

**PROTEÍNAS PESTICIDAS MODIFICADAS
Y MÉTODOS PARA CONTROLAR LAS PLAGAS DE PLANTAS**

CAMPO DE LA INVENCION

[0001] Esta invención se refiere a proteínas pesticidas modificadas y a las moléculas de ácido nucleico que las codifican, así como también a composiciones y métodos para controlar plagas de plantas.

ANTECEDENTES

[0002] *Bacillus thuringiensis* (Bt) es una bacteria del suelo grampositiva formadora de esporas caracterizada por su capacidad para producir inclusiones cristalinas que son específicamente tóxicas para ciertos órdenes y especies de plagas de plantas, incluidos insectos, pero que son inocuas para plantas y otros organismos no diana. Por esta razón, composiciones que comprenden cepas de *Bacillus thuringiensis* o sus proteínas insecticidas se pueden utilizar como insecticidas medioambientalmente aceptables para controlar plagas de insectos agrícolas o vectores de insectos para varias enfermedades que afectan a seres humanos o animales.

[0003] Las proteínas cristalinas (Cry) de *Bacillus thuringiensis* tienen una actividad insecticida potente principalmente contra insectos de plagas de lepidópteros, dípteros y coleópteros. Estas proteínas también presentan actividad contra plagas de los órdenes de himenópteros, homópteros, ftiráteros, malófagos y órdenes de plagas de ácaros, así como también otros órdenes de invertebrados tales como nematelmintos, platelmintos y sarcomastigóforos (Feitelson, J. 1993. The *Bacillus Thuringiensis* family tree. En *Advanced Engineered Pesticides*. Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y.). Estas proteínas se clasificaron originalmente

como CryI a CryVI basándose principalmente en su actividad insecticida. Las principales clases fueron (I) específicas para lepidópteros, (II) específicas para lepidópteros y dípteros, (III) específicas para coleópteros, (IV) específicas para dípteros y (V) y (VI) específicas para nematodos. Las proteínas se clasificaron además en subfamilias; se asignaron letras divisionales a las proteínas con una relación más estrecha dentro de cada familia, tales como CryIA, CryIB, CryIC, etc. Las proteínas con una relación aún más estrecha dentro de cada división recibieron nombres tales como CryIC(a), CryIC(b), etc.

[0004] Los términos "toxina Cry" y "delta-endotoxina" se han utilizado como sinónimos del término "proteína Cry". La nomenclatura actual de los genes y proteínas Cry se basa en la homología de la secuencia de aminoácidos más que en la especificidad del insecto diana (Crickmore *et al.* (1998) Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62:807-813). En esta clasificación más aceptada, se asigna un único nombre a cada toxina que incorpora una categoría primaria (un número arábigo), una categoría secundaria (una letra mayúscula), una categoría terciaria (una letra minúscula) y una categoría cuaternaria (otro número arábigo). En la clasificación actual, los números romanos han sido reemplazados por números arábigos en la categoría primaria. Por ejemplo, "CryIA(a)" en la nomenclatura antigua es ahora "Cry1Aa" en la nomenclatura actual. Según Ibrahim *et al.* (2010, Bioeng. Bugs, 1:31-50), las toxinas Cry aún se pueden separar en seis clases principales según sus especificidades por los insectos hospedadores, e incluyen: grupo 1-lepidópteros (por ejemplo, Cry1, Cry9 y Cry15); grupo 2-lepidópteros y dípteros (por

ejemplo, Cry2); grupo 3-coleópteros (Cry3, Cry7 y Cry8); grupo 4-dípteros (Cry4, Cry10, Cry11, Cry16, Cry17, Cry19 y Cry20); grupo 5-lepidópteros y coleópteros (Cry1I); y grupo 6-nematodos (Cry6). Las toxinas Cry1I, Cry2, Cry3, Cry10 y Cry11 (73-82 kDa) son únicas debido a que al parecer son truncamientos naturales de las proteínas de mayor tamaño Cry1 y Cry4 (130-140 kDa).

[0005] Las proteínas Cry son moléculas proteicas globulares que se acumulan como protoxinas en forma cristalina durante la etapa de esporulación de *Bt*. Después de ser ingeridos por una plaga, los cristales normalmente se solubilizan para liberar protoxinas, que pueden variar en tamaño, por ejemplo, de 130-140 kDa para muchas de las proteínas Cry activas contra lepidópteros, tales como Cry1 y Cry9, y 60-80 kDa para las proteínas Cry3 activas contra coleópteros y las proteínas Cry2 activas contra lepidópteros/dípteros. Después de que los cristales han sido solubilizados por un insecto susceptible, las protoxinas liberadas son procesadas por proteasas en el intestino del insecto, por ejemplo, tripsina y quimiotripsina, para producir una toxina proteica Cry central resistente a proteasas. Este procesamiento proteolítico implica la eliminación de aminoácidos de diferentes regiones de las diferentes protoxinas Cry. Por ejemplo, las protoxinas Cry de 130-140 kDa se activan normalmente mediante la eliminación proteolítica de un péptido N-terminal de 25-30 aminoácidos y aproximadamente la mitad de la proteína remanente del extremo C da como resultado una toxina Cry madura de aproximadamente 60-70 kDa. Las protoxinas de 60-80 kDa, por ejemplo, Cry2 y Cry3, también son procesadas, aunque en distinto grado que

las protoxinas de mayor tamaño. En las protoxinas más pequeñas normalmente se elimina un número de aminoácidos del extremo N igual o mayor que en las protoxinas de mayor tamaño, pero se eliminan menos aminoácidos del extremo C. Por ejemplo, la activación proteolítica de los miembros de la familia Cry2 implica normalmente la eliminación de aproximadamente 40-50 aminoácidos N-terminales. Muchas de las proteínas Cry son bastante tóxicas para insectos diana específicos, pero muchas de ellas presentan unos espectros de actividad estrechos.

[0006] Las porciones de toxina de las proteínas Cry generalmente tienen cinco dominios de secuencia conservados y tres dominios estructurales conservados (véase, por ejemplo, de Maagd *et al.* (2001) *Trends Genetics* 17:193-199). El primer dominio estructural conservado, denominado Dominio I, consta normalmente de siete hélices alfa y participa en la formación de poros y la inserción en la membrana. El dominio II consta normalmente de tres láminas beta dispuestas en una configuración de clave griega, y el dominio III consta normalmente de dos láminas beta antiparalelas en formación de remolino (*jelly-roll*) (de Maagd *et al.*, 2001, anteriormente). Los dominios II y III participan en el reconocimiento y la unión de receptores y, por lo tanto, se consideran determinantes de la especificidad de la toxina.

[0007] Los cinco bloques de secuencias conservados se numeran de CB1 a CB5 desde el extremo N al extremo C de la proteína Cry (Hofte y Whitely, 1989, *Microbiol. Rev.* 53:242-255). El bloque conservado 1 (CB1) comprende aproximadamente 29 aminoácidos, el bloque conservado 2 (CB2) comprende aproximadamente 67 aminoácidos, el bloque conservado 3 (CB3)

comprende aproximadamente 48 aminoácidos, el bloque conservado 4 (CB4) comprende aproximadamente 10 aminoácidos y el bloque conservado 5 (CB5) comprende aproximadamente 12 aminoácidos. Las secuencias previas y posteriores a estos cinco bloques conservados son sumamente variables y, por lo tanto, se designan como las "regiones variables", V1-V6. El dominio I de una delta-endotoxina *Bt* comprende típicamente una región variable 1, el bloque conservado 1, la región variable 2 y los 52 aminoácidos N-terminales del bloque conservado 2. El dominio II comprende típicamente aproximadamente los 15 aminoácidos C-terminales del bloque conservado 2, la región variable 3 y aproximadamente los 10 aminoácidos N-terminales del bloque conservado 3. El dominio III que comprende típicamente aproximadamente los 38 aminoácidos C-terminales del bloque conservado 3, la región variable 4, el bloque conservado 4, la región variable 5 y el bloque conservado 5. Las toxinas activas contra lepidópteros Cry1, entre otras delta-endotoxinas, tienen una región variable 6 con aproximadamente 1-3 aminoácidos comprendidos en el dominio III.

[0008] Muchas plantas comerciales valiosas, incluidos los cultivos agrícolas comunes, son susceptibles de ser atacadas por plagas de plantas que incluyen plagas de insectos y de nematodos, lo cual provoca unas reducciones sustanciales en el rendimiento y la calidad de los cultivos. Por ejemplo, las plagas de plantas son un factor principal en la pérdida de importantes cultivos agrícolas en el mundo. Aproximadamente 8 billones de \$ se pierden cada año en los Estados Unidos solamente debido a infestaciones de plagas de invertebrados, incluyendo insectos. Las plagas de insectos

también suponen un problema para los cultivadores de hortalizas y frutas, para los productores de flores ornamentales y para los jardineros residenciales.

[0009] Las plagas de insectos se controlan principalmente mediante aplicaciones intensivas de pesticidas químicos, que actúan a través de la inhibición del crecimiento de los insectos, la prevención de la alimentación o reproducción de los insectos, o causan su muerte. También se han aplicado agentes biológicos para el control de plagas, tales como cepas de *Bacillus thuringiensis* que expresan toxinas pesticidas tales como proteínas Cry, a plantas de cultivo con resultados satisfactorios, lo que ofrece una alternativa o un complemento a los pesticidas químicos. Se han aislado los genes que codifican algunas de estas proteínas Cry y se ha demostrado que su expresión en hospedadores heterólogos, tales como plantas transgénicas, proporciona otra herramienta para controlar plagas de insectos importantes desde el punto de vista económico.

[0010] De este modo, se puede conseguir un buen control de insectos, pero el uso continuado de ciertos métodos de control químico y biológico aumenta la probabilidad de que las plagas de insectos desarrollen resistencia a tales medidas de control. Esto se ha paliado parcialmente mediante diversas prácticas de gestión de la resistencia, pero sigue siendo necesario desarrollar agentes de control de plagas nuevos y eficaces. Se necesitan particularmente agentes de control que puedan actuar sobre una gama más amplia de plagas de insectos que son importantes desde el punto de vista económico y/o que controlen eficazmente cepas de insectos que son o que podrían volverse

resistentes a los agentes existentes para el control de insectos.

RESUMEN

[0011] La invención proporciona ácidos nucleicos, polipéptidos, composiciones y métodos para conferir actividad pesticida (por ejemplo, actividad insecticida) a bacterias, plantas, células vegetales, tejidos y semillas. En particular, la invención proporciona proteínas pesticidas quiméricas novedosas (por ejemplo, proteínas insecticidas quiméricas), opcionalmente con una actividad alterada o potenciada en comparación con la molécula progenitora.

[0012] En las realizaciones, las proteínas quiméricas de la invención son tóxicas para plagas de insectos importantes desde un punto de vista económico (por ejemplo, inhibiendo la capacidad de la plaga de insectos de sobrevivir, crecer y/o reproducirse), particularmente plagas de insectos que infestan plantas. Por ejemplo, en las realizaciones, las proteínas insecticidas quiméricas de la invención se pueden utilizar para controlar una o más plagas de lepidópteros importantes desde un punto de vista económico que incluyen, sin carácter limitante, gusano cortador negro (*Agrotis ipsilon*), barrenador del maíz europeo (*Ostrinia nubilalis*), cogollero del maíz (*Spodoptera frugiperda*), gusano elotero (*Helicoverpa zea*), barrenador de la caña de azúcar (*Diatraea saccharalis*), oruga de las leguminosas (*Anticarsia gemmatilis*), oruga de la soya (*Chrysodeixis includes*), barrenador del maíz del suroeste (*Diatraea grandiosella*), gusano cortador del poroto del oeste (*Richia albicosta*), gusano cogollero del tabaco (*Heliothis virescens*), barrenador del maíz asiático (*Ostrinia*

furnacalis), isoca bolillera (*Helicoverpa armigera*), barrenador rayado de cabeza oscura (*Chilo suppressalis*), barrenador del tallo rosado (*Sesamia calamistis*), enrulador de las hojas del arroz (*Cnaphalocrocis medinalis*) y similares. En las realizaciones, la proteína insecticida quimérica tiene actividad contra una plaga de insectos del cogollero del maíz que es resistente a una proteína Vip3A y/o una proteína Cry1F.

[0013] Por consiguiente, como un aspecto, la invención proporciona una proteína insecticida quimérica que es tóxica para una plaga de insectos lepidópteros que comprende en una dirección N-terminal a C-terminal: (a) una región N-terminal de una primera proteína Cry1, que es opcionalmente una región N-terminal de una proteína BT-0029 de la SEQ ID NO:2, o una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente idéntica a esta, fusionada a (b) una región C-terminal de una proteína Cry1 diferente; donde una posición de cruzamiento entre la primera proteína Cry1 y la proteína Cry1 diferente está ubicada en el bloque conservado 3. En realizaciones representativas, la proteína Cry1 diferente es una proteína Cry1F (por ejemplo, una proteína Cry1Fa), una proteína Cry1G, una proteína Cry1I (por ejemplo, una proteína Cry1Ia o una proteína Cry1If, tal como BT-0022), una proteína Cry1C (por ejemplo, una proteína Cry1Ca) o una proteína Cry1K.

[0014] En las realizaciones, la proteína insecticida quimérica de acuerdo con la invención tiene actividad insecticida contra una plaga de insectos *Spodoptera frugiperda* o una población de plaga de insectos con resistencia a una proteína Vip3A y/o una proteína Cry1F.

[0015] Como aspecto adicional, la invención proporciona una secuencia de nucleótidos que codifica las proteínas insecticidas quiméricas de la invención, y casetes de expresión y vectores que comprenden la misma. En las realizaciones, el polinucleótido tiene codones optimizados para la expresión en una planta (por ejemplo, una planta monocotiledónea tal como maíz o una planta dicotiledónea tal como soja).

[0016] Como un aspecto adicional, la invención proporciona una célula transgénica (por ejemplo, una célula vegetal transgénica tal como una célula dicotiledónea o célula monocotiledónea, o una célula bacteriana transgénica), parte de la planta transgénica, cultivo vegetal transgénico y semilla de la planta transgénica que comprende una secuencia de nucleótidos, casete de expresión, vector y/o proteína insecticida quimérica de la invención.

[0017] Como un aspecto adicional más, la invención engloba plantas transgénicas que comprenden una célula vegetal, parte de la planta, secuencia de nucleótidos, casete de expresión, vector y/o proteína insecticida quimérica de la invención.

[0018] Como un aspecto adicional hay semillas que producen las plantas transgénicas de la invención y semillas producidas por las plantas transgénicas de la invención.

[0019] También se proporcionan productos recolectados derivados de las plantas transgénicas de la invención, donde el producto recolectado comprende opcionalmente una secuencia de nucleótidos, casete de expresión, vector y/o proteína insecticida quimérica de la invención. Además se proporcionan productos procesados derivados de los productos recolectados

de la invención, donde el producto recolectado comprende opcionalmente una secuencia de nucleótidos, casete de expresión, vector y/o proteína insecticida quimérica de la invención. En las realizaciones, el producto recolectado o producto procesado comprende una proteína insecticida quimérica de la invención y tiene una mayor resistencia a una plaga de insectos (por ejemplo, una plaga de insectos lepidópteros).

[0020] Como aún un aspecto adicional, la invención proporciona una composición insecticida que comprende una proteína insecticida quimérica de la invención y un portador agrícolamente aceptable.

[0021] Aún adicionalmente, la invención proporciona como un aspecto adicional un método para producir una planta transgénica con un aumento de la resistencia a una plaga de insectos (por ejemplo, una plaga de insectos lepidópteros). En las realizaciones, el método comprende introducir en una planta un polinucleótido, casete de expresión o vector de la invención, donde la proteína insecticida quimérica se expresa en la planta, para producir de esta manera una planta transgénica con una mayor resistencia a una plaga de insectos. Opcionalmente, el paso de introducción comprende: (i) transformar una célula vegetal con el polinucleótido, casete de expresión o vector y regenerar una planta transgénica; o (ii) cruzar una primera planta que comprende el polinucleótido, casete de expresión o vector con una segunda planta. En las realizaciones, el método comprende además producir una semilla a partir de la planta transgénica. En las realizaciones, el método comprende además obtener una planta de la progenie a partir de la planta

transgénica, donde la planta de la progenie comprende el polinucleótido, el casete de expresión o el vector, expresa la proteína insecticida quimérica y tiene una mayor resistencia a una plaga de insectos.

[0022] Como otro aspecto más, la invención proporciona un método para producir una planta transgénica con una mayor resistencia a una plaga de insectos (por ejemplo, una plaga de insectos lepidópteros), comprendiendo el método: (a) plantar una semilla que comprende un polinucleótido, casete de expresión o vector de la invención; y (b) cultivar una planta transgénica a partir de la semilla, donde la planta transgénica comprende el polinucleótido, casete de expresión o vector y produce la proteína insecticida quimérica y tiene una mayor resistencia a una plaga de insectos. En las realizaciones, el método comprende además: (c) recolectar una semilla de la planta transgénica de (b), donde la semilla recolectada comprende el polinucleótido, casete de expresión, vector y/o la proteína insecticida quimérica. Opcionalmente, la semilla tiene una mayor resistencia contra una plaga de insectos (por ejemplo, una plaga de insectos lepidópteros).

[0023] Aún más, como otro aspecto, la invención proporciona un método para producir una semilla. En las realizaciones, el método comprende: (a) proporcionar una planta transgénica que comprende un polinucleótido, casete de expresión o vector de la invención; y (b) recolectar una semilla de la planta transgénica de (a), donde la semilla recolectada comprende el polinucleótido, casete de expresión o vector y/o una proteína insecticida quimérica de la invención. Opcionalmente, la semilla tiene una mayor

resistencia contra una plaga de insectos (por ejemplo, una plaga de insectos lepidópteros).

[0024] La invención contempla además un método para producir una semilla de la planta híbrida. En realizaciones representativas, el método comprende: (a) cruzar una primera planta endogámica, que es una planta transgénica que comprende un polinucleótido, casete de expresión o vector de la invención con una planta endogámica diferente, que puede comprender o no un polinucleótido, casete de expresión o vector de la invención; y (b) permitir que se forme una semilla híbrida. En las realizaciones, la semilla híbrida comprende un polinucleótido, casete de expresión o vector y/o una proteína insecticida quimérica de la invención. Opcionalmente, la semilla tiene una mayor resistencia contra una plaga de insectos (por ejemplo, una plaga de insectos lepidópteros).

[0025] Como otro aspecto, la invención proporciona un método para controlar una plaga de insectos (por ejemplo, una plaga de insectos lepidópteros, tal como el cogollero del maíz), comprendiendo el método suministrar a la plaga de insectos o a un entorno de esta una composición que comprende una cantidad eficaz de una proteína insecticida quimérica o composición insecticida de la invención. En las realizaciones, el método es un método para controlar una plaga de insectos lepidópteros (por ejemplo, cogollero del maíz) que es resistente a la proteína Vip3A y/o la proteína Cry1F.

