético, muchas otras secuencias pueden codificar dichas proteínas relacionadas, y dichas secuencias, en la medida en que funcionan para expresar proteínas insecticidas tanto en las cepas del *Bacillus* o en células vegetales, son presentaciones de esta invención, naturalmente
10 reconociendo que dichas secuencias codificadoras redundantes no se hibridizarán con las secuencias nativas de *Bacillus* que codifican TIC3668 bajo estas condiciones. Esta aplicación contempla el uso de estos y otros métodos de identificación conocidos por los expertos en la técnica, para identificar las
15 secuencias codificadoras de proteína tipo TIC3668 y secuencias con un porcentaje de identidad sustancial a las secuencias codificadoras de proteína tipo TIC3668.

Esta divulgación también contempla el uso de métodos moleculares conocidos en la técnica para constituir y clonar
20 proteínas comercialmente útiles con quimeras de proteínas pesticidas; *p. ej.*, las quimeras pueden ensamblarse a partir de segmentos de proteínas tipo TIC3668 para obtener presentaciones prácticas que incluyen el montaje de segmentos de distintas proteínas diferentes de las proteínas TIC3668 y

otras proteínas relacionadas. La clase de proteína TIC3668 puede estar sujeta a la alineación entre sí y con otras proteínas pesticidas *Bacillus* (tanto si están estrechamente relacionadas filogenéticamente o no), y los segmentos de cada una de estas proteínas pueden identificarse, siendo prácticas para la sustitución entre las proteínas alineados, lo cual resulta en la construcción de proteínas quiméricas. Dichas proteínas quiméricas pueden someterse al análisis de bioensayo de plagas y caracterizarse por la presencia o ausencia de bioactividad incrementada o el espectro de parásitos específicos expandidos en comparación con las proteínas parentales de donde deriva cada segmento en la quimera. La actividad pesticida de los polipéptidos puede constituirse aún más para su actividad en una peste particular o a un abanico más amplio de pestes intercambiando dominios o segmentos con otras proteínas o utilizando métodos de evolución dirigida conocidos en la técnica.

Los métodos de control de insectos, particularmente infecciones de lepidópteros o coleópteros en cultivos vegetales, con proteínas de la clase de toxina de la proteína TIC3668 también se revelan en esta aplicación. Dichos métodos pueden comprender el crecimiento de una planta con una cantidad inhibidora de insectos, coleópteros o lepidópteros de una proteína de la clase de toxina de la proteína TIC3668. En

ciertas presentaciones, tales métodos también pueden comprender uno a varios de los siguientes métodos: (i) la aplicación de cualquier composición que comprende o codifica una proteína de la clase de toxina de proteína tipo TIC3668 a una planta o semilla que produce una planta; y (ii) la transformación de una planta o célula vegetal que produce una planta con un polinucleótido que codifica una proteína de la clase de toxina de proteína TIC3668. Por lo general, se contempla que cualquier proteína de la clase de toxina de proteína tipo TIC3668 puede proporcionarse en una composición, dispuesta en un microorganismo o en una planta transgénica para otorgar una actividad inhibitoria de insectos contra lepidópteros o coleópteros.

En ciertas presentaciones, un polipéptido recombinante de la clase de toxina de la proteína TIC3668 es el ingrediente insecticidamente activo de una composición inhibitoria de insectos preparada por *Bacillus* recombinante de cultivo u otra célula bacteriana recombinante transformada para expresar una proteína toxina tipo TIC3668 en condiciones adecuadas para expresar y producir proteínas de la clase de toxina de proteína tipo TIC3668. Dicha composición puede prepararse mediante la desecación, liofilización, homogeneización, extracción, filtración, centrifugación, sedimentación o concentración de un cultivo de dichas células recombinantes que

expresan/producen el polipéptido recombinante mencionado anteriormente. Dicho proceso puede resultar en un *Bacillus* u otro extracto de célula bacteriana entomopatógena, suspensión celular, homogenato de células, lisado celular, sobrenadante de células, filtrado de célula o sedimento celular. Mediante la obtención de los polipéptidos recombinantes producidos de ese modo, una composición que incluye los polipéptidos recombinantes puede incluir células bacterianas, esporas bacterianas y cuerpos de inclusión parasporales, y pueden formularse para diversos usos, tanto como los productos vaporizadores inhibidores de insectos agrícolas o las formulaciones inhibidoras de insectos en bioensayos con dietas. En una presentación, para disminuir la probabilidad de desarrollo de resistencia, una composición inhibidora de insectos que comprende una o más proteínas de la clase de toxina de la proteína TIC3668 además puede incluir al menos un polipéptido adicional que exhibe la actividad inhibidora de insectos contra las especies lepidópteras y coleópteras, pero que difiere de la toxina de proteína tipo TIC3668. Los polipéptidos adicionales potenciales para dicha composición incluyen una proteína inhibidora de insectos y una molécula ARNs inhibidora de insectos. Un ejemplo del uso de dichas secuencias ribonucleótidas para controlar las plagas de insectos se describe en Baum, et al. (Publicación de Patente