[0026] En consecuencia, como otro aspecto, la invención proporciona métodos para reducir el desarrollo de la resistencia a una proteína Vip3A y/o una proteína Cry1F en

una población de una plaga de insectos lepidópteros diana (por ejemplo, cogollero del maíz). En las realizaciones, el método comprende suministrar a la población diana o a un entorno de esta una planta transgénica que comprende: (i) un polinucleótido, casete de expresión o vector de acuerdo con la invención; y (ii) un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína Vip3A y/o una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína Cry1F; donde la proteína insecticida quimérica y la proteína Vip3A y/o la proteína Cry1F se producen en la planta transgénica.

[0027] La invención también se refiere a métodos para utilizar los polinucleótidos de la invención, por ejemplo, en construcciones de ADN o casetes de expresión o vectores para la transformación y expresión en organismos, que incluyen plantas y microorganismos tales como bacterias. Las secuencias de nucleótidos o aminoácidos pueden ser secuencias sintéticas o nativas que han sido diseñadas para la expresión en un organismo tal como una planta o bacteria. La invención contempla además métodos para preparar las proteínas insecticidas de la invención y métodos para utilizar las secuencias de polinucleótidos y las proteínas insecticidas, por ejemplo, en microorganismos para controlar insectos o en plantas transgénicas para conferir protección contra el daño causado por insectos.

[0028] Otro aspecto de la invención incluye composiciones y formulaciones insecticidas que comprenden las proteínas insecticidas quiméricas de la invención, y métodos para utilizar las composiciones o formulaciones con el fin de controlar poblaciones de insectos, por ejemplo, aplicando las composiciones o formulaciones a áreas infestadas por

insectos, o para tratar de forma profiláctica áreas o plantas susceptibles de ser atacadas por insectos con el fin de conferir protección contra las plagas de insectos. Opcionalmente, las composiciones o formulaciones de la invención pueden comprender, además de la proteína insecticida quimérica de la invención, otros agentes pesticidas tales como pesticidas químicos, otras proteínas pesticidas, o ARNs, por ejemplo, con el fin de aumentar o potenciar la capacidad de controlar insectos de la composición o formulación y/o para gestionar la resistencia de los insectos.

[0029] Las composiciones y los métodos de la invención son útiles para controlar plagas de insectos que atacan a plantas, particularmente plantas de cultivo. Las composiciones de la invención también son útiles para detectar la presencia de una proteína insecticida quimérica o ácido nucleico que la codifica en productos comercializados u organismos transgénicos.

[0030] La invención también proporciona usos de las proteínas insecticidas quiméricas, ácidos nucleicos, plantas transgénicas, partes de plantas, semillas y composiciones insecticidas de la invención, por ejemplo, para controlar una plaga de insectos, tal como una plaga de lepidópteros.

[0031] En las realizaciones, la invención proporciona un método para utilizar un polinucleótido, casete de expresión, vector o célula hospedadora de la invención para producir una composición insecticida para controlar una plaga de insectos (por ejemplo, una plaga de insectos lepidópteros).

[0032] En las realizaciones, la invención proporciona un método para utilizar un polinucleótido, casete de expresión o vector de la invención para producir una semilla transgénica, donde la semilla transgénica se desarrolla en una planta transgénica con una mayor resistencia a una plaga de insectos.

[0033] En otro aspecto, la invención también contempla el uso de una planta transgénica de la invención para producir una semilla transgénica, que es opcionalmente una semilla híbrida.

[0034] En las realizaciones, la invención proporciona un método para utilizar una proteína insecticida quimérica, polinucleótido, casete de expresión, vector, planta transgénica o composición insecticida de la invención para prevenir el desarrollo de la resistencia en una población de una plaga de insectos lepidópteros diana respecto a la proteína Vip3A y/o proteína Cry1F.

[0035] Estas y otras características, aspectos y ventajas de la invención se comprenderán más fácilmente haciendo referencia a la siguiente descripción detallada y a las reivindicaciones.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0036] Las Figuras 1A y 1B muestran la alineación de las secuencias completas de aminoácidos de BT-0029 (SEQ ID NO: 2), BT-0022 (SEQ ID NO: 1), Cry1Fa (SEQ ID NO: 8) y Cry1Ka (SEQ ID NO: 12). Se indican el núcleo del Dominio III y el Bloque Conservado 3 (CB3). Los aminoácidos idénticos en las secuencias alineadas están sombreados.

[0037] Las Figuras 2A y 2B muestran la alineación de las secuencias completas de aminoácidos de BT-0029 (SEQ ID

NO: 2) con quimeras de BT-0029 ejemplares: Bt29-Bt22 (SEQ ID NO: 3), Bt29-1Fa (SEQ ID NO: 9), y Bt29-1Ka (SEQ ID NO: 13). Se indican el núcleo del Dominio III y el Bloque Conservado 3 (CB3). El núcleo del Dominio III indicado en la figura se deriva de la segunda proteína Cry. Los aminoácidos idénticos en las secuencias alineadas están sombreados.

[0038] Las Figuras 3A, 3B, 3C y 3D muestran una quimera Bt29-Bt22 de longitud completa (SEQ ID NO:3) alineada con una serie de quimeras Bt29-Bt22, Bt29-Bt22Tr1 (SEQ ID NO:20), Bt29-Bt22Tr2 (SEQ ID NO:21), Bt29-Bt22Tr3 (SEQ ID NO:22), Bt29-Bt22Tr4 (SEQ ID NO:23), Bt29-Bt22Tr5 (SEQ ID NO:24) y Bt29-Bt22Tr6 (SEQ ID NO:25), con truncamientos C-terminales dentro de la cola de protoxina BT-0029.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS SECUENCIAS EN LA LISTA DE SECUENCIAS

[0039] SEQ ID NO: 1 es una secuencia de aminoácidos de una proteína BT-0022.

[0040] SEQ ID NO: 2 es una secuencia de aminoácidos de una proteína BT-0029.

[0041] SEQ ID NO: 3 es la secuencia de aminoácidos de una quimera Bt29-Bt22. La secuencia BT-0022 son los aminoácidos 459-597.

[0042] SEQ ID NO: 4 es una secuencia de nucleótidos que codifica la quimera Bt29-Bt22 de la SEQ ID NO: 3.

[0043] SEQ ID NO: 5 es una secuencia optimizada para el maíz ejemplar que codifica la quimera Bt29-Bt22 de la SEQ ID NO: 3.

[0044] SEQ ID NO: 6 es una secuencia optimizada para el maíz ejemplar que codifica la quimera Bt29-Bt22 de la SEQ ID NO: 3.

[0045] SEQ ID NO: 7 es una secuencia optimizada para el maíz ejemplar que codifica la quimera Bt29-Bt22 de la SEQ ID NO: 3.

[0046] SEQ ID NO: 8 es la secuencia de aminoácidos de una Cry1Fa de longitud completa.

[0047] SEQ ID NO: 9 es la secuencia de aminoácidos de una quimera Bt29-1Fa. La secuencia Cry1Fa son los aminoácidos 459-597.

[0048] SEQ ID NO: 10 es una secuencia de nucleótidos que codifica la quimera Bt29-1Fa de la SEQ ID NO: 9.

[0049] SEQ ID NO: 11 es una secuencia optimizada para el maíz ejemplar que codifica la quimera Bt29-1Fa de la SEQ ID NO: 9.

[0050] SEQ ID NO: 12 es la secuencia de aminoácidos de una Cry1Ka de longitud completa.

[0051] SEQ ID NO: 13 es la secuencia de aminoácidos de una quimera Bt29-1Ka. La secuencia Cry1Ka son los aminoácidos 459-597.

[0052] SEQ ID NO: 14 es una secuencia de nucleótidos que codifica la quimera Bt29-1Ka de la SEQ ID NO: 13.

[0053] SEQ ID NO: 15 es la secuencia de aminoácidos de una quimera Bt29-1Kav2.

[0054] SEQ ID NO: 16 es la secuencia de nucleótidos que codifica la quimera Bt29-1Ka de la SEQ ID NO: 15.

[0055] SEQ ID NO: 17 es la secuencia de aminoácidos de una Cry1Ca de longitud completa.

[0056] SEQ ID NO: 18 es la secuencia de aminoácidos de una quimera Bt29-1Ca. La secuencia Cry1Ca son los aminoácidos 459-597.

[0057] SEQ ID NO: 19 es una secuencia de nucleótidos que codifica la quimera Bt29-1Ca de la SEQ ID NO: 18.

[0058] SEQ ID NO: 20 es la secuencia de aminoácidos de la proteína Bt29-Bt22Tr1.

[0059] SEQ ID NO: 21 es la secuencia de aminoácidos de la proteína Bt29-Bt22Tr2.

[0060] SEQ ID NO: 22 es la secuencia de aminoácidos de la proteína Bt29-Bt22Tr3.

[0061] SEQ ID NO: 23 es la secuencia de aminoácidos de la proteína Bt29-Bt22Tr4.

[0062] SEQ ID NO: 24 es la secuencia de aminoácidos de la proteína Bt29-Bt22Tr5.

[0063] SEQ ID NO: 25 es la secuencia de aminoácidos de la proteína Bt29-Bt22Tr6.

[0064] SEQ ID NO: 26 es la secuencia de aminoácidos de la proteína BT29BT22-TL22v1.

[0065] SEQ ID NO: 27 es la secuencia de aminoácidos de la proteína BT29BT22-TL22v2.

[0066] SEQ ID NO: 28 es la secuencia de aminoácidos de la proteína BT29BT22-TL22v3.

[0067] SEQ ID NO: 29 es la secuencia de aminoácidos de la proteína BT29BT22-TL22v4.

[0068] SEQ ID NO: 30 es la secuencia de aminoácidos de la proteína BT29BT22-TL22v5.

[0069] SEQ ID NO: 31 es la secuencia de aminoácidos de la proteína BT29BT22-TL22v6.

[0070] SEQ ID NO: 32 es la secuencia de aminoácidos de la proteína BT291FaTr1.

[0071] SEQ ID NO: 33 es la secuencia de aminoácidos de la proteína BT291FaTr2.

[0072] SEQ ID NO: 34 es la secuencia de aminoácidos de la proteína BT291FaTr3.

[0073] SEQ ID NO: 35 es la secuencia de aminoácidos de la proteína BT291FaTr4.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0074] No se pretende que esta descripción sea un catálogo detallado de todas las diferentes formas en que se puede implementar la invención ni de todas las características que se pueden añadir a la presente invención. Por ejemplo, las características ilustradas con relación a una realización se pueden incorporar a otras realizaciones y las características ilustradas con relación a una realización particular se pueden eliminar de dicha realización. De este modo, la invención contempla que, en algunas realizaciones de la invención, se pueda excluir u omitir cualquier característica o combinación de características expuestas en el presente documento. Además, para los expertos en la materia, a la vista de la presente divulgación, resultarán evidentes numerosas variaciones y adiciones que se pueden aplicar a las diversas realizaciones sugeridas en el presente documento, las cuales no se alejan de la presente invención. Por lo tanto, se pretende que las siguientes descripciones ilustren algunas realizaciones particulares de la invención pero no se pretende que especifiquen exhaustivamente todas sus permutaciones, combinaciones y variaciones.

[0075] Todos los términos técnicos y científicos empleados en la presente, a no ser que se definan de otra forma, tienen el mismo significado que el que sobreentienden habitualmente los expertos en la técnica a la que pertenece esta invención. La terminología utilizada en la descripción

de la invención de la presente tiene como propósito describir únicamente realizaciones particulares y no se pretende que limite la invención.

[0076] Todas las publicaciones, solicitudes de patente, patentes y otras referencias citadas en la presente se incorporan por referencia en su totalidad al contenido relevante de la frase y/o párrafo en el cual la referencia está presente.

[0077] Las secuencias de nucleótidos proporcionadas en la presente se presentan en la dirección de 5' a 3', de izquierda a derecha y se presentan empleando el código estándar para representar bases de nucleótidos según se expone en 37 CFR §§1.821 - 1.825, y la Norma ST.25 de la Organización Mundial de la Propiedad Intelectual (WIPO), por ejemplo: adenina (A), citosina (C), timina (T) y guanina (G).

[0078] Del mismo modo, los aminoácidos se indican utilizando la Norma ST.25 de WIPO, por ejemplo: alanina (Ala; A), arginina (Arg; R), asparagina (Asn; N), ácido aspártico (Asp; D), cisteína (Cys; C), glutamina (Gln; Q), ácido glutámico (Glu; E), glicina (Gly; G), histidina (His; H), isoleucina (Ile; I), leucina (Leu; L), lisina (Lys; K), metionina (Met; M), fenilalanina (Phe; F), prolina (Pro; P), serina (Ser; S), treonina (Thr; T), triptófano (Trp; W), tirosina (Tyr; Y) y valina (Val; V).

[0079] A menos que el contexto indique lo contrario, se pretende específicamente que las diferentes características de la invención descritas en la presente se puedan emplear en cualquier combinación. Además, la presente invención también contempla el hecho de que, en algunas realizaciones de la invención, se pueda excluir u omitir

cualquier característica o combinación de características expuestas en la presente. Para ilustrarlo, si la memoria descriptiva indica que una composición comprende los componentes A, B y C, se pretende específicamente que cualquiera de A, B o C, o una combinación de estos, pueda omitirse y excluirse de manera singular o en cualquier combinación.

Definiciones.

[0080] Tal como se utiliza en la descripción de la invención y las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "uno/a", "un" y "el/la" pretenden incluir las formas en plural también, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

[0081] Tal como se utiliza en la presente, la expresión "y/o", contempla y se refiere a todas y cada una de las posibles combinaciones de uno o más de los elementos enumerados asociados, así como también a la carencia de combinaciones cuando se interpreta en la forma alternativa ("o").

[0082] El término "aproximadamente" tal como se utiliza en la presente cuando se refiere a un valor medible tal como una dosificación o período de tiempo y similares, pretende abarcar variaciones de $\pm$ un 20%, $\pm$ un 10%, $\pm$ un 5%, $\pm$ un 1%, $\pm$ un 0.5% o incluso $\pm$ un 0.1% de la cantidad especificada. Tal como se utilizan en la presente, frases tales como "entre aproximadamente X e Y" significan "entre aproximadamente X y aproximadamente Y" y frases tales como "de aproximadamente X a y" significan "de aproximadamente X a aproximadamente Y".

[0083] Tal como se utiliza en la presente, en frases tales como "de X a Y" se debe interpretar que incluyen X e Y, a menos que el contexto indique lo contrario.

[0084] Con "actividad" de una proteína insecticida de la invención se da a entender que la proteína insecticida funciona como un agente de control de insectos activo por vía oral, tiene un efecto tóxico, por ejemplo, inhibiendo la capacidad de la plaga de insectos para sobrevivir, crecer y/o reproducirse (por ejemplo, provocando morbilidad y/o mortalidad) y/o es capaz de alterar y/o impedir la alimentación del insecto, lo que puede que cause o no la muerte del insecto. De este modo, cuando una proteína insecticida de la invención se suministra al insecto, el resultado es típicamente la morbilidad y/o mortalidad del insecto y/o se reduce o cesa la alimentación del insecto de la fuente mediante la cual la proteína insecticida está disponible para el insecto.

[0085] En el contexto de la presente invención, una proteína "quimérica" es una proteína creada fusionando la totalidad o una porción de al menos dos proteínas diferentes. En las realizaciones de la presente invención, la proteína quimérica es una proteína Cry quimérica que comprende la totalidad o una porción de dos proteínas Cry diferentes fusionadas entre sí en un único polipéptido. Una "proteína insecticida quimérica" es una proteína quimérica que tiene actividad insecticida (tal como se describe en la presente).

[0086] Una "secuencia codificante" es una secuencia de ácido nucleico que se transcribe en forma de ARN tal como ARNm, ARNr, ARNt, ARNsn, ARN sentido o ARN antisentido. En

las realizaciones, el ARN se traduce posteriormente para producir una proteína.

[0087] Tal como se utiliza en la presente, una secuencia de nucleótidos "con codones optimizados" se refiere a una secuencia de nucleótidos de un polinucleótido recombinante, transgénico o sintético en la que los codones se seleccionan para que reflejen la preferencia codónica concreta que pueda tener una célula u organismo hospedador. Esto se realiza normalmente de tal forma que se preserve la secuencia de aminoácidos del polipéptido codificado por la secuencia de nucleótidos con codones optimizados. En ciertas realizaciones, una secuencia de nucleótidos tiene codones optimizados para la célula (por ejemplo, una célula animal, vegetal, fúngica o bacteriana) en la que la construcción se va a expresar. Por ejemplo, una construcción que se va a expresar en una célula vegetal puede tener toda su secuencia o partes de esta con codones optimizados para la expresión en una planta. Véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. n.º 6,121,014. En las realizaciones, los polinucleótidos de la invención tienen codones optimizados para la expresión en una célula vegetal (por ejemplo, una célula dicotiledónea o una célula monocotiledónea) o una célula bacteriana.

[0088] "Controlar" una plaga de insectos significa inhibir, a través de un efecto tóxico, la capacidad de la plaga de insectos para sobrevivir, crecer, alimentarse, y/o reproducirse, y/o limitar los daños relacionados con los insectos o las pérdidas en una planta de cultivo provocadas por la plaga de insectos y/o proteger el rendimiento potencial de un cultivo provocado por la plaga cuando se cultiva en presencia de una plaga de insectos. "Controlar"

una plaga de insectos puede o no significar aniquilar a los insectos, aunque en las realizaciones de la invención, el "control" del insecto significa aniquilar a los insectos.

[0089] Los términos "comprenden", "comprende" o "que comprende", cuando se utilizan en esta memoria descriptiva, indican la presencia de características, números enteros, pasos, operaciones, elementos o componentes mencionados, pero no excluyen la presencia o adición de una o más características, números enteros, pasos, operaciones, elementos, componentes diferentes y/o grupos de estos.

[0090] Tal como se utiliza en la presente, la frase de transición "constituido esencialmente por" (y variantes gramaticales) significa que se debe considerar que el alcance de una reivindicación contempla los materiales o pasos especificados que se mencionan en la reivindicación "y aquellos que no afectan materialmente a la(s) característica(s) básica(s) y novedosa(s)" de la invención reivindicada. De este modo, no se pretende que la expresión "constituido esencialmente por", cuando se utiliza en una reivindicación de esta invención, se interprete como equivalente a "que comprende".

[0091] En el contexto de la invención, "correspondiente a" o "corresponde a" significa que cuando las secuencias de aminoácidos de proteínas modificadas u homólogas se alinean entre sí, los aminoácidos que "corresponden a" ciertas posiciones enumeradas en la proteína modificada u homóloga son los que se alinean con estas posiciones en una proteína de referencia, pero no se encuentran necesariamente en las mismas posiciones numéricas exactas con respecto a una secuencia de aminoácidos de

referencia particular de la invención. Por ejemplo, si la SEQ ID NO: 2 (BT-0029) es la secuencia de referencia y se alinea con la SEQ ID NO: 1 (BT-0022) como en la Figura 1, la secuencia TLEAVT que sigue inmediatamente al Dominio III en la SEQ ID NO: 1 (BT-0022) "corresponde" a la secuencia TFEAEY que sigue inmediatamente al Dominio III de la SEQ ID NO: 2 (BT-0029).

[0092] Tal como se utiliza en la presente, el término "proteína Cry" se refiere a una proteína insecticida del tipo delta-endotoxina cristalina de *Bacillus thuringiensis*. La expresión "proteína Cry" se puede referir a la forma de protoxina o cualquier toxina o fragmento activo como insecticida de esta incluida la forma de la toxina parcialmente procesada y madura (por ejemplo, sin el fragmento peptídico N-terminal y/o la cola de la protoxina C-terminal).

[0093] Tal como se utiliza en la presente, "suministrar" o "que suministra" (y variaciones gramaticales) una composición o proteína insecticida significa que la composición o proteína insecticida entra en contacto con un insecto, lo cual facilita la ingesta oral de la composición o proteína insecticida y da como resultado un efecto tóxico y el control del insecto. La composición o proteína insecticida se puede suministrar de muchas maneras reconocidas, que incluyen, sin carácter limitante, la expresión en la planta transgénica, una o más composiciones proteicas formuladas, una o más composiciones proteicas pulverizables, una matriz de cebo o cualquier otro sistema de suministro de proteínas reconocido en la técnica.

[0094] El término "dominio" se refiere a un conjunto de aminoácidos conservados en posiciones específicas a lo largo de una alineación de secuencias de proteínas relacionadas desde un punto de vista evolutivo. Aunque los aminoácidos en otras posiciones pueden variar entre homólogos, los aminoácidos que están sumamente conservados en posiciones específicas indican aminoácidos que son probablemente esenciales para la estructura, estabilidad o función de una proteína. Identificados por su grado elevado de conservación en secuencias alineadas de una familia de homólogos proteicos, se pueden utilizar como identificadores para determinar si cualquier polipéptido en cuestión pertenece a un grupo de polipéptidos identificado previamente.

[0095] La "cantidad eficaz para controlar insectos" se refiere a esa concentración de una proteína insecticida que inhibe, mediante un efecto tóxico, la capacidad de un insecto para sobrevivir, crecer, alimentarse y/o reproducirse, y/o que limita el daño o las pérdidas relacionadas con los insectos en una planta de cultivo. Una "cantidad eficaz para controlar insectos" puede o no referirse a aniquilar al insecto, aunque en las realizaciones indica que se aniquila al insecto.

[0096] El "casete de expresión", tal como se utiliza en la presente, se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de dirigir la expresión de al menos un polinucleótido de interés, tal como un polinucleótido que codifica una proteína insecticida de la invención, en una célula hospedadora apropiada, que comprende un promotor ligado operativamente al polinucleótido de interés que está ligado

operativamente a una señal de terminación. Un "casete de expresión" también suele comprender polinucleótidos adicionales para facilitar la traducción correcta del polinucleótido de interés. El casete de expresión también puede comprender otros polinucleótidos no relacionados con la expresión de un polinucleótido de interés pero que están presentes debido a sitios de restricción convenientes para eliminar el casete de un vector de expresión. En las realizaciones, al menos uno de los componentes del casete de expresión puede ser heterólogo (es decir, exógeno) con respecto a al menos uno de los otros componentes (por ejemplo, un promotor heterólogo asociado operativamente a un polinucleótido de interés). El casete de expresión también puede ser de origen natural, pero que se haya obtenido en una forma recombinante útil para la expresión heteróloga. Normalmente, sin embargo, el casete de expresión es heterólogo con respecto al hospedador, es decir, el casete de expresión (o incluso el polinucleótido de interés) no está presente de manera natural en la célula hospedadora y se ha introducido en la célula hospedadora o en una célula predecesora de esta mediante un proceso de transformación o un proceso de cultivo selectivo. La expresión del (de los) polinucleótido(s) de interés en el casete de expresión está controlada normalmente por un promotor. En el caso de un organismo multicelular, tal como una planta, el promotor también puede ser específico o preferencial para un tejido, u órgano o una etapa de desarrollo particular (tal como se describe más detalladamente en la presente). Un casete de expresión, o un fragmento de este, también se puede denominar

"polinucleótido insertado" o "polinucleótido de inserción" cuando se utiliza para transformar una planta.

[0097] Un "gen" se define en la presente como una unidad hereditaria que comprende uno o más polinucleótidos que ocupa una ubicación específica en un cromosoma o plásmido y que contiene las instrucciones genéticas para una característica o rasgo particular en un organismo.

[0098] Tal como se utiliza en la presente, una "proteasa intestinal" se refiere a una proteasa que se encuentra de forma natural en el tubo digestivo de un insecto. Esta proteasa normalmente participa en la digestión de proteínas ingeridas. Los ejemplos de proteasas intestinales incluyen tripsina, que típicamente escinde péptidos en el lado C-terminal de los residuos de lisina (K) o arginina (R), y quimiotripsina, que normalmente escinde péptidos en el lado C-terminal de fenilalanina (F), triptófano (W) o tirosina (Y).

[0099] Tal como se utiliza en la presente, el término "heterólogo" significa exógeno, ajeno, no nativo y/o no presente de manera natural. En las realizaciones, un polinucleótido o polipéptido "heterólogo" es un polinucleótido o polipéptido que no está asociado de manera natural con una célula hospedadora en la cual se introduce, incluidas múltiples copias no presentes de manera natural de una secuencia de nucleótidos o polipéptido presente de manera natural. En las realizaciones, una secuencia de nucleótidos es heteróloga respecto a otra secuencia con la cual esta asociada operativamente, por ejemplo, un promotor puede ser heterólogo (es decir, exógeno) respecto a una secuencia codificante asociada operativamente.

[00100] Tal como se utiliza en la presente, "homólogo" significa nativo. Por ejemplo, una secuencia de nucleótidos o secuencia de aminoácidos homóloga es una secuencia de nucleótidos o secuencia de aminoácidos asociada de manera natural con una célula hospedadora en la cual se introduce, una secuencia promotora homóloga es la secuencia promotora que está asociada de manera natural con una secuencia codificante y similares.

[00101] Los términos y expresiones "aumentar", "que aumenta", "aumentado", "potenciar", "potenciado", "que potencia" y "potenciación" (y variaciones gramaticales de estos) y términos similares, tal como se utilizan en la presente, describen una elevación en el control de una plaga de plantas, por ejemplo, poniendo en contacto una planta con un polipéptido de la invención (tal como, por ejemplo, mediante métodos de aplicación tópica o mediante expresión transgénica). Este aumento en el control puede referirse al nivel de control de la plaga de plantas en ausencia del polipéptido de la invención (por ejemplo, una planta que no expresa transgénicamente el polipéptido o a la que no se ha tratado por vía tópica con el polipéptido). Por lo tanto, en las realizaciones, los términos "aumentar", "que aumenta", "aumentado", "potenciar", "potenciado", "que potencia" y "potenciación" (y variaciones gramaticales de estos), y términos similares, pueden indicar una elevación de al menos aproximadamente un 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 125%, 150%, 200%, 300%, 400%, 500% o más en comparación con un control adecuado (por ejemplo, una planta, parte de

planta, célula vegetal que no está en contacto con un polipéptido de la invención).

[00102] El término "insecticida", tal como se utiliza en la presente, se define como una actividad biológica tóxica capaz de controlar una plaga de insectos, de manera opcional pero preferentemente aniquilándolos.

[00103] Una secuencia de ácido nucleico es "isocodificante" respecto a una secuencia de ácido nucleico de referencia cuando la secuencia de ácido nucleico codifica un polipéptido que posee la misma secuencia de aminoácidos que el polipéptido codificado por la secuencia de ácido nucleico de referencia.

[00104] En realizaciones representativas, las moléculas de ácido nucleico, polinucleótidos o proteínas de la invención están "aislados". Una molécula de ácido nucleico, polinucleótido o proteína "aislado", y similares, se refiere a una molécula de ácido nucleico, polinucleótido o proteína y similares que ya no está en su entorno natural. Una molécula de ácido nucleico, polinucleótido o proteína aislada de la invención puede existir en una forma purificada o puede existir en un hospedador recombinante tal como en una bacteria transgénica o una planta transgénica. En las realizaciones, una molécula de ácido nucleico, secuencia de nucleótidos o polipéptido aislado existe en una forma purificada que está al menos parcialmente separado de al menos algunos de los demás componentes del organismo o virus presentes de manera natural, por ejemplo, la célula o los componentes estructurales virales u otros polipéptidos o ácidos nucleicos que se encuentran asociados de forma habitual con el polinucleótido. En otras realizaciones, una

molécula de ácido nucleico, secuencia de nucleótidos o polipéptido "aislado" puede existir en un entorno no nativo tal como, por ejemplo, una célula hospedadora recombinante. De este modo, por ejemplo, con respecto a las secuencias de nucleótidos, el término "aisladas" puede significar que la secuencia de nucleótidos está separada del cromosoma y/o célula en los que se encuentra de forma natural. Un polinucleótido también está aislado si está separado del cromosoma y/o célula en los que se encuentra de forma natural y se inserta a continuación en un contexto genético, un cromosoma y/o una célula en los que no se encuentra de forma natural (por ejemplo, una célula hospedadora diferente, secuencias reguladoras diferentes y/o una posición en el genoma diferente a las observadas en la naturaleza). Por consiguiente, las moléculas de ácido nucleico, secuencias de nucleótidos y sus polipéptidos codificados recombinantes están "aislados" en el sentido de que, debido a la intervención humana, existen en un entorno diferente de su entorno nativo y, por lo tanto, no son productos naturales, sin embargo, en algunas realizaciones, se pueden introducir en una célula hospedadora recombinante y existir en ella. En realizaciones representativas, la molécula de ácido nucleico aislada, la secuencia de nucleótidos aislada y/o el polipéptido aislado presenta una pureza de al menos aproximadamente un 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, o más.

[00105] El término "motivo" o "secuencia consenso" o "elemento distintivo" se refiere a una región conservada corta en la secuencia de proteínas relacionadas desde un punto de vista evolutivo. Con frecuencia los motivos son

partes de dominios sumamente conservados, pero también pueden incluir únicamente parte del dominio, o estar ubicados fuera del dominio conservado (si todos los aminoácidos del motivo están fuera de un dominio definido).

[00106] Un ácido nucleico, secuencia de nucleótidos, polipéptido o secuencia de aminoácidos "nativo" o "de tipo salvaje" se refiere a un ácido nucleico, secuencia de nucleótidos, polipéptido o secuencia de aminoácidos presente de manera natural o endógeno. De este modo, por ejemplo, un "ARNm de tipo salvaje" es un ARNm que está presente de manera natural en el organismo o que es endógeno respecto a éste.

[00107] Las expresiones "ácido nucleico", "molécula de ácido nucleico", "secuencia de nucleótidos", "oligonucleótido" y "polinucleótido" se utilizan de manera indistinta en la presente, a menos que el contexto indique lo contrario, y se refieren a un heteropolímero de nucleótidos. Estas expresiones y términos incluyen, sin carácter limitante, moléculas de ADN y ARN, incluido ADNc, ADN genómico, ADN y ARN sintéticos (por ejemplo, sintetizados químicamente), ADN plasmídico, ARNm, ARN anti-sentido e híbridos de ARN/ADN, pudiendo ser cualquiera de los cuales lineal o ramificado, monocatenario o bicatenario o una combinación de estos. Cuando se produce ARNds sintéticamente, se pueden utilizar bases menos comunes, tales como inosina, 5-metilcitosina, 6-metiladenina, hipoxantina y otras, para el apareamiento de ribozimas, ARNds y antisentido. Por ejemplo, se ha demostrado que los polinucleótidos que contienen análogos de tipo propino en la posición C-5 de la uridina y citidina se unen a ARN con una alta afinidad y que son inhibidores antisentido potentes de la expresión génica.

También se pueden realizar otras modificaciones, tales como la modificación del esqueleto fosfodiéster o el 2'-hidroxi en el grupo de azúcar ribosa del ARN. En las realizaciones, "ácido nucleico", "molécula de ácido nucleico", "secuencia de nucleótidos", "oligonucleótido" o "polinucleótido" se refieren a ADN.

[00108] Con "enlazado operativamente" o "asociado operativamente", tal como se utilizan en la presente, se pretende dar a entender que los elementos indicados están relacionados funcionalmente entre sí, y que por lo general también están relacionados físicamente. De esta manera, la expresión "enlazado operativamente" o "asociado operativamente", tal como se utiliza en la presente, se refiere a secuencias de nucleótidos en una molécula de ácido nucleico sencillo que están asociadas de forma funcional. De este modo, una primera secuencia de nucleótidos que se encuentra enlazada operativamente a una segunda secuencia de nucleótidos se refiere a una situación en la que la primera secuencia de nucleótidos se encuentra en una relación funcional con la segunda secuencia de nucleótidos. Por ejemplo, un promotor está asociado operativamente a una secuencia de nucleótidos si el promotor efectúa la transcripción o expresión de dicha secuencia de nucleótidos. Los expertos en la técnica apreciarán que las secuencias de control (por ejemplo, el promotor) no necesitan ser contiguas a la secuencia de nucleótidos a las que están asociadas operativamente, siempre que las secuencias de control sirvan para dirigir su expresión. De este modo, por ejemplo, pueden estar presentes secuencias intermedias sin traducir, pero transcritas, entre un promotor y una secuencia de nucleótidos

y el promotor puede aun así considerarse "enlazado operativamente" a la secuencia de nucleótidos o "asociado operativamente" con ésta.

[00109] Una "planta", tal como se utiliza en la presente, se refiere a cualquier planta en cualquier etapa de desarrollo.

[00110] Se puede emplear cualquier planta (o agrupamiento de plantas, por ejemplo, en un género o en una clasificación de orden mayor) para llevar a cabo la presente invención incluidas las angiospermas o gimnospermas, monocotiledóneas o dicotiledóneas.

[00111] Las plantas ejemplares incluyen, sin carácter limitante, el maíz (*Zea mays*), canola (*Brassica napus*, *Brassica rapa* ssp.), alfalfa (*Medicago saliva*), arroz (*Oryza sativa*, incluidas sin carácter limitante las variedades Indica y/o Japonica), colza (*Brassica napus*), centeno (*Secale cereale*), sorgo (*Sorghum bicolor*, *Sorghum vulgare*), girasol (*Helianthus annus*), trigo (*Triticum aestivum*), soya (*Glycine max*), tabaco (*Nicotiana tobacum*), papa (*Solanum tuberosum*), maní (*Arachis hypogaea*), algodón (*Gossypium hirsutum*), boniato (*Ipomoea batatus*), mandioca (*Manihot esculenta*), café (*Cofea* spp.), coco (*Cocos nucifera*), piña (*Ananas comosus*), árboles cítricos (*Citrus* spp.), cacao (*Theobroma cacao*), té (*Camellia sinensis*), plátano (*Musa* spp.), aguacate (*Persea americana*), higo (*Ficus casica*), guayaba (*Psidium guajava*), mango (*Mangifera indica*), aceitunas (*Olea europaea*), papaya (*Carica papaya*), castaña de cajú (*Anacardium occidentale*), macadamia (*Macadamia integrifolia*), almendra (*Prunus amygdalus*), remolacha azucareras (*Beta vulgaris*), manzana (*Malus pumila*), grosella negra (*Rubus*), frutilla (*Fragaria*),

nuez (*Juglans regia*), uva (*Vitis vinifera*), damasco (*Prunus armeniaca*), cereza (*Prunus*), durazno (*Prunus persica*), ciruela (*Prunus domestica*), pera (*Pyrus communis*), melón (*Citrullus vulgaris*), lenteja de agua (*Lemna* spp.), avena (*Avena sativa*), cebada (*Hordium vulgare*), hortalizas, plantas ornamentales, coníferas y pastos (por ejemplo, con fines ornamentales, recreativos o forrajeros) y céspedes de biomasa (por ejemplo, pasto varilla y *miscanthus*).

[00112] Las hortalizas incluyen, sin carácter limitante, especies de solanáceas (por ejemplo, tomates; *Lycopersicon esculentum*), lechuga (por ejemplo, *Lactuea sativa*), zanahorias (*Caucus carota*), coliflor (*Brassica oleracea*), apio (*Apium graveolens*), berenjena (*Solanum melongena*), espárrago (*Asparagus officinalis*), oca (*Abelmoschus esculentus*), chauchas (*Phaseolus vulgaris*), frijol de lima (*Phaseolus limensis*), arvejas (*Lathyrus* spp.), miembros del género *Cucurbita* tales como zapallito Hubbard (*C. Hubbard*), zapallito Butternut (*C. moschata*), calabacita (*C. pepo*), zapallito Crookneck (*C. crookneck*), *C. argyrosperma*, *C. argyrosperma* ssp *sororia*, *C. digitata*, *C. ecuadorensis*, *C. foetidissima*, *C. lundelliana*, y *C. martinezii*, y miembros del género *Cucumis* tales como pepino (*Cucumis sativus*), melones cantalupo (*C. cantalupensis*), y melón almizcleño (*C. melo*).

[00113] Las plantas ornamentales incluyen, sin carácter limitante, azalea (*Rhododendron* spp.), hortensia (*Macrophylla hydrangea*), hibisco (*Hibiscus rosasanensis*), rosas (*Rosa* spp.), tulipanes (*Tulipa* spp.), narcisos (*Narcissus* spp.), petunias (*Petunia hybrida*), claveles

(*Dianthus caryophyllus*), flor de Pascua (*Euphorbia pulcherrima*) y crisantemo.

[00114] Las coníferas que se pueden emplear al poner en práctica la presente invención incluyen, por ejemplo, pinos tales como el pino tadea (*Pinus taeda*), pino ellioti (*Pinus elliotii*), pino ponderosa (*Pinus ponderosa*), pino contorta (*Pinus contorta*) y pino de Monterrey (*Pinus radiata*); abeto Douglas (*Pseudotsuga menziesii*); falso abeto del Canadá (*Tsuga canadensis*); picea de Sitka (*Picea glauca*); secuoya (*Sequoia sempervirens*); abetos verdaderos tales como el abeto plateado (*Abies amabilis*) y el abeto balsámico (*Abies balsamea*); y cedros tales como el cedro rojo occidental (*Thuja plicata*) y el cedro amarillo de Alaska (*Chamaecyparis nootkatensis*).

[00115] El pasto incluye, sin carácter limitante, pasto Zoysia, agróstides, festuca, pasto azul, pasto de San Agustín, pasto Bermuda, pasto búfalo, raigrás y pasto ovillo.