de EE.UU. 2006/0021087 A1). Dicho polipéptido adicional para el control de plagas de lepidópteros puede seleccionarse de un grupo que consiste en una proteína inhibidora de insectos, tal como, pero sin limitarse a, Cry1A (Patente de EE.UU. N.º 5.880.275), Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1A.105, Cry1Ae, Cry1B (Publicación de Patente de EE.UU. N.º 10/525,318), Cry1C (Patente de EE.UU. N.º 6.033.874), Cry1D, Cry1Da y sus variantes, quimeras de Cry1E, Cry1F, y Cry1A/F (Patentes de EE.UU. N.º 7.070.982; 6.962.705; y 6.713.063), quimeras tipo Cry1G, Cry1H, Cry1I, Cry1J, Cry1K, Cry1L, Cry1 tales como, pero sin limitarse a, TIC836, TIC860, TIC867, TIC869 y TIC1100, Cry2A, Cry2Ab (Patente de EE.UU. N.º 7.064.249), Cry2Ae, Cry4B, Cry6, Cry7, Cry8, Cry9, Cry15, Cry43A, Cry43B, Cry51Aa1, ET66, TIC400, TIC400, TIC800, TIC834, TIC1415, Vip3A, VIP3Ab, VIP3B, AXMI-184, AXMI-196, DIG-3, DIG-4, DIG-5, DIG-11, AfIP-1A y los derivados del mismo (Publicación de Patente de EE.UU. 2014-0033361 A1), AfIP-1B y los derivados del mismo (Publicación de Patente de EE.UU. 2014-0033361 A1), PIP-1A/PIP-1B (Publicación de Patente de EE.UU. 2014-0007292 A1), PSEEN3174 (Publicación de Patente de EE.UU. 2014-0007292 A1), AECFG-592740 (Publicación de Patente de EE.UU. 2014-0007292 A1), Pput_1063 (Publicación de Patente de EE.UU. 2014-0007292 A1), Pput_1064 (Publicación de Patente de EE.UU. 2014-0007292 A1), GS-135 y los derivados del mismo (Publicación de Patente de EE.UU. 2012-

0233726 A1), GS153 y los derivados del mismo (Publicación de Patente de EE.UU. 2012-0192310 A1), GS154 y los derivados del mismo (Publicación de Patente de EE.UU. 2012-0192310 A1), GS155 y los derivados del mismo (Publicación de Patente de EE.UU. 2012-0192310 A1), SEC ID N.º: 2 y los derivados del mismo tal como se describe en la Publicación de Patente de EE.UU. 2012-0167259 A1, SEC ID N.º:2 y los derivados del mismo tal como se describe en la Publicación de Patente de EE.UU. 2012-0047606 A1, SEC ID N.º: 2 y los derivados del mismo, tal como se describe en la Publicación de Patente de EE.UU. 2011-0154536 A1, SEC ID N.º: 2 y los derivados del mismo tal como se describe en la Publicación de Patente de EE.UU. 2011-0112013 A1, SEC ID N.º: 2 y 4 y los derivados del mismo, tal como se describe en la Publicación de Patente de EE.UU. 2010-0192256 A1, SEC ID N.º:2 y los derivados del mismo, tal como se describe en la Publicación de Patente de EE.UU. 2010-0077507 A1, SEC ID N.º: 2 y los derivados del mismo, tal como se describe en la Publicación de Patente de EE.UU. 2010-0077508 A1, SEC ID N.º: 2 y los derivados del mismo, tal como se describe en la Publicación de Patente de EE.UU. 2009-0313721 A1, SEC ID N.º: 2 o 4 y los derivados del mismo, tal como se describe en la Publicación de Patente de EE.UU. 2010-0269221 A1, SEC ID N.º: 2 y los derivados del mismo, tal como se describe en la Patente de EE.UU. N.º 7,772,465 (B2), CF161_0085 y los derivados del

mismo, tal como se describe en la W02014/008054 A2, proteínas tóxicas lepidópteras y los derivados de la misma tal como se describe en las Publicaciones de Patentes de EE.UU. US2008-0172762 A1, US2011-0055968 A1, y US2012-0117690 A1; SEC ID N.º: 2 y los derivados del mismo, tal como se describe en US7510878(B2), SEC ID N.º: 2 y los derivados del mismo, tal como se describe en la Patente de EE.UU. N.º 7812129(B1); y otras proteínas inhibidoras de lepidópteros conocidas por aquellos expertos en la técnica. Dicho polipéptido adicional para el control de plagas coleópteras puede ser seleccionado de un grupo que consiste en una proteína inhibidora de insectos, tal como, pero sin limitarse a, Cry3Bb (Patente de EE.UU. N.º 6.501.009), variantes de Cry1C, variantes de Cry3A, Cry3, Cry3B, Cry34/35, 5307, Axmi184, Axmi205, AxmiR1, TIC407, TIC417, TIC431, TIC807, TIC853, TIC901, TIC1201, TIC3131, DIG-10, eHIPS (Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. N.º2010/0017914) y otras proteínas inhibidoras de coleópteros conocidas por aquellos expertos en la técnica.

En algunas presentaciones, dicha composición/formulación también puede comprender al menos un polipéptido adicional que exhibe la actividad inhibitoria del insecto a un insecto que no es inhibido por otra proteína inhibitoria de insectos de esta invención para expandir el espectro de la inhibición del insecto obtenida. Por ejemplo, para el control de plagas

hemípteras, se puede utilizar combinaciones de proteínas inhibidoras de insectos de la presente invención con proteínas activas contra hemípteras tales como TIC1415 (Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. N.º: 2013/0097735), TIC807
5 (Patente de EE.UU. N.º: 8609936), TIC834 (Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. N.º: 2013/0269060) y otras proteínas activas contra hemípteras conocidas por aquellos expertos en la técnica. Se pueden encontrar polipéptidos adicionales para el control de plagas de insectos coleópteros,
10 lepidópteros y hemípteros en el sitio web de nomenclatura de toxina del *Bacillus thuringiensis* mantenido por Neil Crickmore (en el sitio web global en btnomenclature.info).

La posibilidad de los insectos de desarrollar resistencia a ciertos insecticidas se ha documentado en la técnica. Una
15 estrategia de gestión de resistencia del insecto implica utilizar cultivos transgénicos que expresan dos agentes inhibidores de insectos diferentes, los cuales operan a través de modos de acción distintos. Por lo tanto, cualquier insecto con resistencia a uno de los agentes inhibidores de insectos
20 puede ser controlado por el otro agente inhibidor de insectos. Otra estrategia de gestión de resistencia del insecto hace uso de plantas que no son protegidas contra la especie de plaga coleóptera o lepidóptera centrada en brindar un refugio para dichas plantas sin protección. La Patente de EE.UU. N.º

6.551.962 describe un ejemplo particular, el cual se incorpora por referencia en su totalidad.