[00116] También se incluyen plantas que sirven principalmente como modelos de laboratorio, por ejemplo, *Arabidopsis thaliana*.

[00117] Una "célula vegetal" se refiere a una unidad estructural y fisiológica de una planta, que comprende un protoplasto y una pared celular. La célula vegetal puede estar en forma de una única célula aislada o de una célula cultivada, o puede formar parte de una unidad con una organización superior tal como, por ejemplo, un tejido vegetal, un órgano vegetal o una planta entera.

[00118] Un "cultivo de células vegetales" se refiere a un cultivo de unidades vegetales tal como, por ejemplo, protoplastos, células de cultivo celular, células en tejidos

vegetales, polen, tubos polínicos, óvulos, sacos embrionarios, cigotos y embriones en diferentes etapas de desarrollo.

[00119] La expresión "material vegetal" se refiere a las hojas, vástagos, raíces, flores o partes de las flores, frutas, polen, óvulos, cigotos, semillas, esquejes, cultivos de tejidos o celulares, o cualquier otra parte o producto de una planta.

[00120] Un "órgano vegetal" es una parte distintiva visiblemente diferenciada y estructurada de una planta tal como una raíz, vástago, hoja, botón floral o embrión.

[00121] Tal como se utiliza en la presente, la expresión "parte de la planta" incluye, sin carácter limitante, embriones, polen, óvulos, semillas, hojas, flores, ramas, fruta, tallos, raíces, ápices radiculares, anteras y/o células vegetales, incluidas las células vegetales que están intactas en plantas y/o partes de las plantas, protoplastos vegetales, tejidos vegetales, cultivos de tejidos de células vegetales, callos de plantas, agregados vegetales y similares.

[00122] La expresión "tejido vegetal", tal como se utiliza en la presente, se refiere a un grupo de células vegetales organizadas en una unidad estructural y funcional. Queda incluido cualquier tejido vegetal en la planta o en cultivo. Esta expresión incluye, sin carácter limitante, plantas enteras, órganos vegetales, semillas de plantas, el cultivo tisular y grupos cualesquiera de células vegetales organizadas en unidades estructurales o funcionales. El uso de este término junto con, o en ausencia de, cualquier tipo específico de tejido vegetal, tal como el que se indica

anteriormente o que esté contemplado de otra manera por esta definición, no pretende ser exclusivo de cualquier otro tipo de tejido vegetal.

[00123] Un "polinucleótido de interés" se refiere a cualquier polinucleótido que, cuando se transfiere a un organismo, por ejemplo, una planta, confiere al organismo una característica deseada tal como resistencia a insectos, resistencia a enfermedades, tolerancia a herbicidas, resistencia a antibióticos, valor nutricional mejorado, rendimiento mejorado en un proceso industrial, producción de una enzima o metabolito valiosos desde un punto de vista comercial, una capacidad reproductora alterada y similares.

[00124] Se comprenderá que una "porción" o "fragmento" de un polipéptido de la invención se refiere a una secuencia de aminoácidos con una longitud reducida respecto a una secuencia de aminoácidos de referencia de un polipéptido de la invención. Una porción o fragmento de este tipo de acuerdo con la invención, cuando corresponda, puede estar incluido en un polipéptido mayor del cual sea un constituyente (por ejemplo, una proteína de fusión o etiquetada). En las realizaciones, la "porción" o "fragmento" mantiene sustancialmente la actividad insecticida (por ejemplo, al menos un 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95% o incluso un 100% de la actividad de la proteína completa, o tiene incluso una actividad insecticida mayor que la proteína completa).

[00125] Los términos "proteína", "péptido" y "polipéptido" se utilizan indistintamente en la presente.

[00126] El término "promotor", tal como se utiliza en la presente, se refiere a un polinucleótido que se encuentra normalmente en dirección 5' respecto a un polinucleótido

codificante, que controla la expresión del polinucleótido codificante al hacer posible el reconocimiento por parte de la ARN polimerasa y otros elementos de la maquinaria transcripcional.

[00127] Un "protoplasto", tal como se utiliza en la presente, se refiere a una célula vegetal aislada sin una pared celular o solamente con partes de la pared celular.

[00128] Tal como se utiliza en la presente, el término "recombinante" se refiere a una forma de ácido nucleico (por ejemplo, ADN o ARN) o una proteína o un organismo que normalmente no se observaría en la naturaleza y, en este sentido, ha sido creada por el ser humano. Una "molécula de ácido nucleico recombinante" (y términos similares), tal como se utiliza en la presente, es una molécula de ácido nucleico que comprende una combinación de polinucleótidos que no se presentarían juntos de manera natural y que es el resultado de la intervención humana, por ejemplo, una molécula de ácido nucleico que comprende una combinación de al menos dos polinucleótidos heterólogos entre sí o una molécula de ácido nucleico que se sintetiza de manera artificial y que comprende un polinucleótido que se diferencia del polinucleótido que existiría normalmente en la naturaleza o una molécula de ácido nucleico que comprende un transgén incorporado artificialmente en el ADN genómico de una célula hospedadora y el ADN flanqueante asociado del genoma de la célula hospedadora. Un ejemplo de una molécula de ácido nucleico recombinante es una molécula de ADN resultado de la inserción de un transgén en el ADN genómico de una planta que, en última instancia, puede dar como resultado la expresión de una molécula proteica o de ARN recombinante en

ese organismo. En las realizaciones, una proteína "recombinante" es una proteína que no existe normalmente en la naturaleza o está presente en un contexto en el que no está presente de manera natural, y se expresa a partir de una molécula de ácido nucleico recombinante. Tal como se utiliza en la presente, una "planta recombinante" es una planta que normalmente no existiría en la naturaleza, que es el resultado de la intervención humana y que contiene un polinucleótido recombinante (por ejemplo, un transgén o una molécula de ácido nucleico heteróloga incorporado en su genoma). Como resultado de tal alteración genómica, la planta recombinante es claramente diferente de la planta natural relacionada.

[00129] Los términos y expresiones "reducir", "reducido", "que reduce", "reducción", "disminuir" y "suprimir" (y variaciones gramaticales de estos) y términos similares, tal como se utilizan en la presente, se refieren a un descenso en la supervivencia, crecimiento y/o reproducción de una plaga de plantas, por ejemplo, poniendo en contacto una planta con un polipéptido de la invención (tal como, por ejemplo, mediante métodos de aplicación tópica o mediante expresión transgénica). Este descenso en la supervivencia, crecimiento y/o reproducción puede estar en referencia al nivel observado en ausencia del polipéptido de la invención (por ejemplo, una planta que no expresa transgénicamente el polipéptido o a la que no se ha tratado por vía tópica con el polipéptido). Por lo tanto, en las realizaciones, los términos "reducir", "reducido", "que reduce", "reducción", "disminuir" y "suprimir" (y variaciones gramaticales de estos) y términos similares, se refieren a un descenso de al

menos aproximadamente un 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o más en comparación con una planta que no está en contacto con un polipéptido de la invención (por ejemplo, una planta que no expresa transgénicamente el polipéptido o que no se ha tratado por vía tópica con el polipéptido). En realizaciones representativas, la reducción da como resultado la ausencia o esencialmente ausencia (es decir, una cantidad insignificante, por ejemplo, inferior a aproximadamente un 10%, inferior a aproximadamente un 5% o incluso inferior a aproximadamente un 1%) de supervivencia, crecimiento y/o reproducción detectable de la plaga de plantas.

[00130] Un "elemento regulador" se refiere a una secuencia de nucleótidos implicada en el control de la expresión de un polinucleótido. Los ejemplos de elementos reguladores incluyen promotores, señales de terminación y secuencias de nucleótidos que facilitan la traducción adecuada de un polinucleótido.

[00131] Como se usa en la presente, "marcador seleccionable" se refiere a una secuencia de nucleótidos que, cuando se expresa, confiere un fenotipo distintivo a la planta, parte de la planta y/o célula vegetal que expresa el marcador y, por lo tanto, permite distinguir tales plantas, partes de la planta y/o células vegetales transformadas de aquellas que no tienen el marcador. Tal secuencia de nucleótidos puede codificar un marcador seleccionable o que se pueda cribar, dependiendo de si el marcador confiere un rasgo que se pueda seleccionar mediante un método químico, tal como utilizando un agente selectivo (por ejemplo, un antibiótico, herbicida o similares), o de si el marcador es

simplemente un rasgo que se pueda identificar mediante la observación o evaluación, tal como mediante un cribado (por ejemplo, el rasgo del locus R).

[00132] Tal como se utiliza en la presente, la "actividad específica" se refiere a la cantidad de proteína requerida para obtener un efecto insecticida. Por lo tanto, cuando una primera proteína tiene una actividad específica superior a una segunda proteína significa que se requiere una menor cantidad de la primera proteína en comparación con la segunda proteína para obtener un efecto insecticida en el mismo porcentaje de insectos.

[00133] La frase "sustancialmente idénticas", en el contexto de dos secuencias de ácidos nucleicos o de aminoácidos, se refiere a dos o más secuencias o subsecuencias que poseen al menos aproximadamente un 50% de identidad entre los residuos de nucleótidos o aminoácidos, cuando se comparan y alinean para que la correspondencia sea máxima, tal como se mide utilizando uno de los siguientes algoritmos para la comparación de secuencias o por inspección visual. En ciertas realizaciones, las secuencias sustancialmente idénticas tienen al menos una identidad entre residuos de nucleótidos o aminoácidos de aproximadamente un 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más. En ciertas realizaciones, existe una identidad sustancial a lo largo de una región de las secuencias que tiene al menos una longitud de aproximadamente 50 residuos, 100 residuos, 150 residuos, 200 residuos, 250 residuos, 300 residuos, 350 residuos, 400 residuos o más. En realizaciones adicionales, las secuencias son sustancialmente idénticas

cuando son idénticas a lo largo de toda la longitud de las regiones codificantes.

[00134] "Identidad" o "porcentaje de identidad" se refiere al grado de identidad entre dos secuencias de ácidos nucleicos o aminoácidos. A la hora de comparar secuencias, normalmente una secuencia actúa como secuencia de referencia con la que se comparan las secuencias de prueba. Cuando se utiliza un algoritmo para la comparación de secuencias, se introducen las secuencias de prueba y de referencia en un ordenador, se designan las coordenadas de las subsecuencias, en caso necesario, y se designan los parámetros del programa algorítmico de las secuencias. El algoritmo para la comparación de las secuencias calcula entonces el porcentaje de identidad secuencial para la secuencia o las secuencias de prueba con relación a la secuencia de referencia, en función de los parámetros del programa designados.

[00135] A la hora de comparar secuencias, normalmente una secuencia actúa como secuencia de referencia con la que se comparan las secuencias de prueba. Cuando se utiliza un algoritmo para la comparación de secuencias, se introducen las secuencias de prueba y de referencia en un ordenador, se designan las coordenadas de las subsecuencias, en caso necesario, y se designan los parámetros del programa algorítmico de las secuencias. El algoritmo para la comparación de las secuencias calcula entonces el porcentaje de identidad secuencial para la secuencia o las secuencias de prueba con relación a la secuencia de referencia, en función de los parámetros del programa designados.

[00136] El alineamiento óptimo de las secuencias para la comparación se puede llevar a cabo, por ejemplo, mediante

el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2: 482 (1981), mediante el algoritmo de alineación por homología de Needleman y Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48: 443 (1970), mediante el método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85: 2444 (1988), mediante implementaciones informáticas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el paquete de software de Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o mediante inspección visual (*remítase de forma general a, Ausubel et al., más adelante*).

[00137] Un ejemplo de un algoritmo que es adecuado para determinar el porcentaje de identidad secuencial y similitud secuencial es el algoritmo BLAST, que se describe en Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215: 403-410 (1990). Se dispone de un software de acceso público para realizar los análisis BLAST en el Centro Nacional de Información Biotecnológica (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Este algoritmo incluye identificar en primer lugar pares de secuencias de puntuación elevada (HSP, por sus siglas en inglés) mediante la identificación de palabras cortas de longitud W en la secuencia problema que igualen o satisfagan cierta puntuación umbral T evaluada positivamente cuando se alinean con una palabra de la misma longitud en una secuencia de la base de datos. Se hace referencia a T como la puntuación umbral de la palabra vecina (Altschul et al., 1990). Estas coincidencias iniciales de las palabras vecinas actúan como semillas para iniciar las búsquedas con el fin de encontrar los HSP más largos que las contengan. Las coincidencias de las palabras se extienden posteriormente en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia en la medida en que se pueda aumentar la

puntuación de alineación acumulada. Las puntuaciones acumuladas para las secuencias de nucleótidos se calculan utilizando los parámetros M (puntuación de recompensa para un par de residuos coincidentes; siempre > 0) y N (puntuación de penalización para residuos no coincidentes; siempre < 0). Para las secuencias de aminoácidos, se utiliza una matriz de puntuación para calcular la puntuación acumulada. La extensión de las coincidencias de las palabras en cada dirección se ve interrumpida cuando la puntuación de alineación acumulada disminuye una cantidad X respecto a su valor máximo alcanzado, la puntuación acumulada tiende a cero o por debajo de cero debido a la acumulación de una o más alineaciones de residuos con puntuación negativa, o se alcanza el final de cualquiera de las secuencias. Los parámetros W, T y X del algoritmo BLAST determinan la sensibilidad y la velocidad de la alineación. El programa BLASTN (para secuencias de nucleótidos) utiliza por defecto una longitud de palabra (W) de 11, una esperanza (E) de 10, un límite de corte de 100, $M = 5$, $N = -4$ y una comparación de ambas hebras. Para las secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP utiliza por defecto una longitud de palabra (W) de 3, una esperanza (E) de 10 y la matriz de puntuación BLOSUM62 (remítase a Henikoff y Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 10915 (1989)).

[00138] Además de calcular el porcentaje de identidad secuencial, el algoritmo BLAST también lleva a cabo un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias (remítase a, por ejemplo, Karlin y Altschul, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 90: 5873-5787 (1993)). Una medida de la similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la

probabilidad de la suma más pequeña ($P(N)$), que proporciona una indicación de la probabilidad de que una coincidencia entre dos secuencias de nucleótidos o de aminoácidos se produzca por casualidad. Por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico de prueba se considera similar a una secuencia de referencia si la probabilidad de la suma más pequeña en una comparación de la secuencia de ácido nucleico de prueba respecto a la secuencia de ácido nucleico de referencia es inferior a aproximadamente 0.1, más preferentemente inferior a aproximadamente 0.01 y de la manera más preferente inferior a aproximadamente 0.001.

[00139] Otro programa informático de uso extendido y aceptado para llevar a cabo las alineaciones de las secuencias es CLUSTALW v1.6 (Thompson, et al., Nuc. Acids Res., 22: 4673-4680, 1994). El número de bases o aminoácidos coincidentes se divide por el número total de bases o aminoácidos, y se multiplica por 100 para obtener un porcentaje de identidad. Por ejemplo, si dos secuencias de 580 pares de bases tenían 145 bases coincidentes, serán idénticas en un 25 por ciento. Si las dos secuencias comparadas tienen longitudes diferentes, el número de coincidencias se divide por la menor de las dos longitudes. Por ejemplo, si había 100 aminoácidos coincidentes entre proteínas de 200 y 400 aminoácidos, estas son idénticas en un 50 por ciento con respecto a la secuencia más corta. Si la secuencia más corta es de menos de 150 bases o 50 aminoácidos de longitud, el número de coincidencias se divide por 150 (para bases de ácido nucleico) o 50 (para aminoácidos), y se multiplica por 100 para obtener un porcentaje de identidad.

[00140] También se puede considerar que dos secuencias de nucleótidos son sustancialmente idénticas cuando las dos secuencias se hibridan entre sí en condiciones rigurosas. En realizaciones representativas, dos secuencias de nucleótidos que se consideran sustancialmente idénticas se hibridan entre sí en condiciones muy rigurosas.

[00141] Las expresiones "condiciones rigurosas" o "condiciones de hibridación rigurosas" incluyen la referencia a condiciones en las cuales un ácido nucleico se hibridará selectivamente con una secuencia diana, en un grado detectablemente mayor que con otras secuencias (por ejemplo, al menos 2 veces con respecto a una secuencia no diana) y de manera opcional puede excluir sustancialmente la unión a las secuencias que no son diana. Las condiciones rigurosas dependen de la secuencia y variarán en circunstancias diferentes. Controlando la rigurosidad de las condiciones de hibridación y/o de lavado, se pueden identificar secuencias diana que pueden presentar hasta un 100% de complementariedad respecto a la secuencia de nucleótidos de referencia. Como alternativa, se pueden emplear condiciones de rigurosidad moderada o incluso baja para permitir ciertas discrepancias en las secuencias de forma que se detecten grados de similitud secuencial menores. Por ejemplo, los expertos en la técnica apreciarán que para actuar como un cebador o sonda, una secuencia de ácido nucleico únicamente necesita ser lo suficientemente complementaria con la secuencia diana para unirse sustancialmente a esta de modo que forme una estructura bicatenaria estable en las condiciones empleadas. Por lo tanto, se pueden utilizar cebadores o sondas en condiciones de rigurosidad elevada, moderada o incluso baja.

Asimismo, las condiciones de rigurosidad baja o moderada pueden ser convenientes para detectar secuencias homólogas, ortólogas y/o parálogas que tienen grados menores de identidad secuencial de los que se hubieran identificado en condiciones muy rigurosas.

[00142] Los términos "complementario" o "complementariedad" (y términos similares), tal como se utilizan en la presente, se refieren a la unión natural de los polinucleótidos mediante el apareamiento de bases en condiciones permisivas de temperatura y sales. Por ejemplo, la secuencia "A-G-T" se une a la secuencia complementaria "T-C-A". La complementariedad entre dos moléculas monocatenarias puede ser parcial, donde únicamente algunos de los nucleótidos se unen, o puede ser completa cuando existe una complementariedad total entre las moléculas monocatenarias. El grado de complementariedad entre las hebras de ácidos nucleicos tiene efectos significativos sobre la eficacia y fuerza de hibridación entre las moléculas. Como se utiliza en la presente, el término "sustancialmente complementario" (y términos similares) significa que dos secuencias de ácidos nucleicos son complementarias en al menos aproximadamente un 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más. Como alternativa, la expresión "sustancialmente complementario" (y expresiones similares) puede significar que dos secuencias de ácidos nucleicos se pueden hibridar entre sí en condiciones de rigurosidad elevada (tal como se describe en la presente).

[00143] Tal como se utiliza en la presente, que se hibrida "específicamente" o "selectivamente" (y expresiones similares) se refiere a la unión, formación de dúplex o

hibridación de una molécula con una secuencia diana de ácido nucleico particular en condiciones rigurosas cuando la secuencia está presente en una mezcla compleja (por ejemplo, ADN o ARN celular total) con la exclusión sustancial de los ácidos nucleicos que no son diana, o incluso con ausencia de unión, formación de dúplex o hibridación detectable con las secuencias que no son diana. Las secuencias que se hibridan específica o selectivamente que son, de manera habitual, complementarias en al menos aproximadamente un 40% y son, de manera opcional, sustancialmente complementarias o incluso completamente complementarias (es decir, idénticas en un 100%).

[00144] Para híbridos ADN-ADN, se puede aproximar la T_m a partir de la ecuación de Meinkoth y Wahl, *Anal. Biochem.*, 138:267-84 (1984): $T_m = 81.5\text{ }^{\circ}\text{C} + 16.6 (\log M) + 0.41 (\% \text{ de GC}) - 0.61 (\% \text{ de formamida}) - 500/L$; donde M es la molaridad de cationes monovalentes, % de GC es el porcentaje de nucleótidos de guanosina y citosina en el ADN, % de formamida es el porcentaje de formamida en la solución de hibridación y L es la longitud del híbrido en pares de bases. La T_m es la temperatura (a un pH y una fuerza iónica definidos) a la que un 50% de una secuencia diana complementaria se hibrida con una sonda perfectamente coincidente. La T_m se reduce en aproximadamente 1 $^{\circ}\text{C}$ por cada 1% de discrepancias; por lo tanto, la T_m y las condiciones de hibridación y/o lavado se pueden ajustar para que se hibriden con secuencias con el grado de identidad deseado. Por ejemplo, si se buscan secuencias con >90% de identidad, la T_m se puede reducir 10 $^{\circ}\text{C}$. En general, se seleccionan condiciones rigurosas para que sean aproximadamente 5 $^{\circ}\text{C}$ inferiores que el

punto de fusión térmico (T_m) para la secuencia específica y su complemento a una fuerza iónica y pH definidos. Sin embargo, las condiciones muy rigurosas pueden emplear una hibridación y/o un lavado en el punto de fusión térmica (T_m) o 1, 2, 3 o 4 °C por debajo del punto de fusión térmica (T_m); las condiciones de rigurosidad moderada pueden utilizar una hibridación y/o un lavado 6, 7, 8, 9 o 10 °C por debajo del punto de fusión térmica (T_m); las condiciones de rigurosidad baja pueden emplear una hibridación y/o un lavado 11, 12, 13, 14, 15 o 20 °C por debajo del punto de fusión térmica (T_m). Si el grado deseado de emparejamiento erróneo resulta en una T_m menor que 45°C (solución acuosa) o 32°C (solución de formamida), opcionalmente se puede incrementar la concentración de SSC, de modo que se puede utilizar una temperatura más elevada. Se puede consultar una guía exhaustiva sobre la hibridación de ácidos nucleicos en Tijssen, *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology—Hybridization with Nucleic Acid Probes*, parte I, capítulo 2, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays", Elsevier, Nueva York (1993); y en *Current Protocols in Molecular Biology*, capítulo 2, Ausubel et al., eds., Greene Publishing and Wiley-Interscience, Nueva York (1995); y Green y Sambrook, en: *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 4.^a edición, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2012).

[00145] Normalmente, las condiciones rigurosas son aquellas en las que la concentración salina es inferior a aproximadamente 1.5 M para el ion Na, normalmente una concentración de aproximadamente 0.01 a 1.0 M para el ion Na (u otras sales) de aproximadamente un pH de 7.0 a un pH de

8.3, y la temperatura es de al menos aproximadamente 30 °C para sondas cortas (por ejemplo, de 10 a 50 nucleótidos) y de al menos aproximadamente 60 °C para sondas largas (por ejemplo, de más de 50 nucleótidos). Las condiciones rigurosas también se pueden lograr mediante la adición de agentes desestabilizantes tales como formamida o Denhardt's (5 g de Ficoll, 5 g de polivinilpirrolidona, 5 g de albúmina sérica bovina en 500 mL de agua). Las condiciones ilustrativas de rigurosidad baja incluyen la hibridación con una solución de tampón de un 30% a un 35% de formamida, NaCl 1 M, 1% de SDS (dodecilsulfato sódico) a 37 °C y un lavado en 1X-2X SSC (20X SSC = NaCl 3.0 M/citrato trisódico 0.3 M) a 50 °C-55 °C. Las condiciones ilustrativas de rigurosidad moderada incluyen la hibridación en un 40% a 45% de formamida, NaCl 1 M, 1% de SDS a 37 °C y un lavado en 0.5X-1X SSC a 55 °C-60 °C. Las condiciones ilustrativas de rigurosidad elevada incluyen la hibridación en un 50% de formamida, NaCl 1 M, 1% de SDS a 37 °C y un lavado en 0.1X SSC a 60 °C-65 °C. Un ejemplo adicional no limitante de condiciones de rigurosidad elevada incluye la hibridación en 4X SSC, 5X solución de Denhardt, 0.1 mg/mL de ADN de esperma de salmón hervido, y fosfato de Na 25 mM a 65 °C y un lavado en 0.1X SSC, 0.1% de SDS a 65 °C. Otro ejemplo de condiciones de hibridación de rigurosidad elevada incluye la hibridación en 7% de SDS, NaPO₄ 0.5 M, EDTA 1 mM a 50 °C con un lavado en 2X SSC, 0.1% de SDS a 50 °C, de manera alternativa con un lavado en 1X SSC, 0.1% de SDS a 50 °C, de manera alternativa con un lavado en 0.5X SSC, 0.1% de SDS a 50 °C, o de manera alternativa con un lavado en 0.1X SSC, 0.1% de SDS a 50 °C, o incluso con un lavado en 0.1X SSC, 0.1% de SDS a 65°C. Los expertos en la técnica

apreciarán que la especificidad normalmente es una función de los lavados post-hibridación, siendo factores relevantes la fuerza iónica y la temperatura de la solución de lavado final.

[00146] Los ácidos nucleicos que no se hibridan entre sí en condiciones rigurosas siguen siendo sustancialmente idénticos si las proteínas que estos codifican son sustancialmente idénticas (por ejemplo, debido a la degeneración del código genético).

[00147] Una indicación adicional de que dos ácidos nucleicos o proteínas son sustancialmente idénticos es que la proteína codificada por el primer ácido nucleico presente reactividad cruzada inmunológicamente con la proteína codificada por el segundo ácido nucleico. Por lo tanto, normalmente una proteína es sustancialmente idéntica a una segunda proteína, por ejemplo, si las dos proteínas se diferencian únicamente por sustituciones conservadoras.

[00148] Tal como se utiliza en la presente, si un polipéptido o fragmento modificado (y similares) "mantiene sustancialmente" la actividad insecticida, significa que el polipéptido o fragmento modificado mantiene al menos aproximadamente un 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95% o incluso un 100% de la actividad insecticida de la proteína de referencia, o tiene incluso una actividad insecticida mayor.

[00149] "Sintético" se refiere a una secuencia de nucleótidos que comprende bases o una o más características estructurales que no se encuentran presentes en la secuencia natural. Por ejemplo, se dice que una secuencia artificial que codifica una proteína de la invención que se parece más

al contenido G+C y la distribución normal de codones de genes de plantas dicotiledóneas o monocotiledóneas es sintética.

[00150] Tal como se utiliza en la presente, una proteína que es "tóxica" para una plaga de insectos es un agente de control de insectos activo por vía oral que aniquila a la plaga de insectos, provoca una reducción en el crecimiento y/o reproducción de la plaga de insectos y/o es capaz de alterar o impedir la alimentación de los insectos, pudiendo causar o no estos dos últimos la muerte del insecto. Cuando una proteína de la invención se suministra a un insecto o un insecto entra en contacto con la proteína, el resultado es normalmente la muerte del insecto, el crecimiento y/o la reproducción del insecto se ralentiza y/o el insecto reduce o cesa de alimentarse de la fuente que hace que la proteína tóxica esté disponible para el insecto.

[00151] Las expresiones "fragmento de toxina" y "porción de toxina" se utilizan indistintamente en la presente para referirse a un fragmento o porción de una proteína insecticida quimérica más larga (por ejemplo, completa) de la invención, donde el "fragmento de toxina" o "la porción de toxina" mantiene la actividad insecticida. Por ejemplo, en la técnica se sabe que las proteínas Cry nativas se expresan como protoxinas que son procesadas en los extremos N-terminal y C-terminal para producir una toxina madura. En las realizaciones, el "fragmento de toxina" o "porción de toxina" de una proteína insecticida quimérica de la invención está truncado en el extremo N y/o el extremo C. En las realizaciones, el "fragmento de toxina" o "porción de toxina" se trunca en el extremo N para eliminar parte o la totalidad del fragmento peptídico N-terminal y,

opcionalmente, comprende al menos aproximadamente 400, 425, 450, 475, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580 o 590 aminoácidos contiguos de la proteína insecticida quimérica descrita específicamente en la presente o una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente idéntica a esta. Por lo tanto, en las realizaciones, un "fragmento de toxina" o "porción de toxina" de una proteína insecticida quimérica está truncado en el extremo N (por ejemplo, para omitir parte o la totalidad del fragmento peptídico), por ejemplo, un truncamiento N-terminal de un aminoácido o más de un aminoácido, por ejemplo, de hasta 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60 o más aminoácidos. En las realizaciones, un "fragmento de toxina" o "porción de toxina" de una proteína insecticida quimérica está truncado en el extremo C (por ejemplo, para omitir parte o la totalidad de la cola protoxina), por ejemplo, un truncamiento C-terminal de un aminoácido o más de un aminoácido, por ejemplo, de hasta 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 70, 80, 90, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 525, 550, 560 o más aminoácidos. En las realizaciones, el "fragmento de toxina" o "porción de toxina" comprende los dominios 1 y 2, y el dominio nuclear III (por ejemplo, tal como se muestra en la Figura 2). En las realizaciones, el "fragmento de toxina" o "porción de toxina"

es la toxina madura (es decir, procesada) (por ejemplo, toxina Cry).

[00152] La "transformación" es un proceso para introducir un ácido nucleico heterólogo en una célula u organismo hospedador. En realizaciones particulares, la "transformación" se refiere a la integración estable de una molécula de ADN en el genoma de un organismo de interés (por ejemplo, una célula vegetal).

[00153] Los términos "transformado" y "transgénico", tal como se utilizan en la presente, se refieren a un organismo hospedador, tal como una bacteria o una planta, en el que se ha introducido una molécula de ácido nucleico heteróloga. La molécula de ácido nucleico se puede integrar de forma estable en el genoma del hospedador o la molécula de ácido nucleico también puede estar presente como una molécula extracromosómica. Una molécula extracromosómica de este tipo puede autorreplicarse. Se comprenderá que las células, los tejidos o las plantas "transformados" o "transgénicos" no abarcan únicamente el producto final de un proceso de transformación, sino también la progenie de este que comprenda la molécula de ácido nucleico heteróloga. Un hospedador "no transformado" o "no transgénico" se refiere a un organismo natural, por ejemplo, una bacteria o planta, que no contiene la molécula de ácido nucleico heteróloga.

[00154] El término "vector" se refiere a una composición para transferir, suministrar o introducir un ácido nucleico (o ácidos nucleicos) en una célula. Un vector comprende una molécula de ácido nucleico que comprende la o las secuencias de nucleótidos que se han de transferir, suministrar o introducir.

Proteínas Insecticidas Quiméricas.

[00155] La presente invención proporciona proteínas insecticidas quiméricas novedosas que comprenden al menos una región de una primera proteína Cry (por ejemplo, una proteína BT-0029 [SEQ ID NO: 2] y variantes sustancialmente idénticas de esta). En las realizaciones, la invención proporciona una proteína insecticida quimérica que comprende una región entre dos o más proteínas Cry diferentes. En las realizaciones, la proteína insecticida quimérica resultante tiene una mayor actividad contra una o más plagas de insectos (por ejemplo, una actividad potenciada o actividad contra una nueva plaga diana) y/o un modo de acción diferente contra una o más plagas de insectos en comparación con una o más (o incluso todas) de las proteínas progenitoras. En realizaciones representativas, la proteína insecticida quimérica es una quimera que comprende regiones de dos proteínas Cry diferentes (por ejemplo, Cry1) y la quimera tiene una mayor actividad insecticida contra una o más plagas de insectos en comparación con ambas proteínas progenitoras.

[00156] En las realizaciones, las proteínas insecticidas quiméricas de la invención pueden proporcionar nuevos modos de acción contra una o más plagas de insectos dianas. Por ejemplo, la proteína insecticida quimérica puede tener actividad insecticida contra una colonia o plaga de insectos que por lo general es resistente a la actividad insecticida de otro agente (por ejemplo, una proteína insecticida, incluida, sin carácter limitante, una proteína Bt, tal como una proteína Cry o una proteína Vip). En las realizaciones, las propias proteínas progenitoras no son activas, o son tan solo débilmente activas, como insecticidas

contra una colonia o plaga de insectos resistente, lo que puede sugerir que la quimera tiene un modo de acción novedoso en comparación con las proteínas progenitoras. Por ejemplo, si las proteínas progenitoras son activas contra una plaga de insectos diana ("susceptible"), pero no contra un homólogo resistente, y la proteína insecticida quimérica es activa contra la plaga de insectos resistentes, esto es una indicación de que la proteína insecticida quimérica es tóxica para la plaga resistente mediante un modo de acción novedoso.

[00157] En consecuencia, en las realizaciones, la invención proporciona una proteína insecticida quimérica que es tóxica para una plaga de insectos (por ejemplo, una plaga de insectos lepidópteros), comprendiendo la proteína insecticida quimérica una región de una proteína BT-0029 (SEQ ID NO: 2) o un polipéptido que es sustancialmente idéntico a la región de una proteína BT-0029. En las realizaciones, la proteína insecticida quimérica comprende una región N-terminal de una primera proteína Cry1, que es opcionalmente una proteína BT-0029 (SEQ ID NO: 2) o un polipéptido de comprende una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente idéntica a la región N-terminal de la proteína BT-0029. En las realizaciones, la región N-terminal de la primera proteína Cry está fusionada a una región C-terminal de una proteína Cry diferente (por ejemplo, una proteína Cry1 diferente) para formar una proteína insecticida quimérica (por ejemplo, una proteína Cry insecticida quimérica).

[00158] En realizaciones representativas, la región C-terminal de una proteína Cry diferente puede ser una región C-terminal de una proteína Cry1 diferente o un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es

sustancialmente idéntica a la región C-terminal de la proteína Cry1 diferente.

[00159] De este modo, en una realización representativa, una proteína insecticida quimérica de la invención comprende, está constituida esencialmente por, o está constituida por, en una dirección de N-terminal a C-terminal: (a) una región N-terminal de una primera proteína Cry (por ejemplo, una proteína Cry1), que es opcionalmente una región N-terminal de una proteína BT-0029 o una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente idéntica a la región N-terminal de la proteína BT-0029, fusionada a (b) una región C-terminal de una proteína Cry diferente (por ejemplo, una proteína Cry1 diferente).

[00160] En realizaciones representativas, la proteína Cry diferente (por ejemplo, proteína Cry1) se selecciona en función de una alineación de la región C-terminal de la proteína Cry diferente y la región correspondiente de la primera proteína Cry (por ejemplo, una proteína Cry1), por ejemplo, remítase a las alineaciones ejemplares de las Figuras 1A y 1B. En las realizaciones, la proteína Cry diferente se selecciona de manera que la secuencia de aminoácidos de la región C-terminal de la proteína Cry diferente sea sustancialmente idéntica a la región correspondiente de la primera proteína Cry. En realizaciones ejemplares, la secuencia de aminoácidos de la región C-terminal de la proteína Cry diferente (por ejemplo, la proteína Cry1) es al menos aproximadamente un 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más idéntica con una secuencia de aminoácidos de la región C-terminal correspondiente de la primera proteína Cry. Los

expertos en la técnica están muy familiarizados con los métodos de alineación y determinación de la identidad secuencial de aminoácidos a lo largo de una región alineada.

[00161] En las realizaciones, la proteína Cry1 diferente incluye, sin limitación, una proteína Cry1F (por ejemplo, una proteína Cry1Fa o una proteína Cry1Fb), una proteína Cry1G (por ejemplo, una proteína Cry1Ga, una proteína Cry1Gb, o una proteína Cry1Gc), una proteína Cry1I (por ejemplo, una proteína Cry1Ia, una proteína Cry1Ib, una proteína Cry1Ic, una proteína Cry1Id, una proteína Cry1Ie, una proteína Cry1If, o una proteína Cry1Ig), una proteína Cry1K (por ejemplo, una proteína Cry1Ka), o una proteína Cry1C (por ejemplo, una proteína Cry1Ca). En las realizaciones, la proteína Cry1 diferente es una proteína Cry1If, opcionalmente una proteína BT-0022 (SEQ ID NO: 1). En las realizaciones, una proteína Cry1 diferente es una proteína Cry1Fa (SEQ ID NO: 8). En las realizaciones, una proteína Cry1 diferente es una proteína Cry1K (SEQ ID NO: 12). En las realizaciones, una proteína Cry1 diferente es una proteína Cry1Ca (SEQ ID NO: 17).

[00162] Las expresiones "región N-terminal" y una "región C-terminal" no indica necesariamente que los aminoácidos más N-terminales o C-terminales (por ejemplo, el extremo N o el extremo C), respectivamente, de la proteína completa están incluidos en la región. Por ejemplo, es sobradamente conocido por los expertos en la técnica que las protoxinas Cry son procesadas tanto en el extremo N como en el extremo C para producir una toxina madura (es decir, procesada). De este modo, en las realizaciones, la "región N-terminal" y/o la "región C-terminal" omiten parte o la

totalidad de las porciones eliminadas en el procesamiento de la protoxina de manera que la proteína insecticida quimérica comprende la proteína toxina madura (por ejemplo, los Dominios, I, II y III de la proteína Cry) sin parte o la totalidad del fragmento peptidilo N-terminal y/o la cola de la protoxina C-terminal, o un polipéptido que es sustancialmente idéntico a la proteína toxina madura. En las realizaciones, la proteína insecticida quimérica comprende el fragmento peptidilo y/o la cola de la protoxina. En las realizaciones, la proteína insecticida quimérica no comprende el fragmento peptidilo o la cola de la protoxina, es decir, corresponde a la toxina procesada madura.

[00163] En las realizaciones, la región N-terminal de la primera proteína Cry1 comprende, consiste esencialmente, o consiste en un polipéptido correspondiente a una secuencia de aminoácidos desde aproximadamente la posición 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o 40 a aproximadamente la posición 430, 431, 432, 433, 434, 435, 436, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 444, 445, 446, 447, 448, 449, 450, 451, 452, 453, 454, 455, 456, 457, 458, 459, 460, 461, 462, 463, 464, 465, 466, 467, 468, 469, 470, 471, 472, 473, 474, 475, 476, 477, 478, 479, 480, 481, 482, 483, 484, 485, 486, 487, 488, 489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499 o 500 de la SEQ ID NO: 2 (BT-0029 completa) y cualquier combinación de las posiciones inferior y superior si cada una de tales combinaciones se expusiera específicamente en la presente.