Otras presentaciones tales como química plaguicida aplicada tópicamente, que se diseñan para controlar plagas que también se controlan por las proteínas divulgadas en este documento para ser utilizadas con proteínas en tratamientos de semillas, pulverización, goteo o limpiado en formulaciones, pueden aplicarse directamente a la tierra (empapando el suelo), aplicado a plantas en crecimiento que expresan las proteínas reveladas en el presente, o formuladas para ser aplicadas a semillas que contienen uno o más transgenes que codifican una o varias de las proteínas reveladas. Dichas formulaciones a utilizar en tratamientos de semillas pueden aplicarse con distintos adhesivos y agentes adherentes conocidos en la técnica. Dichas formulaciones pueden contener plaguicidas que son sinérgicos en su mecanismo de acción con las proteínas reveladas, de modo que el plaguicida de la formulación actúe a través de un mecanismo de acción diferente para controlar las mismas plagas o plagas similares que pueden ser controladas por las proteínas reveladas, o que dichos plaguicidas actúen para controlar plagas dentro de una variedad de huéspedes más amplia o especies de plagas de plantas que no son controladas por la clase de toxina de la proteína TIC3668 de manera eficaz. La composición/formulación mencionada anteriormente también

puede comprender un portador aceptable agriculturalmente, tal como un cebo, un polvo, polvo, sedimento, gránulo, pulverizador, emulsión, una suspensión coloidal, una solución acuosa, una preparación de esporas/cristales *Bacillus*, un
5 tratamiento de semillas, un tejido/semilla/planta célula vegetal/planta recombinante transformada para expresar una o más proteínas, o una bacteria transformada para expresar una o más proteínas. Según el nivel de inhibición insecticida o inhibidor para insectos inherente en el polipéptido
10 recombinante y el nivel de formulación a aplicar a un ensayo en plantas o alimentación, la composición/formulación puede incluir varias cantidades por peso de los polipéptidos recombinantes, p. ej., desde 0,0001% a 0,001% a 0,01% a 1% a 99% por peso del polipéptido recombinante.

15

EJEMPLOS

Teniendo en cuenta lo anterior, aquellos expertos en la técnica deben comprender que se pueden realizar cambios a los aspectos
20 específicos que se divulgan y aún así obtener un resultado igual o similar sin alejarse del espíritu y alcance de la invención. Por lo tanto, los detalles estructurales y funcionales específicos revelados en el presente no deben interpretarse como limitativos. Se debe comprender que la

divulgación en su totalidad de cada referencia citada aquí se incorpora dentro de la divulgación de esta solicitud.

EJEMPLO 1

5

Descubrimiento de la clase de toxina de proteína relacionada con TIC3668.

Se identificaron cepas bacterianas que presentan atributos
10 distintivos, *p. ej.*, toxicidad deducida, diversidad proteómica
y variaciones morfológicas al compararlas entre sí, las cuales
fueron preparadas para la secuencia de genomas utilizando
métodos reconocidos en la técnica. Se descubrió una proteína
TIC 3668 (SEC ID N.º: 2) que presenta actividad inhibidora
15 contra insectos coleópteros en bioensayos *in vitro* en una cepa
EG5552 *Brevibacillus laterosporus* (*B. laterosporus*). También
se descubrió que otras cepas contienen proteínas que se
asemejan a TIC 3668. Se clonaron los segmentos de
polinucleótidos que codifican estas proteínas, y se insertaron
20 en una cepa huésped recombinante para probar su expresión.

Se diseñaron cebadores de amplificación térmica para ampliar
una copia de extensión completa del gen del ADN genómico total
de diferentes cepas bacterianas *B. laterosporus*, incluyendo
EG5552. Se generaron productos de amplificación térmica

individuales (amplicones) de cada cepa, y éstos fueron analizados para detectar la presencia de marcos de lectura abiertos que podían codificar proteínas relacionadas a TIC 3668. Se determinó que cada amplicón tenía un marco de lectura
5 abierto, con un codón de inicio de la traducción, seguido en un marco por un marco de lectura abierto contiguo que terminaba en un codón de terminación de la traducción. Las secuencias de aminoácidos deducidas que se obtienen de dichas cepas bacterianas diferentes adicionales se desarrollan
10 respectivamente en SEC ID N.º: 2 (TIC3668), SEC ID N.º:4 (TIC3669), SEC ID N.º:6 (TIC3670), SEC ID N.º:8 (TIC4076), SEC ID N.º:10 (TIC4078), SEC ID N.º:14 (TIC4346), SEC ID N.º:16 (TIC4826), SEC ID N.º:18 (TIC4861), SEC ID N.º:20 (TIC4862), SEC ID N.º:22 (TIC4863). Dichos amplicones fueron clonados en un
15 vector de expresión plásmido de *Bacillus thuringiensis* (Bt) posterior al promotor de expresión específica de esporulación y fueron transformados en una célula huésped Bt acristalífera. Los amplicones también se clonaron en un sistema de expresión de *E. coli*. Se detectó que las cepas recombinantes resultantes
20 expresaban una proteína recombinante.

EJEMPLO 2

Actividad de coleópteros frente a la clase de toxina de la

proteína relacionada a TIC3668

Este Ejemplo ilustra la actividad inhibidora contra coleópteros de las pseudo proteínas TIC3668.

5 Se presentaron las preparaciones de proteína producidas en base a bacterias recombinantes tal como se describe en el Ejemplo 1, para las proteínas de extensión completa de TIC3668, TIC3669, TIC3670, TIC4260, TIC4076 y TIC2462 para los bioensayos de recubrimiento de insectos contra el Escarabajo
10 de la Patata (*Leptinotarsa decemlineata*, CPB) y contra al menos una especie de gusano de la raíz del maíz. Entre los miembros conocidos de la especie de gusano de la raíz del maíz se encuentran *Diabrotica virgifera virgifera* (Gusano de la raíz del maíz del oeste, WCR), *Diabrotica barberi* (Gusano de la raíz
15 del maíz del norte, NCR), *Diabrotica virgifera zea* (Gusano de la raíz del maíz mexicano, MCR), *Diabrotica balteata* (Gusano de la raíz del maíz brasileño (BZR), *Diabrotica undecimpunctata howardii* (Gusano de la raíz del maíz del sur, SCR) y un complejo del gusano de la raíz del maíz brasileño (BCR), que consiste
20 en *Diabrotica viridula* y *Diabrotica speciosa*).

Tal como se muestra en la Tabla 6, estos resultados muestran que las TIC3668, TIC3669, TIC3670, TIC4260, y TIC4076 presentaron mortalidad contra el gusano de la raíz del maíz. TIC2462 (SEC ID N.º:62 que codifica SEC ID N.º:63), una

proteína muy relacionada con la proteína AXMI-209 (en comparación con TIC2462, >99% idénticas en el nivel de aminoácidos, y sólo presenta dos diferencias en los aminoácidos), no exhibieron mortalidad contra el gusano de la
5 raíz del maíz, diferenciando de este modo la actividad de la clase de toxina de la proteína pseudo TIC3668 de las proteínas similares a AXMI-209. Sorpresivamente, no se observó mortalidad contra el Escarabajo de la Patata, una especie generalmente evaluada en bioensayos como indicador de la
10 actividad coleóptera, en ninguna de las proteínas examinadas.

Tabla 6. Mortalidad observada en proteínas ejemplares contra plagas de insectos lepidópteros.

Toxina	Gusano de la raíz del maíz	CPB
TIC2462	-	-
TIC3668, TIC3669,	+	-
TIC4260, TIC4076	+	-
TIC4078	NT	-
TIC4346	+	+
TIC4826, TIC4861, TIC4862, TIC4863	NT	NT

+ = Mortalidad observada

5 - = Mortalidad no observada

NT = No evaluado

EJEMPLO 3

Forma madura de la proteína toxina TIC 3668

10

Este ejemplo ilustra la presencia de un péptido de tránsito de membrana en la amino-terminal de las proteínas nativas dentro de la clase de toxina de la proteína TIC3668 y el descubrimiento de proteínas de toxina maduras activas de la clase de toxina de la proteína TIC3668.

15

El análisis bioinformático usando un programa SignalP (Petersen, et al (2011), *Nature Methods*, 8:785-786) de la traducción de la secuencia de aminoácidos TIC3668 de la

secuencia de codificación (SEC ID N.º:1) predijo la presencia de un segmento transitorio de membrana correspondiente a los primeros 23 aminoácidos N-terminales.

Los experimentos se diseñaron para confirmar la presencia de
5 un segmento transitorio de la membrana dentro de cada miembro de la clase similar de toxina proteica TIC3668. La TIC3668 se clonó en una célula huésped *Bt* detrás de un promotor no específico *Bt* de esporulación. Los sobrenadantes del cultivo resultante se pusieron a prueba para determinar la actividad
10 del insecticida. Se recuperaron tres formas de proteína correspondientes con TIC3668 de una mezcla del sobrenadante. Estos fragmentos diferentes de menos que la longitud completa de la proteína TIC3668 se determinaron después por espectrometría de masas y análisis de la secuencia N-terminal
15 para contener en sus respectivos aminos terminales, en cualquiera de los aminoácidos 16, 19 o 24, como se expone en SEC ID N.º: 2. Sólo se detectó una cantidad pequeña de estas tres formas truncadas de TIC3668 en los medios de cultivo. La forma más abundante de la proteína detectada, tiene el serín
20 en la posición 24 en su amino terminal, de acuerdo a lo establecido en SEC ID N.º:2. La proteína concentrada y purificada del sobrenadante de cultivo exhibió bioactividad contra WCR cuando se probó en una dieta artificial durante un bioensayo.

Se crearon diferentes construcciones de expresión para identificar los segmentos de péptidos más pequeños para cada proteína tipo TIC3668 que exhibiera actividad insecticida. Estas construcciones se introdujeron en una cepa acristalífera de *B. thuringiensis* o en una cepa de *E. coli*. Una construcción se diseñó para la expresión de la proteína de longitud completa TIC3668, como se expone en SEC ID N.º: 2 desde el aminoácido 1 hasta el 317, en una cepa de acristalíferos *Bt*. Las construcciones se diseñaron para la expresión de la proteína de longitud completa TIC3668 y para formas diversas de variantes más cortas de la proteína TIC3668, en un sistema de expresión de *E. coli* que tiene una secuencia carboxi terminal de etiqueta HIS (HHHHAHHH). Las construcciones diseñadas para la expresión en *E. coli* consistieron en: (1) una construcción diseñada para expresar la proteína de longitud completa TIC3668 como se expone en SEC ID N.º: 2 desde la posición del aminoácido 1 a través de 317; (2) una construcción diseñada para expresar una proteína variante TIC3668 que tenía aminoácidos del 16 al 317 como se expone en SEC ID N.º: 2; (3) una construcción diseñada para expresar una proteína variante TIC3668 desde el aminoácido 24 al 317 como se expone en SEC ID N.º: 2; (4) una construcción diseñada para expresar una proteína variante TIC3668 desde el aminoácido 26 al aminoácido 317 como se expone SEC ID N.º: 2; (5) una construcción diseñada para expresar

TIC3668 variante de la proteína desde el aminoácido 28 al 317 como se expone en SEC ID N.º: 2. Además, una proteína TIC3668 con un N-terminal, con etiqueta-10 y un TVMV (virus moteado vena tabaco) con sitio de proteasa (MHHHHHHHHHGTETVRFQ), se
5 obtuvo a partir de un sistema de expresión de *E. coli* para producir una proteína TIC3668 con un comienzo en el residuo n.º 24 como se expone en SEC ID N.º: 2.