[00164] En las realizaciones, la región N-terminal de la primera proteína Cry1 comprende, consiste esencialmente, o

consiste en un polipéptido correspondiente a una secuencia de aminoácidos desde aproximadamente la posición 1 a

aproximadamente la posición 430, 431, 432, 433, 434, 435, 436, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 444, 445, 446, 447, 448, 449, 450, 451, 452, 453, 454, 455, 456, 457, 458, 459, 460, 461, 462, 463, 464, 465, 466, 467, 468, 469, 470, 471, 472, 473, 474, 475, 476, 477, 478, 479, 480, 481, 482, 483, 484, 485, 486, 487, 488, 489, 490 o 491 de la SEQ ID NO: 2.

[00165] En una realización representativa, la región N-terminal de la primera proteína Cry1 comprende, consiste esencialmente en, o consiste en una secuencia de aminoácidos que corresponde a una secuencia de aminoácidos desde aproximadamente la posición 1 hasta aproximadamente la posición aminoacídica 458 de la SEQ ID NO: 2.

[00166] En realizaciones representativas, la región C-terminal de la segunda proteína Cry1 comprende, consiste esencialmente, o consiste en un polipéptido correspondiente a una secuencia de aminoácidos desde aproximadamente la posición 435, 436, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 444, 445, 446, 447, 448, 449, 450, 451, 452, 453, 454, 455, 456, 457, 458, 449, 450, 451, 452, 453, 454, 455, 456, 457, 458, 459, 460, 461, 462, 463, 464, 465, 466, 467, 468, 469, 470, 471, 472, 473, 474, 475, 476, 477, 478, 479, 480, 481, 482, 483, 484, 485, 486, 487, 488, 489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499 o 500 a aproximadamente la posición 580, 581, 582, 583, 584, 585, 586, 587, 588, 589, 590, 591, 592, 593, 594, 595, 596, 587, 598, 599, 600, 601, 602, 603, 604, 605, 606, 607, 608, 609, 610, 611, 612, 613, 614, 615, 616, 617, 618, 619 o 620 de la SEQ ID NO: 8 (Cry1Fa completa) y cualquier combinación de las posiciones inferior y superior

si cada una de tales combinaciones se expusiera específicamente en la presente.

[00167] En las realizaciones, la región C-terminal de la segunda proteína Cry1 comprende, consiste esencialmente en, o consiste en un polipéptido que corresponde a una secuencia de aminoácidos desde aproximadamente la posición 464 hasta aproximadamente la posición 580, 581, 582, 583, 584, 585, 586, 587, 588, 589, 590, 591, 592, 593, 594, 595, 596, 587, 598, 599, 600, 601, 602, 603, 604, 605, 606, 607, 608, 609, 610, 611, 612, 613, 614, 615, 616, 617, 618, 619 o 620 de la SEQ ID NO: 8.

[00168] En las realizaciones, la región C-terminal de la segunda proteína Cry1 comprende, consiste esencialmente en, o consiste en un polipéptido que corresponde a una secuencia de aminoácidos desde aproximadamente la posición 435, 436, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 444, 445, 446, 447, 448, 449, 450, 451, 452, 453, 454, 455, 456, 457, 458, 449, 450, 451, 452, 453, 454, 455, 456, 457, 458, 459, 460, 461, 462, 463, 464, 465, 466, 467, 468, 469, 470, 471, 472, 473, 474, 475, 476, 477, 478, 479, 480, 481, 482, 483, 484, 485, 486, 487, 488, 489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499 o 500 hasta aproximadamente la posición 602 de la SEQ ID NO: 8.

[00169] En las realizaciones, la región C-terminal de la segunda proteína Cry1 comprende, consiste esencialmente en, o consiste en un polipéptido que corresponde a una secuencia de aminoácidos desde aproximadamente la posición 464 hasta aproximadamente la posición 602 de la SEQ ID NO: 8.

[00170] En realizaciones representativas, la región C-terminal de la segunda proteína Cry1 comprende, consiste

esencialmente, o consiste en un polipéptido correspondiente a una secuencia de aminoácidos desde aproximadamente la posición 470, 471, 472, 473, 474, 475, 476, 477, 478, 479, 480, 481, 482, 483, 484, 485, 486, 487, 488, 489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499, 500, 501, 502, 503, 504, 505, 506, 507, 508, 509, 510, 511, 512, 513, 514, 515, 516, 517, 518, 519, 520, 521, 522, 523, 524, 525, 526, 527, 528, 529, 530, 531, 532, 533, 534, o 535 a aproximadamente la posición 615, 616, 617, 618, 619, 620, 621, 622, 623, 624, 625, 626, 627, 628, 629, 630, 631, 632, 633, 634, 635, 636, 637, 638, 639, 640, 641, 642, 643, 644, 645, 646, 647, 648, 649, 650, 651, 652, 653, 654 o 655 de la SEQ ID NO: 1 (BT-0022 completa) y cualquier combinación de las posiciones inferior y superior si cada una de tales combinaciones se expusiera específicamente en la presente.

[00171] En las realizaciones, la región C-terminal de la segunda proteína Cry1 comprende, consiste esencialmente en, o consiste en un polipéptido que corresponde a una secuencia de aminoácidos desde aproximadamente la posición 498 hasta aproximadamente la posición 615, 616, 617, 618, 619, 620, 621, 622, 623, 624, 625, 626, 627, 628, 629, 630, 631, 632, 633, 634, 635, 636, 637, 638, 639, 640, 641, 642, 643, 644, 645, 646, 647, 648, 649, 650, 651, 652, 653, 654 o 655 de la SEQ ID NO: 1.

[00172] En las realizaciones, la región C-terminal de la segunda proteína Cry1 comprende, consiste esencialmente en, o consiste en un polipéptido que corresponde a una secuencia de aminoácidos desde aproximadamente la posición 470, 471, 472, 473, 474, 475, 476, 477, 478, 479, 480, 481, 482, 483, 484, 485, 486, 487, 488, 489, 490, 491, 492, 493,

494, 495, 496, 497, 498, 499, 500, 501, 502, 503, 504, 505, 506, 507, 508, 509, 510, 511, 512, 513, 514, 515, 516, 517, 518, 519, 520, 521, 522, 523, 524, 525, 526, 527, 528, 529, 530, 531, 532, 533, 534, o 535 hasta aproximadamente la posición 636 de la SEQ ID NO: 1.

[00173] En las realizaciones, la región C-terminal de la segunda proteína Cry1 comprende, consiste esencialmente en, o consiste en un polipéptido que corresponde a una secuencia de aminoácidos desde aproximadamente la posición 498 hasta aproximadamente la posición 636 de la SEQ ID NO: 1.

[00174] En realizaciones representativas, la región C-terminal de la segunda proteína Cry1 comprende, consiste esencialmente, o consiste en un polipéptido correspondiente a una secuencia de aminoácidos desde aproximadamente la posición 472, 473, 474, 475, 476, 477, 478, 479, 480, 481, 482, 483, 484, 485, 486, 487, 488, 489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499, 500, 501, 502, 503, 504, 505, 506, 507, 508, 509, 510, 511, 512, 513, 514, 515, 516, 517, 518, 519, 520, 521, 522, 523, 524, 525, 526, 527, 528, 529, 530, 531, 532, 533, 534, 535, 536 o 537 a aproximadamente la posición 590, 591, 592, 593, 594, 595, 596, 597, 598, 599, 600, 601, 602, 603, 604, 605, 606, 607, 608, 609, 610, 611, 612, 613, 614, 615, 616, 617, 618, 619, 620, 621, 622, 623, 624, 625, 626, 627, 628, 629, 630, 631, 632, 633, 634, 635, 636, 637, 638, 639, 640, 641, 642, 643, 644, 645, 646, 647, 648, 649, 650, 651, 652, 653, 654, 655, 656 o 657 de la SEQ ID NO: 12 (Cry1Ka completa) y cualquier combinación de las posiciones inferior y superior si cada una de tales combinaciones se expusiera específicamente en la presente.

[00175] En las realizaciones, la región C-terminal de la segunda proteína Cry1 comprende, consiste esencialmente en, o consiste en un polipéptido que corresponde a una secuencia de aminoácidos desde aproximadamente la posición 500 hasta aproximadamente la posición 590, 591, 592, 593, 594, 595, 596, 597, 598, 599, 600, 601, 602, 603, 604, 605, 606, 607, 608, 609, 610, 611, 612, 613, 614, 615, 616, 617, 618, 619, 620, 621, 622, 623, 624, 625, 626, 627, 628, 629, 630, 631, 632, 633, 634, 635, 636, 637, 638, 639, 640, 641, 642, 643, 644, 645, 646, 647, 648, 649, 650, 651, 652, 653, 654, 655, 656 o 657 de la SEQ ID NO: 12.

[00176] En las realizaciones, la región C-terminal de la segunda proteína Cry1 comprende, consiste esencialmente en, o consiste en un polipéptido que corresponde a una secuencia de aminoácidos desde aproximadamente la posición 472, 473, 474, 475, 476, 477, 478, 479, 480, 481, 482, 483, 484, 485, 486, 487, 488, 489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499, 500, 501, 502, 503, 504, 505, 506, 507, 508, 509, 510, 511, 512, 513, 514, 515, 516, 517, 518, 519, 520, 521, 522, 523, 524, 525, 526, 527, 528, 529, 530, 531, 532, 533, 534, 535, 536, 537 hasta aproximadamente la posición 597 de la SEQ ID NO: 12.

[00177] En las realizaciones, la región C-terminal de la segunda proteína Cry1 comprende, consiste esencialmente en, o consiste en un polipéptido que corresponde a una secuencia de aminoácidos desde aproximadamente la posición 472, 473, 474, 475, 476, 477, 478, 479, 480, 481, 482, 483, 484, 485, 486, 487, 488, 489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499, 500, 501, 502, 503, 504, 505, 506, 507, 508, 509, 510, 511, 512, 513, 514, 515, 516, 517, 518, 519,

520, 521, 522, 523, 524, 525, 526, 527, 528, 529, 530, 531, 532, 533, 534, 535, 536, 537 hasta aproximadamente la posición 610 de la SEQ ID NO: 12.

[00178] En las realizaciones, la región C-terminal de la segunda proteína Cry1 comprende, consiste esencialmente en, o consiste en un polipéptido que corresponde a una secuencia de aminoácidos desde aproximadamente la posición 500 hasta aproximadamente la posición 597 de la SEQ ID NO: 12.

[00179] En las realizaciones, la región C-terminal de la segunda proteína Cry1 comprende, consiste esencialmente en, o consiste en un polipéptido que corresponde a una secuencia de aminoácidos desde aproximadamente la posición 500 hasta aproximadamente la posición 610 de la SEQ ID NO: 12.

[00180] En realizaciones representativas, la región C-terminal de la segunda proteína Cry1 comprende, consiste esencialmente, o consiste en un polipéptido correspondiente a una secuencia de aminoácidos desde aproximadamente la posición 435, 436, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 444, 445, 446, 447, 448, 449, 450, 451, 452, 453, 454, 455, 456, 457, 458, 449, 450, 451, 452, 453, 454, 455, 456, 457, 458, 459, 460, 461, 462, 463, 464, 465, 466 o 467 a aproximadamente la posición 580, 581, 582, 583, 584, 585, 586, 587, 588, 589, 590, 591, 592, 593, 594, 595, 596, 597, 598, 599, 600, 601, 602, 603, 604, 605, 606, 607, 608, 609, 610, 611, 612, 613, 614, 615, 616 o 617 de la SEQ ID NO: 17 (Cry1Ca completa) y cualquier combinación de las posiciones inferior y superior si cada una de tales combinaciones se expusiera específicamente en la presente.

[00181] En las realizaciones, la región C-terminal de la segunda proteína Cry1 comprende, consiste esencialmente en, o consiste en un polipéptido que corresponde a una secuencia de aminoácidos desde aproximadamente la posición 467 hasta aproximadamente la posición 580, 581, 582, 583, 584, 585, 586, 587, 588, 589, 590, 591, 592, 593, 594, 595, 596, 597, 598, 599, 600, 601, 602, 603, 604, 605, 606, 607, 608, 609, 610, 611, 612, 613, 614, 615, 616 o 617 de la SEQ ID NO: 17.

[00182] En las realizaciones, la región C-terminal de la segunda proteína Cry1 comprende, consiste esencialmente en, o consiste en un polipéptido que corresponde a una secuencia de aminoácidos desde aproximadamente la posición 435, 436, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 444, 445, 446, 447, 448, 449, 450, 451, 452, 453, 454, 455, 456, 457, 458, 449, 450, 451, 452, 453, 454, 455, 456, 457, 458, 459, 460, 461, 462, 463, 464, 465, 466 o 467 hasta aproximadamente la posición 617 de la SEQ ID NO: 17.

[00183] En las realizaciones, la región C-terminal de la segunda proteína Cry1 comprende, consiste esencialmente en, o consiste en un polipéptido que corresponde a una secuencia de aminoácidos desde aproximadamente la posición 467 hasta aproximadamente la posición 617 de la SEQ ID NO: 17.

[00184] Como se sabe en la técnica, las proteínas Cry de *Bt* tienen 5 dominios de secuencia conservada (Bloque Conservado [CB] 1 a 5) separados por regiones más variables (Hofte y Whitely, 1989, *Microbiol. Rev.* 53:242-255), y tres dominios estructurales conservados (Dominios I, II y III) (de Maagd et al., 2001, *Trends Genetics* 17:193-199). Las Figuras

1A y 1B muestran una alineación de las proteínas Cry BT-0029, BT-0022, Cry1Fa y Cry1Ka, con CB3 y el Dominio III indicados. Los expertos en la técnica pueden utilizar la secuencia muy conocida y la información estructural disponible para las proteínas Cry con el fin de crear una proteína Cry insecticida quimérica de acuerdo con la invención, por ejemplo, para seleccionar una o más regiones de entrecruzamiento entre dos proteínas Cry. En las realizaciones, una región de entrecruzamiento está ubicada dentro de un bloque conservado, por ejemplo, dentro de CB3. La expresión "dentro de un bloque conservado" incluye las posiciones en cada extremo del bloque conservado. A efectos ilustrativos, la expresión "dentro de CB3" incluye la posición justo antes (por ejemplo, entre los residuos de metionina y fenilalanina dentro de la secuencia VPMFSW en la secuencia de BT-0029 de la Figura 2A) y justo después (por ejemplo, entre los residuos de treonina y asparagina dentro de la secuencia RRTNVG en la secuencia de BT-0029 de la Figura 2A) del bloque conservado 3. Las Figuras 2A y 2B muestran proteínas insecticidas quiméricas ejemplares de acuerdo con la invención con una región de entrecruzamiento dentro de CB3.

[00185] Con referencia a la Figura 2A, en las realizaciones, un entrecruzamiento se ubica en una posición que corresponde a una posición justo antes del residuo aminoacídico 1 o justo después del residuo aminoacídico 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50 o 51, o cualquier combinación de estos, en CB3. En las

realizaciones, un entrecruzamiento se ubica dentro de una región (incluidos los residuos en cada extremo de la región) que corresponde del residuo aminoacídico 2 al residuo aminoacídico 7, 8, 9 o 10 de CB3, dentro de una región que corresponde del residuo aminoacídico 11 al residuo aminoacídico 14, 15, 16, 17 o 18 de CB3, dentro de una región que corresponde del residuo aminoacídico 19 al residuo aminoacídico 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 o 36 de CB3 y/o dentro de una región que corresponde del residuo aminoacídico 37, 38 o 39 al residuo aminoacídico 51, y cualquier combinación de dichas regiones. En realizaciones representativas, un entrecruzamiento está ubicado en una posición dentro de una región que corresponde del residuo aminoacídico 19 al residuo aminoacídico 51, del residuo aminoacídico 19 al residuo aminoacídico 33, del residuo aminoacídico 19 al residuo aminoacídico 28, del residuo aminoacídico 19 al residuo aminoacídico 27 o del residuo aminoacídico 19 al residuo aminoacídico 26 en CB3. En las realizaciones, una posición de entrecruzamiento está ubicada en el sitio específico entre el residuo aminoacídico 18 y el residuo aminoacídico 19 en CB3 (por ejemplo, específicamente entre la valina y la isoleucina en la secuencia DPDVITQ en BT-0029, SEQ ID NO: 2).

[00186] Las proteínas insecticidas quiméricas también se pueden definir con respecto a los dominios estructurales derivados de cada una de las moléculas progenitoras. Por ejemplo, en las realizaciones, la región N-terminal de la primera proteína Cry comprende el dominio I de la primera proteína Cry y todo o esencialmente todo el dominio II. En las realizaciones, la región C-terminal de la proteína Cry

diferente comprende todo o esencialmente todo el dominio III de la proteína Cry diferente. Los expertos en la técnica comprenderán que existe una cierta variabilidad para definir la ubicación exacta de los extremos de los dominios estructurales de la proteína Cry y las regiones conectoras entre los dominios, por ejemplo, la ubicación del extremo de la región conectora entre los dominios II y III y el comienzo del dominio III, aunque el núcleo del dominio III es fácilmente identificable por los expertos en la técnica (por ejemplo, que corresponde a la ubicación del dominio nuclear III tal como se muestra en la Figura 1A y la Figura 2A). En las realizaciones, el entrecruzamiento entre la región N-terminal de la primera proteína Cry y la región C-terminal derivada de la proteína Cry diferente se ubica en CB3.

[00187] En realizaciones representativas, la región C-terminal de la proteína Cry diferente (por ejemplo, la proteína Cry1) se selecciona en función de la alineación del dominio III (por ejemplo, un dominio nuclear III tal como se muestra en la Figura 1A) de la proteína Cry diferente y la secuencia del dominio III correspondiente de la primera proteína Cry (por ejemplo, una proteína Cry1, tal como BT-0029), por ejemplo, remítase a las alineaciones ejemplares en las Figuras 1A y 1B, con el dominio III indicado específicamente. En las realizaciones, la proteína Cry diferente se selecciona de manera que la secuencia de aminoácidos del dominio III de la proteína Cry diferente sea sustancialmente idéntica a la región del dominio III correspondiente de la primera proteína Cry (por ejemplo, BT-0029). En realizaciones ejemplares, la secuencia de aminoácidos de la región del dominio III de la proteína Cry

diferente (por ejemplo, la proteína Cry1) es al menos aproximadamente un 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más idéntica con una secuencia de aminoácidos de la región del dominio III correspondiente de la primera proteína Cry. Los expertos en la técnica están muy familiarizados con los métodos de alineación y determinación de la identidad secuencial de aminoácidos a lo largo de una región alineada.

[00188] En realizaciones particulares, una proteína insecticida quimérica de la invención comprende, consiste esencialmente en, o consiste en (a) la secuencia de aminoácidos de cualquiera de los aminoácidos 1 a 597 de la SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 9 o la SEQ ID NO: 13 o los aminoácidos 1 a 610 de la SEQ ID NO: 15, o los aminoácidos 1 a 617 de la SEQ ID NO: 18, o un fragmento de toxina de cualquiera de las SEQ ID Nos: 3, 9, 13, 15, o 18; o (b) una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente idéntica a la secuencia de aminoácidos de (a).

[00189] En realizaciones particulares, una proteína insecticida quimérica de la invención comprende, consiste esencialmente en, o consiste en (a) la secuencia de aminoácidos de cualquiera de los aminoácidos 1 a 603 de la SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 9 o la SEQ ID NO: 13, o los aminoácidos 1 a 615 de la SEQ ID NO:15 o la SEQ ID NO:18, o un fragmento de toxina de estas; o (b) una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente idéntica a la secuencia de aminoácidos de (a).

[00190] En realizaciones particulares, una proteína insecticida quimérica de la invención comprende, consiste esencialmente en, o consiste en (a) la secuencia de

aminoácidos de cualquiera de los aminoácidos 1 a 607 de la SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 9 o la SEQ ID NO: 13, o los aminoácidos 1 a 620 de la SEQ ID NO: 15, o SEQ ID NO: 18, o un fragmento de toxina de estas; o (b) o una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente idéntica a la secuencia de aminoácidos de (a).

[00191] En realizaciones particulares, una proteína insecticida quimérica de la invención comprende, consiste esencialmente en, o consiste en (a) la secuencia de aminoácidos de cualquiera de los aminoácidos 1 a 610 de la SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 9, o SEQ ID NO: 13, o los aminoácidos 1 a 620 de la SEQ ID NO: 15, o SEQ ID NO: 18, o un fragmento de toxina de estas; o (b) o una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente idéntica a la secuencia de aminoácidos de (a).

[00192] Como entenderán los expertos en la técnica, las toxinas Cry nativas se expresan como protoxinas que son procesadas para producir una toxina procesada madura mediante la escisión de un fragmento peptidilo N-terminal y una cola de la protoxina C-terminal. El fragmento peptidilo N-terminal y/o la cola de la protoxina C-terminal pueden funcionar para potenciar la estabilidad y/o la actividad insecticida de la toxina Cry. En las realizaciones de la invención, la proteína insecticida quimérica comprende la totalidad o una porción de un fragmento peptidilo N-terminal y/o una cola de la protoxina. En las realizaciones, la proteína insecticida quimérica no comprende un fragmento peptidilo N-terminal completo y/o una cola de la protoxina completa. En las realizaciones, la proteína insecticida quimérica no comprende un fragmento peptidilo N-terminal y/o una cola de la

protoxina, es decir, corresponde a la toxina procesada madura.

[00193] En las realizaciones, fragmento peptidilo N-terminal se deriva de una proteína Cry (por ejemplo, de la primera proteína Cry, que es opcionalmente una proteína Cry1). En otras realizaciones, el fragmento peptidilo N-terminal es heterólogo respecto a la primera proteína Cry, por ejemplo, no se deriva de una proteína Cry y/o es parcial o completamente sintético. En las realizaciones, el fragmento peptidilo comprende al menos aproximadamente 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60 o más aminoácidos, opcionalmente de la primera proteína Cry, incluyendo, sin limitación, una primera proteína Cry1 (por ejemplo, BT-0029, SEQ ID NO: 2). En las realizaciones, el fragmento peptidilo comprende los aminoácidos de aproximadamente el aminoácido 1 a aproximadamente el aminoácido 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59 o 60 de la primera proteína Cry, por ejemplo, una proteína Cry1, tal como BT-0029.

[00194] En las realizaciones, la proteína insecticida quimérica de la invención comprende en el extremo C una región de la cola de la protoxina de una proteína Cry de *Bt*, incluidas modificaciones de las colas de la protoxina de la proteína Cry nativa que son sustancialmente idénticas a una cola de la protoxina de la proteína Cry nativa. En las

realizaciones, la cola de la protoxina procede de una proteína Cry activa contra lepidópteros. En las realizaciones, la cola de la protoxina no se deriva de una proteína Cry y/o es parcial o completamente sintética. En las realizaciones, la proteína Cry es heteróloga respecto a la primera proteína Cry y/o la proteína Cry diferente. En las realizaciones, la cola de protoxina es de una proteína Cry1, por ejemplo, una proteína BT-0029, una proteína BT-0022, una proteína Cry1F (por ejemplo, Cry1Fa), una proteína Cry1I (por ejemplo, una proteína Cry1Ia o una proteína Cry1If), una Cry1K (por ejemplo, una proteína Cry1Ka), o una Cry1C (por ejemplo, Cry1Ca), o es un polipéptido que es sustancialmente idéntico a una cola de protoxina (o fragmento de esta) de cualquiera de las anteriores. La región de la cola de la protoxina puede comprender una cola de la protoxina entera de una proteína Cry o cualquier porción de esta. En las realizaciones, la región de cola de protoxina comprende al menos aproximadamente 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 35, 38, 40, 45, 50 o más aminoácidos contiguos de una cola de protoxina de la proteína Cry (por ejemplo, una cola de protoxina de la proteína Cry1, tal como una BT-0029), por ejemplo, como se muestra para las diversas proteínas Cry en la Figura 1A. En las realizaciones, la cola de protoxina comprende al menos aproximadamente 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 35, 38, 40, 45, 50 o más aminoácidos contiguos partiendo de la posición aminoacídica 598 de la SEQ ID NO: 2 (BT-0029) o la región correspondiente de otra proteína Cry, tal como una proteína Cry1 (por ejemplo, BT-0022, una proteína Cry1I, una proteína Cry1F, una proteína Cry1K o una proteína Cry1C). En las realizaciones, la cola de

protoxina comprende los aminoácidos 598 a 1169, o 598 a 652, o 598 a 636, o 598 a 622, o 598 a 610, o 598 a 607, o 598 a 603, o 598 a 600 de la SEQ ID NO: 2 (BT-0029) o la región correspondiente de otra proteína Cry (véase, por ejemplo, la alineación de BT-0029 con BT-0022, Cry1Fa y Cry1Ka en las Figuras 1A y 1B). En algunas realizaciones, la proteína insecticida quimérica comprende cualquiera de las SEQ ID Nos:20-25 o SEQ ID Nos:32-35. En otras realizaciones, la cola de protoxina comprende los aminoácidos 637 a 715, o 637 a 691, o 637 a 675, o 637 a 661, o 637 a 649, o 637 a 646, o 637 a 642 de la SEQ ID NO: 1 (BT-0022). En aún otras realizaciones, una proteína insecticida quimérica de la invención comprende, consiste esencialmente, o consiste en cualquiera de las SEQ ID Nos: 26-31.

[00195] En consecuencia, en las realizaciones, una proteína insecticida quimérica de la invención comprende, consiste esencialmente en, o consiste en (a) la secuencia de aminoácidos de cualquiera de la SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 18, SEQ ID Nos:20-35, o un fragmento de toxina de estas; o (b) una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente idéntica a la secuencia de aminoácidos de (a). En realizaciones opcionales, la proteína insecticida quimérica de la invención comprende, consiste esencialmente en, o consiste en la secuencia de aminoácidos de cualquiera de los aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 18 o SEQ ID Nos: 20-35.

[00196] Los expertos en la técnica apreciarán que las proteínas insecticidas quiméricas de la invención pueden comprender además otros dominios funcionales y/o etiquetas

peptídicas, por ejemplo, una etiqueta peptídica en el extremo N y/o el extremo C. Por ejemplo, puede ser útil expresar la proteína insecticida quimérica con una etiqueta peptídica que pueda ser reconocida por un anticuerpo comercializado (por ejemplo, un motivo FLAG) o con una etiqueta peptídica que facilite la purificación (por ejemplo, mediante la adición de una etiqueta de poli-His) y/o la detección. Como alternativa, se puede introducir un epítipo en la proteína quimérica para facilitar la generación de anticuerpos que reconozcan específicamente la proteína quimérica modificada con el fin de distinguir la proteína quimérica modificada de la quimera no modificada y/o una o más proteínas progenitoras. Por ejemplo, se pueden sustituir uno o más aminoácidos en un bucle antigénico de la secuencia nativa para crear un nuevo epítipo. En una realización, el bucle antigénico se ubica en una región no conservada fuera del dominio I de la proteína Cry nativa. En las realizaciones, el bucle antigénico no es un bucle implicado en el reconocimiento del receptor en el intestino del insecto por parte de la proteína Cry y/o no está implicado en la activación proteásica de la proteína Cry. En otras realizaciones, la proteína quimérica se puede modificar para potenciar su estabilidad, por ejemplo, fusionando una proteína de unión a maltosa (MBP, por sus siglas en inglés) o glutatión-S-transferasa al polipéptido. Como otra alternativa, la proteína de fusión puede comprender una molécula indicadora.

[00197] Las proteínas insecticidas quiméricas que se modifican mediante la introducción o eliminación de un sitio de procesamiento proteásico en una o más posiciones apropiadas para posibilitar, o impedir, la escisión

proteolítica por parte de una proteasa de insecto, planta y/o microorganismo también están comprendidas dentro del alcance de la invención. En las realizaciones, la proteína insecticida quimérica modificada mantiene sustancialmente la actividad insecticida. En las realizaciones, la estabilidad y/o actividad insecticida de tales proteínas quiméricas modificadas está aumentada en comparación con la proteína insecticida quimérica que no contiene tal modificación para introducir/eliminar un sitio de escisión proteásico.

[00198] De este modo, la invención engloba polipéptidos que tienen secuencias de aminoácidos que son sustancialmente idénticas a las divulgadas específicamente en la presente, y fragmentos de toxina de estos. Se comprenderá que las proteínas insecticidas quiméricas divulgadas específicamente en la presente tolerarán normalmente modificaciones en la secuencia de aminoácidos y mantendrán sustancialmente la actividad biológica (por ejemplo, actividad insecticida). Tales modificaciones incluyen inserciones, deleciones (incluidos truncamientos en cualquier extremo) y sustituciones de uno o más aminoácidos, incluidos hasta aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7, aproximadamente 8, aproximadamente 9, aproximadamente 10, aproximadamente 15, aproximadamente 20, aproximadamente 25, aproximadamente 30, aproximadamente 35, aproximadamente 40, aproximadamente 45, aproximadamente 50, aproximadamente 55, aproximadamente 60, aproximadamente 65, aproximadamente 70, aproximadamente 75, aproximadamente 80, aproximadamente 85, aproximadamente 90, aproximadamente 100, aproximadamente 105, aproximadamente 110, aproximadamente 115, aproximadamente

120, aproximadamente 125, aproximadamente 130, aproximadamente 135, aproximadamente 140, aproximadamente 145, aproximadamente 150, aproximadamente 155 o más sustituciones, deleciones y/o inserciones de aminoácidos.

[00199] Para identificar polipéptidos sustancialmente idénticos a las proteínas insecticidas quiméricas divulgadas específicamente en la presente, las sustituciones de aminoácidos se pueden basar en cualquier característica conocida en la técnica, incluidas las diferencias o similitudes relativas de los sustituyentes de las cadenas laterales de los aminoácidos, por ejemplo, su hidrofobicidad, hidrofiliidad, carga, tamaño y similares.

[00200] Por ejemplo, en la identificación de secuencias de aminoácidos que codifican polipéptidos insecticidas diferentes de los divulgados específicamente en la presente, se puede tener en cuenta el índice hidropático de los aminoácidos. La importancia del índice hidropático de aminoácidos para conferir una función biológica interactiva en una proteína se comprende generalmente en la técnica (remítase a, Kyte y Doolittle, (1982) *J. Mol. Biol.* 157:105; incorporado a la presente a modo de referencia en su totalidad). Es algo aceptado que el carácter hidropático relativo del aminoácido contribuye a la estructura secundaria de la proteína resultante, la cual a su vez define la interacción de la proteína con otras moléculas, por ejemplo, enzimas, sustratos, receptores, ADN, anticuerpos, antígenos y similares.

[00201] A cada aminoácido se le ha asignado un índice hidropático en función de sus características de carga e hidrofobicidad (Kyte y Doolittle, Id.), y estos son:

isoleucina (+4.5); valina (+4.2); leucina (+3.8);
fenilalanina (+2.8); cisteína/cistina (+2.5); metionina
(+1.9); alanina (+1.8); glicina (-0.4); treonina (-0.7);
serina (-0.8); triptófano (-0.9); tirosina (-1.3); prolina (-
1.6); histidina (-3.2); glutamato (-3.5); glutamina (-3.5);
aspartato (-3.5); asparagina (-3.5); lisina (-3.9) y arginina
(-4.5).

[00202] En consecuencia, se puede tener en cuenta el índice hidropático del aminoácido (o secuencia de aminoácidos) cuando se modifican los polipéptidos quiméricos divulgados específicamente en la presente.

[00203] También se entiende en la técnica que la sustitución de aminoácidos se puede llevar a cabo en función de la hidrofiliidad. Pat. de EE. UU. 4,554,101 afirma que la mayor hidrofiliidad promedio local de una proteína, tal como está determinada por la hidrofiliidad de sus aminoácidos adyacentes, se correlaciona con una propiedad biológica de la proteína.

[00204] Tal como se detalla en la Pat. de EE. UU. N.º 4,554,101, se han asignado los siguientes valores de hidrofiliidad a los residuos aminoacídicos: arginina (+3.0); lisina (.+-3.0); aspartato (+3.0.+-1); glutamato (+3.0.+-1); serina (+0.3); asparagina (+0.2); glutamina (+0.2); glicina (0); treonina (-0.4); prolina (-0.5+I); alanina (-0.5); histidina (-0.5); cisteína (-1.0); metionina (-1.3); valina (-1.5); leucina (-1.8); isoleucina (-1.8); tirosina (-2.3); fenilalanina (-2.5); triptófano (-3.4).

[00205] De este modo, se puede tener en cuenta la hidrofiliidad del aminoácido (o secuencia de aminoácidos)

cuando se identifican polipéptidos insecticidas adicionales diferentes de los divulgados específicamente en la presente.

[00206] Las proteínas insecticidas quiméricas de la invención, incluidos las modificaciones y fragmentos de toxina del polipéptido quimérico divulgados específicamente en la presente, se pueden generar mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica, por lo general modificando las secuencias codificantes de ácido nucleico. En la técnica son muy conocidos los métodos de manipulación y modificación de ácidos nucleicos para conseguir una modificación deseada. Además, también se pueden utilizar técnicas de edición génica para producir una proteína insecticida quimérica de la invención o para generar modificaciones adicionales en esta.

[00207] Como otra estrategia, el polipéptido que se va a modificar se puede expresar en una célula hospedadora que muestre una tasa elevada de incorporaciones erróneas de bases durante la replicación del ADN, tal como XL-1 Red (Stratagene, La Jolla, CA). Después de la propagación en tales cepas, se puede aislar el ADN (por ejemplo, mediante la preparación del ADN plasmídico o mediante la amplificación por PCR y clonación del fragmento de PCR resultante en un vector), cultivar las mutaciones de la proteína en una cepa no mutagénica e identificar genes mutados con actividad insecticida, por ejemplo, mediante la realización de un ensayo para determinar si hay actividad insecticida. En los métodos ejemplares, la proteína se mezcla y se utiliza en ensayos de alimentación. Véase, por ejemplo, Marrone et al. (1985) J. of Economic Entomology 78:290-293. Tales ensayos pueden incluir poner en contacto plantas con una o más plagas y determinar la capacidad de la planta para sobrevivir o

provocar la muerte de las plagas. Se pueden consultar ejemplos de mutaciones que conllevan una mayor toxicidad en Schnepf et al. (1998) Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62:775-806.

[00208] En las realizaciones, se aísla la proteína insecticida quimérica (incluidos polipéptidos sustancialmente similares y fragmentos de toxina) de la invención. En las realizaciones, la proteína insecticida quimérica (incluidos polipéptidos sustancialmente similares y fragmentos de toxina) de la invención es una proteína recombinante.

[00209] Las proteínas insecticidas quiméricas de la invención tienen actividad insecticida contra una plaga de lepidópteros. En las realizaciones, la proteína insecticida quimérica tiene actividad contra uno o más de los siguientes ejemplos no limitantes de una plaga de lepidópteros: *Ostrinia* spp. tal como *O. nubilalis* (gusano barrenador europeo del maíz) y/o *O. furnacalis* (barrenador asiático del maíz); *Plutella* spp. tal como *P. xylostella* (polilla de las coles); *Spodoptera* spp. tal como *S. frugiperda* (cogolleros del maíz), *S. littoralis* (oruga de la hoja del algodón egipcio), *S. ornithogalli* (cogollero de rayas amarillas), *S. praefica* (cogollero de rayas amarillas occidental), *S. eridania* (cogollero del sur) y/o *S. exigua* (cogollero de la remolacha); *Agrotis* spp. tal como *A. ipsilon* (gusano cortador negro), *A. segetum* (gusano cortador común), *A. gladiaria* (gusano cortador granuloso), y/o *A. orthogonia* (gusano cortador pálido del oeste); *Striacosta* spp. tal como *S. albicosta* (gusano cortador del poroto del oeste); *Helicoverpa* spp. tal como *H. zea* (gusano elotero), *H. punctigera* (isoca), y/o *H. armigera* (isoca bolillera); *Heliothis* spp. tal como *H. virescens* (cogollero del tabaco); *Diatraea* spp. tal como *D.*

grandiosella (barrenador del maíz del suroeste) y/o *D. saccharalis* (barrenador de la caña de azúcar); *Trichoplusia* spp. tal como *T. ni* (oruga de la col); *Sesamia* spp. tal como *S. nonagroides* (barrenador del maíz mediterráneo) y/o *S. calamistis* (barrenador del tallo rosado); *Pectinophora* spp. tal como *P. gossypiella* (lagarta rosada); *Cochylis* spp. tal como *C. hospes* (polilla de bandas del girasol); *Manduca* spp. tal como *M. sexta* (esfíngido del tabaco) y/o *M. quinquemaculata* (esfíngido del tomate); *Elasmopalpus* spp. tal como *E. lignosellus* (barrenador menor del tallo del maíz); *Pseudoplusia* spp. tal como *P. includens* (oruga de la soja); *Anticarsia* spp. tal como *A. gemmatalis* (oruga de las leguminosas); *Plathypena* spp. tal como *P. scabra* (oruga verde); *Pieris* spp. tal como *P. brassicae* (mariposa de la col), *Papaipema* spp. tal como *P. nebris* (barrenador del tallo); *Pseudaletia* spp. tal como *P. unipuncta* (cogollero común); *Peridroma* spp. tal como *P. saucia* (gusano cortador variegado); *Keiferia* spp. tal como *K. lycopersicella* (gusano alfiler del tomate); *Artogeia* spp. tal como *A. rapae* (gusano de la col importado); *Phthorimaea* spp. tal como *P. operculella* (polilla de la patata); *Chrysodeixis* spp. Tal como *C. includes* (oruga de la soja); *Feltia* spp. tal como *F. ducens* (gusano cortador sucio); *Chilo* spp. tal como *C. suppressalis* (barrenador rayado de cabeza oscura), *Cnaphalocrocis* spp. tal como *C. medinalis* (enrulador de las hojas del arroz), o cualquier combinación de los anteriores.