La proteína se obtuvo a partir del sobrenadante del sistema de expresión del *Bt* y se sometió a una espectrometría de masa y
10 análisis de la secuencia N-terminal. El sistema de expresión *Bt* produjo la toxina madura predicha TIC3668 a partir de ácido 24 a 317 como se expone en SEC ID N.º:2. La proteína no se observó en los sobrenadantes de *E. coli*. La proteína se obtuvo a partir de cada una de las respectivas construcciones de
15 expresión de *E. coli* mediante choque osmótico para liberar las proteínas del periplasma. Las proteínas producidas a partir de las construcciones que fueron diseñadas para contener aminoácidos 16 o 24 en el extremo amino de la proteína de aquellas que no poseen longitud total, se confirmó que
20 contenían estos aminoácidos en su respectivos extremos amino. La proteína producida a partir de la construcción diseñada para expresar la TIC3668 de longitud completa produce la proteína de longitud madura, que contiene la serina en la posición 24 como se expone en SEC ID N.º: 2 en el extremo amino. Las

proteínas producidas a partir de las construcciones diseñadas para contener al aminoácido 26 o al aminoácido 28 como se expone en SEC ID N.º: 2 como aminoácido N-terminal, cada uno sólo contuvo, sorprendentemente, al aminoácido 28 como aminoácido N-terminal, lo que sugiere que el procesamiento que mantiene al aminoácido número 24, como se expone en SEC ID N.º: 2 en el extremo N-terminal, podría ser importante para la estabilidad de la toxina.

Las muestras de proteínas obtenidas de estos análisis de sistema de expresión se presentaron para las pruebas contra las larvas del gusano de la raíz del maíz del oeste en bioensayos de insectos con dieta de superposición, como se describe en el Ejemplo 2. Ciertos truncamientos N-terminales de este estudio determinaron que exhibían bioactividad disminuida. Específicamente, se observó que la actividad insecticida se redujo significativamente cuando el aminoácido amino terminal fue el 26 o el 28, como se expone en SEC ID N.º: 2. Se puede extrapolar que otros miembros de la familia de proteínas TIC3668 que poseen N-terminal truncado para ser más cortos que la proteína madura (empezando en el residuo del aminoácido n.º 24 para TIC3668, TIC3669, TIC3670, TIC4076, TIC4078, TIC4260, TIC4346, TIC4826 y TIC4863; empezando en el aminoácido 13 para TIC4861 y comenzando en el aminoácido 22 para TIC4862), son las versiones más cortas de las proteínas de tipo

TIC3668 probado que muestran actividad insecticida contra WCR. Todas las variantes de TIC3668 de igual longitud o más largas que la proteína madura mostraron una alta actividad contra WCR, incluso a concentraciones relativamente bajas. Los datos
5 también demuestran que el procesamiento de la TIC3668 por parte de la *E. coli* varía según el diseño de construcción.

EJEMPLO 4

10 Síntesis de genes que codifican proteínas de tipo TIC3668 para su expresión en plantas

Se diseñaron las secuencias de nucleótidos que codifican las versiones de longitud completa y maduras de una proteína
15 TIC3668, una proteína TIC3669, una TIC3670, una TIC4076, TIC4078, una proteína TIC4260, una proteína TIC4346, una proteína TIC4826, una proteína TIC4861, una proteína TIC4862 y una proteína TIC4863. Las secuencias de nucleótidos que codifican TIC3668, TIC3669 y TIC3670 se sintetizaron según los
20 métodos descritos generalmente en la patente EE.UU. 5.500.365, evitando cierto problema desfavorable de secuencias tales como ATTTA y ricas en A/T, secuencias de poliadenilación de plantas preservando al mismo tiempo la secuencia de aminoácidos de la proteína nativa *B. laterosperous*. Estas secuencias de

nucleótidos se proporcionan en el presente documento como SEC ID N.º: 32, SEC ID N.º:34, SEC ID N.º:36, SEC ID N.º:38 SEC ID N.º:40, SEC ID N.º:42, SEC ID N.º:44, SEC ID N.º:46, SEC ID N.º:48, SEC ID N.º:50 y SEC ID N.º:51 para las secuencias de longitud completa y SEC ID N.º: 33, SEC ID N.º: 35, SEC ID N.º:37, SEC ID N.º: 39, SEC ID N.º:41, SEC ID N.º:43, SEC ID N.º:45, SEC ID N.º:47 y SEC ID N.º:49 para las secuencias maduras.

EJEMPLO 5

10

Casetes de expresión para la expresión de proteínas de tipo TIC3668 en plantas

Una variedad de casetes de expresión de plantas se diseñaron con las secuencias como se establece en SEC ID N.º: 32, SEC ID N.º:33, SEC ID N.º:34, SEC ID N.º:35, SEC ID N.º:36, SEC ID N.º:37, SEC ID N.º:38, SEC ID N.º:39, SEC ID N.º:40, SEC ID N.º:41, SEC ID N.º:42, SEC ID N.º:43, SEC ID N.º:44, SEC ID N.º:45, SEC ID N.º:46, SEC ID N.º:47, SEC ID N.º: 48, SEC ID N.º:49, SEC ID N.º:50 y SEC ID N.º:51. Tales casetes de expresión son útiles para la expresión transitoria en protoplastos o para la transformación de células vegetales. Se diseñaron casetes de expresión típicos con respecto a la eventual colocación de la proteína dentro de la célula. Un conjunto de casetes de expresión se diseñó para

permitir que la proteína se traduzca con el segmento N-terminal nativo. Otro conjunto de casetes de expresión se diseñó para permitir la expresión de la proteína sin el segmento N-terminal (*es decir*, la proteína de longitud madura). Otro conjunto de

5 casetes de expresión se diseñó para tener un péptido de tránsito expresado dentro del marco y unido operativamente a la proteína tóxica de longitud madura, para utilizar como blanco a una organela de la célula tal como el cloroplasto o el plástido. Todos los casetes de expresión se diseñaron para

10 comenzar en el extremo 5' con un promotor que puede componerse de elementos promotores múltiples enlazados contiguamente, elementos potenciadores u otros elementos de expresión conocidos por los expertos en la técnica para aumentar la expresión del transgén. La secuencia del promotor se siguió

15 generalmente de forma contigua con una o más secuencias líderes de extremo 3' al promotor. Una secuencia de intrón se proporcionó al extremo 3' de la secuencia líder para mejorar la expresión del transgén. Una secuencia de codificación para la toxina o el péptido de tránsito y la secuencia que codifica

20 la toxina se encuentra en el extremo 3' de la configuración promotor, líder y el intrón. Una secuencia 3'UTR se proporcionó al extremo 3' de la secuencia de codificación para facilitar la terminación de la transcripción y brindar secuencias importantes para la poliadenilación del transcrito

resultante. Todos los elementos descritos anteriormente fueron dispuestos de forma contigua con la secuencia frecuente adicional proporcionada para la construcción del casete de expresión tal como los sitios de endonucleasas de restricción o los sitios de clonación de ligaduras independientes.

EJEMPLO 6

Vectores de transformación que contienen el casete de expresión de proteínas tipo TIC3668

Los vectores de transformación mediada de *Agrobacterium* se construyeron para entregar ADN al genoma de la planta que expresa las proteínas TIC3668, mTIC3668, TIC3669, mTIC3669, TIC3670 y mTIC3670. Los casetes de expresión se clonaron en vectores adecuados entre las secuencias límites del *Agrobacterium* de tal manera que se transferirán al genoma de una célula huésped vegetal mediante *Agrobacterium* huéspedes que contienen las construcciones de los vectores junto con un gen marcador seleccionable. Más específicamente, se clonó el fragmento de restricción que contiene todo el casete que codifica la expresión citosólica de una de las proteínas mencionadas anteriormente en una planta vector de transformación de *Agrobacterium*. De manera similar, se clonó

el fragmento de restricción que contiene el objetivo del casete de expresión de todo el plástido en una planta vector de transformación de *Agrobacterium*. Los vectores que contienen los casetes de expresión de la proteína tipo TIC3668 (*p. ej.*,
 5 casete sin objetivo o casetes específicos) se introducen en *Agrobacterium* mediante electroporación o apareamiento de tres padres.

Los casetes de expresión que contienen genes artificiales que codifican las TIC4076, TIC4078, TIC4260, TIC4346, TIC4826,
 10 TIC4861, TIC4862 y TIC4863, cada uno con y sin secuencias que codifican los aminoácidos N terminal 23 presentes en el marco de lectura abierto nativo de *B. laterosperous* (aminoácidos 1 a 23 como se indica en SEC ID N.º:2), se clonan en vectores adecuados entre el entre las secuencias límites del
 15 *Agrobacterium* para que se transfieran al genoma de una célula huésped y se verifique para la expresión y bioactividad de la proteína codificada.

EJEMPLO 7

20

La actividad de las proteínas de tipo TIC3668 de los coleópteros en plantas

Este ejemplo ilustra la actividad inhibidora que muestran las

proteínas pseudo TIC3668 contra los coleópteros, tales como larvas de gusano de la raíz del maíz, cuando se expresa en plantas y proporciona como dieta a esta plaga de insectos.

Las plantas de maíz transgénicas R0 que expresan las proteínas
5 TIC3668, mTIC3668, TIC3669, mTIC3669, TIC3670 y mTIC3670 se produjeron usando vectores que contienen los casetes de expresión descritos en el Ejemplo 5.

Se cultivaron plantas de maíz transgénicas F1 a partir de semilla producida por la polinización de gazas de plantas no
10 transformadas del tipo salvaje de plantas de germoplasma comercial con polen de transformantes R0. Después de transferirse al suelo en macetas, las plantas F1 se infestaron de insectos de gusanos de la raíz del maíz neonatos y se cultivaron durante 13 días bajo condiciones controladas. La
15 clasificación del daño de la raíz (RDR, por sus siglas en inglés) se determinó utilizando la escala de valoración de Oleson de 0 a 3, *et al.* en la que 0 significa que no hay lesiones y 3 significa que se podaron tres o más nodos a menos de 1,5 pulgadas del tallo (J.D. Oleson, Y-L. Park, T.M.
20 Nowatzki, J.J. Tollefson, "Node-Injury Scale to Evaluate Root Injury by Corn Rootworms", *Journal of Economic Entomology*, 98(1):1-8, 2005). Se evaluó la mortalidad de los insectos contando el número de larvas restantes del tercer estadio al final del período de crecimiento.

En una primera serie de experimentos, las plantas que expresan las proteínas TIC3668, TIC3669 y TIC3670 de cadena completa se probaron contra WCR. Algunos de los eventos mostraron una reducción estadística significativa respecto de la lesión de
5 nodos en comparación con el control negativo con un promedio de daño de la raíz (RDR) de un valor entre 2 y 2,5; pero no se observó actividad comercialmente significativa para las proteínas de longitud completa.

En una segunda serie de experimentos, las proteínas maduras
10 mTIC3668 (SEC ID N.º: 23), mTIC3669 (SEC ID N.º: 24) y mTIC3670 (SEC ID N.º: 25), con o sin un cloroplasto dirigido hacia un péptido, se expresaron en plantas de maíz y se verificaron contra WCR. Se observó una mortalidad significativa del WCR en cada proteína madura. Cada planta que expresa mTIC3668,
15 mTIC3669 y mTIC3670 en presencia y ausencia de secuencias de direccionamiento adicionales, mostró una reducción estadística significativa de la lesión de los nodos en comparación con el control negativo. La Figura 2 representa los valores promedio de RDR en varios eventos para las proteínas mTIC3668 y mTIC3669
20 y la Figura 3 representa el valor medio de RDR durante varios eventos para mTIC3670 cuando se expresa en plantas de maíz F1, independientemente de si la proteína se dirige al cloroplasto o no. "TS" en el nombre del evento de las figuras 2 y 3 indica la presencia de una secuencia objetivo. Se observó una

actividad significativa comercialmente para muchos de estos eventos que expresan proteínas maduras mTIC3668, mTIC3669 y mTIC3670.

De manera inesperada, la eliminación del segmento de membrana en tránsito (aminoácidos 1 a 23 como se expone en SEC ID N.º:2) a partir de las pseudo proteínas TIC3668 aumentó la eficacia contra el gusano de la raíz del maíz cuando se expresa en plantas de maíz. La longitud madura de las pseudo proteínas TIC3668, cuando se expresan en plantas, demostró un nivel más alto de actividad insecticida contra la infestación de coleópteros que las proteínas de longitud completa.

EJEMPLO 8

La actividad insecticida de las proteínas relacionadas con TIC3668, expresada en maíz, contra Cry3Bb1 y resistente WCR

Este Ejemplo ilustra la actividad insecticida exhibida por las pseudo proteínas TIC3668 contra una cepa de gusano de la raíz del maíz del oeste (WCR) que ha desarrollado resistencia a la toxina *Bt* Cry3Bb1. Las plantas de maíz transgénicas F1 que expresan mTIC3668, mTIC3669 o mTIC3670, producidas utilizando los métodos que se describen en el Ejemplo 7, se infestaron con 2000 huevos de WCR de la cepa Hopkinton por planta.

La cepa Hopkinton del gusano de la raíz del maíz del oeste (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte) es una cepa no diapausable con resistencia de campo evolucionado para Cry3Bb1 expresada en plantas de maíz. La cepa se originó a partir de

5 muestras adultas del WCR obtenidas de los campos que habían sido plantados con maíz Cry3Bb1 durante siete años consecutivos. La población se cruzó con una cepa no diapausada de WCR tres veces y se seleccionó por su resistencia a Cry3Bb1 tres veces (Gassmann, et al. (2011) PLoS ONE 6(7): e22629;

10 Gassmann, et al. (2012) GM Crops Food 3(3): 235-244). La colonia se obtuvo del laboratorio del Dr. Aaron Gassmann en la Universidad Estatal de Iowa (Iowa State University) y la posee el grupo Monsanto Biotech Entomology en Chesterfield, Missouri. Después de la infestación, los huevos de WCR de la cepa

15 Hopkinton eclosionaron en un lapso de 48 horas y los gusanos neonatos comenzaron a alimentarse de las raíces. Después de 24 días, las raíces se retiraron del suelo y se evaluaron los daños en la raíz del maíz utilizando la escala de 0-3, como se describe en el Ejemplo 7. Como se muestra en la Tabla 7, las

20 plantas que expresaron las mTIC3668, mTIC3669 y mTIC3670 fueron altamente eficaces en la protección de las raíces del maíz en presencia de los WCR neonatos de la cepa Hopkinton en comparación con las plantas de control, superando así la resistencia del WCR a la toxina Cry3Bb1.

Tabla 7. RDR promedio en plantas de maíz transgénicas infestadas con Cry3Bb1 resistente al WCR

Toxina	N	RDR promedio (0-3)	Error estándar
mTIC3668	18	0.06	0.004
mTIC3669	15	0.05	1.82e-10
mTIC3670	14	0.05	1.95e-10
Control negativo	6	2.14	0.24

5 N: número de plantas evaluadas

EJEMPLO 9

Actividad insecticida de las proteínas relacionadas con TIC3668, expresada en maíz, contra la infestación natural de WCR en sitios de prueba de campo

10

Este ejemplo ilustra la reducción del daño en las raíces exhibida en las plantas transgénicas de maíz que expresan pseudo proteínas TIC3668 contra infestaciones naturales de WCR en las granjas agrícolas del medio oeste de Estados Unidos.

15

Las plantas de maíz transgénicas F1 que expresan mTIC3668, mTIC3669 o mTIC3670, producidas utilizando los métodos que se describen en el Ejemplo 7, se plantaron en cinco lugares en

medio oeste de los Estados Unidos desde finales de abril a principios de mayo. Los ensayos realizados en estos lugares se basaron en la presión por las infestaciones naturales existentes de gusanos de la raíz del maíz. A finales de julio
 5 se completó la excavación de raíces para la evaluación de daños. Los daños ocasionados por el gusano de la raíz se determinaron de acuerdo a la escala de lesión en el nodo, como se describe en el Ejemplo 7.

Los resultados de los ensayos de excavación de raíces
 10 indicaron que las plantas que expresan mTIC3668, mTIC3669 y mTIC3670 bajo condiciones prácticas para la agricultura en un campo abierto fueron altamente eficaces en la protección de las raíces del maíz contra el daño en presencia de gusanos de la raíz del maíz natural. La Tabla 8 muestra el número de
 15 plantas evaluadas (N), la media RDR y el error estándar en las plantas de prueba cuando se combinan ubicaciones.

Tabla 8. Promedio de RDR en plantas de maíz transgénicas verificado en granjas con infestaciones naturales de WCR

Toxina	N	Promedio de RDR (0-3)	Error estándar
mTIC3668	755	0.144	0.009
mTIC3669	1108	0.159	0.008

mTIC3670	1311	0.120	0.007
Control negativo	362	1.426	0.047

EJEMPLO 10

actividad de lepidópteros frente a la clase de toxina de la **proteína relacionada con TIC3668**

Este Ejemplo ilustra la actividad inhibidora contra lepidópteros de las pseudo proteínas TIC3668. Preparados de proteína, tal como se describen en el Ejemplo 1, para las proteínas de longitud completa de TIC3668, TIC3669, TIC3670, TIC4076 y TIC4078 se presentaron como dieta de superposición para los siguientes insectos en bioensayos contra el gusano cortador grasiento (BCW, *Agrotis ipsilon*), el gusano cortador occidental del frijol (WBC, *Striacosta albicosta*), el gusano elotero (CEW, *Helicoverpa zea*), el piral del maíz (ECB, *Ostrinia nubilalis*), el barrenador de la caña de azúcar (SCB, *Diatraea saccharalis*), el barrenador del maíz del suroeste (SWC, *Diatraea grandiosella*), el gusano falso medidor (CLW, *Trichoplusia ni*), la soja looper (SBL, *Chrysodeixis includes*) y el gusano cogollero (FAW, *Spodoptera frugiperda*). En la técnica se conocen los protocolos y métodos de preparación y la realización de bioensayos de proteínas inhibidoras.

Se observó actividad frente a ciertas plagas de insectos lepidópteros ante ciertas proteínas del tipo TIC3668 como se demuestra en la Tabla 9.

Tabla 9. Atrofia observada en proteínas ejemplares contra

5 **plagas de insectos lepidópteros.**

Toxina	ECB	SWC	BCW	FAW	CEW	SBL
TIC3668	++	+	NT	-	-	-
TIC3669	+	+	NT	-	-	-
TIC3670	++	++	NT	-	-	+
TIC4076	-	+++	-	-	-	+
TIC4346	+	+	NT	+	+	+
TIC4078	NT	NT	NT	-	-	+
TIC4260, TIC4826	NT	NT	NT	NT	NT	NT

+ = Atrofia observada

++ = Atrofia y mortalidad

10 - = Mortalidad no observada

NT = No evaluado

EJEMPLO 11

15 **La actividad de los lepidópteros con proteínas del tipo TIC3668**

en plantas

Este ejemplo ilustra la actividad inhibidora de las proteínas de tipo TIC3668 con ECB, SWC, BCW, FAW, CEW y SBL cuando se expresan en plantas y se proporcionan como dieta para una determinada plaga de insectos.

Los bioensayos contra plagas de lepidópteros utilizando discos foliares de plantas se realizaron de manera similar a como se describe en la Patente EE.UU. 8.344.207 en TIC3668, TIC3669 y TIC3670 que expresan R0 en las plantas de maíz. A la calificación del daño de la hoja (LDR) se le asignó una puntuación basada en el porcentaje del disco de hoja devorado por el insecto en una escala de porcentaje comido del 0 (0%) a 11 (mayor que 50% comido). La escala de clasificación aumenta gradualmente en un 5%. Plantas R0 que no contienen proteínas insecticidas sirvieron de controles negativos. La expresión citosólica de la proteína de tipo TIC3668 de longitud completa redujo el daño de alimentación del CEW, FAW y SWC con respecto al control no transformado. La expresión citosólica de la proteína TIC3670 redujo el daño por alimentación del SWC con respecto al control no transformado.

EJEMPLO 12

Creación de la proteína TIC4260 Collage

Este Ejemplo enseña la creación de una nueva secuencia genética basada en los miembros de la familia de TIC3668. La variación de aminoácidos de cinco de las proteínas nativas de tipo TIC3668 se combinó para crear una nueva proteína collage, TIC4260 (SEC ID N.º:12), que presenta una diversidad de secuencia de aminoácidos diferentes en comparación con las proteínas de origen natural. La Figura 1 representa la alineación de cinco proteínas de tipo TIC3668 nativas con TIC4260. Las posiciones de la diversidad de secuencias se resaltan en gris en este alineamiento de secuencias. Se construyó una secuencia de polinucleótidos artificiales (SEC ID N.º:11) que codifica a la proteína TIC4260. La proteína madura TIC4260 (mTIC4260, SEC ID N.º:28) se codifica por la secuencia de polinucleótidos como se expone en SEC ID N.º:43.

Se pueden hacer alineaciones similares de otras proteínas de tipo TIC3668 con el fin de crear nuevas proteínas que exhiban actividad tóxica contra lepidópteros y/o coleópteros. Estas nuevas proteínas se expresan, purifican y prueban contra insectos lepidópteros y coleópteros en bioensayos de dieta.

Los casetes de expresión para estas nuevas proteínas se crean y se transforman en plantas para expresar estas proteínas y así controlar las plagas de lepidópteros y coleópteros de las plantas.

Todas las composiciones y métodos descritos y reivindicados

en el presente documento pueden realizarse y ejecutarse sin experimentación excesiva en vista de la presente divulgación. Aunque las composiciones y métodos de esta invención se han descrito en términos de las realizaciones ilustrativas
5 anteriores, será evidente para los expertos en la técnica que las variaciones, cambios, modificaciones y alteraciones puedan ser aplicados a la composición, métodos y a los pasos o en la secuencia de pasos de los métodos aquí descritos, sin apartarse del concepto verdadero, el espíritu y alcance de la invención.
10 Más específicamente, será evidente que ciertos agentes que están tanto química como fisiológicamente relacionados puedan sustituirse por los agentes descritos en este documento, pero se lograrían los mismos resultados o similares. Todas las sustituciones y modificaciones similares evidentes para los
15 expertos en la técnica se consideran dentro del espíritu, alcance y concepto de la invención como se define en las reivindicaciones adjuntas.

Debe ser evidente para los expertos en la técnica que estas variaciones de la secuencia diferentes y mejoradas se pueden
20 combinar para crear variantes que también estén dentro del alcance de esta invención.

Todas las publicaciones y patentes publicadas citadas en la especificación se incorporan aquí como referencias en la misma medida como si cada publicación o solicitud de patente

individual se indicara específica e individualmente para ser incorporada como referencia.