[00210] Opcionalmente, la proteína insecticida quimérica tiene una mayor actividad contra una o más plagas de lepidópteros en comparación con una o más de las moléculas progenitoras (por ejemplo, la primera proteína Cry y la

proteína Cry diferente). En las realizaciones, la proteína insecticida quimérica tiene una mayor actividad contra una o más plagas de lepidópteros en comparación con BT-0029. En las realizaciones, la proteína insecticida quimérica tiene un aumento de la actividad contra una o más plagas de lepidópteros en comparación con BT-0022, una Cry1Fa, una Cry1Ia, una Cry1If, una Cry1Ka, o una Cry1C.

[00211] En las realizaciones, la proteína insecticida quimérica tiene una mejor actividad insecticida contra los cogolleros del maíz (*Spodoptera frugiperda*) en comparación con una o más de las moléculas progenitoras (por ejemplo, la primera proteína Cry y la proteína Cry diferente). En las realizaciones, la proteína insecticida quimérica tiene una mayor actividad contra el cogollero del maíz en comparación con BT-0029. En las realizaciones, la proteína insecticida quimérica tiene un aumento de la actividad contra los cogolleros del maíz en comparación con BT-0022, una Cry1Fa, una Cry1Ia, una Cry1If, una Cry1Ka y/o una Cry1Ca. De acuerdo con las realizaciones anteriores, la proteína insecticida quimérica puede tener opcionalmente actividad insecticida contra una colonia o plaga de insectos que son cogolleros del maíz que tiene resistencia frente a otro agente insecticida, incluida otra proteína insecticida (tal como, por ejemplo, una proteína Bt). En las realizaciones, la proteína insecticida quimérica tiene actividad insecticida contra una colonia de cogolleros del maíz que es resistente a una proteína Vip3A (por ejemplo, una Vip3Aa, incluido, sin carácter limitante, el evento MIR162 de maíz) o una proteína Cry1F (por ejemplo, Cry1Fa, incluido, sin carácter limitante, el evento TC1507 de maíz). En las realizaciones, la proteína

insecticida quimérica tiene una mejor actividad contra la colonia de cogolleros del maíz resistente en comparación con una o más de las moléculas progenitoras, *e.g.*, BT-0029, BT-0022, una Cry1Fa, una Cry1Ia, una Cry1If, una Cry1Ka y/o una Cry1Ca.

[00212] La invención también engloba anticuerpos que se unen específicamente a una proteína insecticida quimérica de la invención. El anticuerpo puede ser opcionalmente un anticuerpo monoclonal o un antisuero policlonal. En las realizaciones, el anticuerpo es selectivo para la proteína quimérica y no se une a una o más de las moléculas progenitoras (por ejemplo, BT-0029, BT-0022, Cry1Fa y similares) y se puede utilizar para distinguir la proteína quimérica de las proteínas progenitoras. Dichos anticuerpos pueden producirse usando técnicas inmunológicas estándar para la producción de antisueros policlonales y, si se desea, inmortalizar las células productoras de anticuerpos del hospedador inmunizado para fuentes de producción de anticuerpos monoclonales. Las técnicas para producir anticuerpos contra cualquier sustancia de interés son muy conocidas, por ejemplo, tal como se describe en Harlow y Lane (1988. *Antibodies a laboratory manual*. págs. 726. Cold Spring Harbor Laboratory) y como en Goding (*Monoclonal Antibodies: Principles & practice*. 1986. Academic Press, Inc., Orlando, FL). La presente invención también engloba una proteína insecticida que presenta reactividad cruzada con un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal, generado contra una o más de las proteínas insecticidas quiméricas de la presente invención.

[00213] Los anticuerpos de acuerdo con la invención son útiles, por ejemplo, en inmunoensayos para determinar la cantidad o presencia de una proteína insecticida quimérica de la invención o un polipéptido relacionado desde un punto de vista antigénico, por ejemplo, en una muestra biológica. Tales ensayos también son útiles en la producción controlada por la calidad de composiciones que contienen una o más de las proteínas insecticidas quiméricas de la invención o un polipéptido relacionado desde un punto de vista antigénico. Además, los anticuerpos se pueden utilizar para evaluar la eficacia de la producción recombinante de una o más de las proteínas quiméricas de la invención o de un polipéptido relacionado desde un punto de vista antigénico, así como también para cribar colecciones de expresión para detectar la presencia de una secuencia de nucleótidos que codifica una o más de las proteínas quiméricas de la invención o un polipéptido relacionado antigénicamente. Los anticuerpos son útiles además como ligandos de afinidad para purificar o aislar una o más de las proteínas de la invención o un polipéptido relacionado desde un punto de vista antigénico.

Ácidos nucleicos, casetes de expresión y vectores.

[00214] Como un aspecto adicional, la invención proporciona ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos de la invención, incluidos polipéptidos modificados y fragmentos de toxina tal como se describe en la presente.

[00215] De acuerdo con algunas realizaciones, la invención proporciona una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende, está constituida esencialmente por, o está constituida por: (a) una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de

aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 18, SEQ ID Nos: 20-35, o un fragmento de toxina de estas; (b) una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente idéntica a la secuencia de aminoácidos de (a); (c) una secuencia de nucleótidos que se hibrida en condiciones de hibridación rigurosas a la secuencia de nucleótidos de (a) o (b); o (d) una secuencia de nucleótidos que difiere de las secuencias de nucleótidos de (a), (b) o (c) debido a la degeneración del código genético.

[00216] En las realizaciones, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que comprende, está constituida esencialmente por, o está constituida por: (a) una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 14, o SEQ ID NO: 16, o un fragmento que codifica una toxina de estas; (b) una secuencia de nucleótidos que es sustancialmente idéntica a la secuencia de nucleótidos de (a); (c) una secuencia de nucleótidos que se hibrida en condiciones de hibridación rigurosas a la secuencia de nucleótidos de (a) o (b); o (d) una secuencia de nucleótidos que difiere de las secuencias de nucleótidos de (a), (b) o (c) debido a la degeneración del código genético. Opcionalmente, la secuencia de nucleótidos comprende, consiste esencialmente en, o consiste en la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 14, o SEQ ID NO: 16.

[00217] En las realizaciones, la secuencia de nucleótidos es una secuencia parcial o completamente

sintética, por ejemplo, que tiene codones optimizados para la expresión en un organismo hospedador, por ejemplo, en un hospedador que es una bacteria o un hospedador que es una planta (por ejemplo, un hospedador que es una planta monocotiledónea transgénica o un hospedador que es una planta dicotiledónea transgénica). Los ejemplos no limitantes de secuencias de nucleótidos con codones optimizados para la expresión en una planta de maíz incluyen la SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 y la SEQ ID NO: 11.

[00218] En realizaciones representativas, para la expresión en plantas transgénicas, las secuencias de nucleótidos de la invención están modificadas y/o optimizadas. Por ejemplo, aunque en muchos casos los genes de los organismos microbianos se pueden expresar en las plantas en niveles altos sin ser modificados, puede ser que se obtenga una baja expresión en plantas transgénicas debido a secuencias de nucleótidos microbianos que tienen codones que no son preferidos en las plantas. Existe constancia en la técnica de que los organismos vivos tienen preferencias específicas en lo que respecta al uso de codones y que los codones de las secuencias de nucleótidos que se describen en esta invención se pueden modificar para ajustarse a las preferencias de las plantas, a la vez que se mantienen los aminoácidos codificados por estos. Además, existe constancia en la técnica de que la expresión elevada en plantas, por ejemplo, plantas de maíz, se puede lograr a partir de secuencias codificantes que tienen al menos aproximadamente un 35% de contenido de GC, o al menos aproximadamente un 45%, o al menos aproximadamente un 50% o al menos aproximadamente un 60%. Puede ser que las secuencias de nucleótidos

microbianos que tienen contenidos bajos de GC se expresen de manera deficiente en plantas. Aunque ciertas secuencias de nucleótidos se pueden expresar adecuadamente tanto en especies de plantas monocotiledóneas como dicotiledóneas, se pueden modificar las secuencias para que tengan en cuenta las preferencias codónicas y las preferencias de contenido de GC específicas de las monocotiledóneas o dicotiledóneas, ya que se ha demostrado que estas preferencias difieren (Murray et al., *Nucl. Acids Res.* 17:477-498 (1989)). Además, en las realizaciones, la secuencia de nucleótidos se modifica para eliminar sitios de corte y empalme ilegítimos que pueden causar un truncamiento del mensaje. Tales modificaciones de las secuencias de nucleótidos se pueden realizar empleando técnicas de uso común de mutagénesis dirigida, PCR y la construcción de genes sintéticos utilizando los métodos descritos, por ejemplo, en las Patentes de EE. UU. N.^{os} 5,625,136; 5,500,365 y 6,013,523.

[00219] En algunas realizaciones, la invención proporciona secuencias codificantes sintéticas o polinucleótidos hechos de acuerdo con el procedimiento divulgado en la patente de EE.UU. n.º 5,625,136. En este procedimiento, se utilizan los codones preferidos del maíz, es decir, el único codón que codifica con más frecuencia ese aminoácido en el maíz. El codón preferido del maíz para un aminoácido particular se puede obtener, por ejemplo, a partir de secuencias de genes conocidas del maíz. Por ejemplo, el uso de codones del maíz para 28 genes de plantas de maíz aparece en Murray et al., *Nucleic Acids Research* 17:477-498 (1989). Se reconoce que codones optimizados para la expresión en una especie vegetal funcionará también en otras especies

vegetales, pero posiblemente no al mismo nivel que la especie vegetal para la que se optimizaron los codones. De esta forma, se pueden optimizar las secuencias de nucleótidos para la expresión en cualquier planta. Se reconoce que la totalidad o cualquier parte de la secuencia de nucleótidos puede estar optimizada o ser sintética. Es decir, un polinucleótido puede comprender una secuencia de nucleótidos que es en parte una secuencia nativa y en parte una secuencia con codones optimizados.

[00220] En realizaciones representativas, un polinucleótido de la invención es un polinucleótido aislado. En las realizaciones, un polinucleótido de la invención es un polinucleótido recombinante.

[00221] En las realizaciones, la invención proporciona además una molécula de ácido nucleico que comprende un polinucleótido de la asociado operativamente con un promotor (por ejemplo, un promotor heterólogo). Los promotores pueden incluir, por ejemplo, promotores constitutivos, inducibles, regulados temporalmente, regulados por el desarrollo, regulados químicamente, preferidos en tejidos y/o específicos para tejidos. En aspectos particulares, un promotor útil en la invención es un promotor capaz de iniciar la transcripción de una secuencia de nucleótidos en una célula vegetal, por ejemplo, en una célula de una planta monocotiledónea (por ejemplo, maíz o arroz) o dicotiledónea (por ejemplo, soja, algodón).

[00222] En las realizaciones, un promotor heterólogo es un promotor que se puede expresar en plantas (por ejemplo, que se puede expresar en monocotiledóneas o que se puede expresar en dicotiledóneas). Por ejemplo, sin carácter

limitante, el promotor que se puede expresar en plantas se puede seleccionar entre los siguientes promotores:

ubiquitina, virus amarillo del *Cestrum*, TrpA de maíz, OsMADS 6, histona H3 de maíz, 5' UTR del gen 9 del bacteriófago T3, sacarosa-sintetasa 1 de maíz, alcohol-deshidrogenasa 1 de maíz, complejo cosechador de luz de maíz, proteína de choque térmico de maíz, mtl de maíz, subunidad pequeña de la RuBP-carboxilasa de arveja, actina de arroz, ciclofilina de arroz, manopina-sintasa del plásmido Ti, nopalina-sintasa del plásmido Ti, chalcona-isomerasa de petunia, proteína 1 rica en glicina de poroto, patatina de papa, lectina, 35S de CaMV, y el promotor S-E9 de la subunidad pequeña de la RuBP-carboxilasa.

[00223] Aunque se ha mostrado que muchos promotores de dicotiledóneas son operativos en monocotiledóneas y viceversa, en las realizaciones, se seleccionan promotores dicotiledóneos para la expresión en dicotiledóneas y promotores monocotiledóneos para la expresión en monocotiledóneas. Sin embargo, no existe ninguna restricción sobre la procedencia de los promotores seleccionados; es suficiente con que sean operativos a la hora de dirigir la expresión de las secuencias de nucleótidos en la célula deseada.

[00224] La selección del promotor puede variar dependiendo de los requisitos temporales y espaciales para la expresión y también dependiendo de la célula hospedadora que se va a transformar. De este modo, por ejemplo, la expresión de las secuencias de nucleótidos de la invención se puede realizar en cualquier planta y/o parte de la planta (por ejemplo, en hojas, en briznas o tallos, en mazorcas, en

inflorescencias (por ejemplo, espigas, panojas, olotes, etc.), en raíces, semillas y/o plántulas, y similares). Por ejemplo, cuando se desea la expresión en un tejido u órgano específico, se puede utilizar un promotor específico para tejidos o preferido por tejidos (por ejemplo, promotor específico/preferido en las raíces). Por el contrario, cuando se desea una expresión en respuesta a un estímulo, se puede utilizar un promotor inducible por estímulos o agentes químicos. Cuando se desea una expresión continua con un nivel relativamente constante en todas las células de una planta, se puede elegir un promotor constitutivo.

[00225] Los promotores útiles con la invención incluyen, sin carácter limitante, aquellos que impulsan la expresión de una secuencia de nucleótidos de forma constitutiva, aquellos que impulsan la expresión cuando son inducidos y aquellos que impulsan la expresión de manera específica en un tejido o según el desarrollo. En la técnica existe constancia de estos diversos tipos de promotores.

[00226] Los promotores constitutivos adecuados incluyen, por ejemplo, el promotor 35S de CaMV (Odell et al., Nature 313:810-812, 1985); el promotor At6669 de Arabidopsis (véase la Publicación PCT n.º W004081173A2); Ubi 1 de maíz (Christensen et al., Plant Mol. Biol. 18:675-689, 1992); actina de arroz (McElroy et al., Plant Cell 2:163-171, 1990); pEMU (Last et al., Theor. Appl. Genet. 81:581-588, 1991); 19S de CaMV (Nilsson et al., Physiol. Plant 100:456-462, 1997); GOS2 (de Pater et al., Plant J Noviembre; 2(6):837-44, 1992); ubiquitina (Christensen et al., Plant Mol. Biol. 18: 675-689, 1992); ciclofilina de arroz (Buchholz et al., Plant Mol Biol. 25(5):837-43, 1994); Maize H3 histone (Lepetit et al., Mol.

Gen. Genet. 231: 276-285, 1992); Actina 2 (An et al., *Plant J.* 10(1):107-121, 1996), el promotor constitutivo de la punta de la raíz CT2 (SEQ ID NO:1535; remítase también a la solicitud de PCT N.º IL/2005/000627) y Super MAS Sintético (Ni et al., *The Plant Journal* 7: 661-76, 1995). Otros promotores constitutivos incluyen los de las Patentes de EE.UU. n.º 5,659,026, 5,608,149, 5,608,144, 5,604,121, 5,569,597: 5,466,785; 5,399,680; 5,268,463; y 5,608,142.

[00227] Los promotores específicos para tejidos o preferenciales en tejidos útiles para la expresión de los polipéptidos de la invención en plantas, opcionalmente maíz, incluyen aquellos que dirigen la expresión en la raíz, médula, hojas o polen. Los promotores específicos para tejidos adecuados incluyen, sin carácter limitante, promotores específicos para hojas (tales como los descritos, por ejemplo, por Yamamoto et al., *Plant J.* 12:255-265, 1997; Kwon et al., *Plant Physiol.* 105:357-67, 1994; Yamamoto et al., *Plant Cell Physiol.* 35:773-778, 1994; Gotor et al., *Plant J.* 3:509-18, 1993; Orozco et al., *Plant Mol. Biol.* 23:1129-1138, 1993; y Matsuoka et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:9586-9590, 1993), promotores preferidos en semillas (por ejemplo, de genes específicos para semillas; Simon et al., *Plant Mol. Biol.* 5: 191, 1985; Scofield, et al., *J. Biol. Chem.* 262: 12202, 1987; Baszczynski, et al., *Plant Mol. Biol.* 14: 633, 1990), albúmina de la nuez de Brasil (Pearson et al., *Plant Mol. Biol.* 18: 235-245, 1992), legúmina (Ellis, et al. *Plant Mol. Biol.* 10: 203-214, 1988), Glutenina (Takaiwa, et al., *Mol. Gen. Genet.* 208: 15-22, 1986; Takaiwa, et al., *FEBS Letts.* 221: 43-47, 1987), Zeína (Matzke et al., *Plant Mol Biol*, 143).323-32 1990), napA (Stalberg, et al.,

Planta 199: 515-519, 1996), SPA de trigo (Albanietal, Plant Cell, 9: 171-184, 1997), oleosina de girasol (Cummins et al., Plant Mol. Biol. 19: 873-876, 1992)], promotores específicos para endosperma [por ejemplo, LMW y HMW de trigo, glutenina-1 (Mol Gen Genet 216:81-90, 1989; NAR 17:461-2), gliadinas a, b y g de trigo (EMB03:1409-15, 1984), promotor ltr1 de cebada, hordeína B1, C, D de cebada (Theor Appl Gen 98:1253-62, 1999; Plant J 4:343-55, 1993; Mol Gen Genet 250:750-60, 1996), DOF de cebada (Mena et al., The Plant Journal, 116(1): 53-62, 1998), Biz2 (EP99106056.7), promotor sintético (Vicente-Carbajosa et al., Plant J. 13: 629-640, 1998), NRP33 de prolamina de arroz, globulina de arroz Glb-1 (Wu et al., Plant Cell Physiology 39(8) 885-889, 1998), alfa-globulina de arroz REB/OHP-1 (Nakase et al. Plant Mol. Biol. 33: 513-S22, 1997), ADP-glucosa PP de arroz (Trans Res 6:157-68, 1997), la familia del gen ESR de maíz (Plant J 12:235-46, 1997), gamma-kafirina de sorgo (Plant Mol. Biol 32:1029-35, 1996)], promotores específicos para el embrión (por ejemplo, OSH1 de arroz; Sato et al., Proc. Nati. Acad. Sci. USA, 93: 8117-8122), KNOX (Postma-Haarsma of al, Plant Mol. Biol. 39:257-71, 1999), oleosina de arroz (Wu et at, J. Biochem., 123:386, 1998)], promotores específicos para las flores, por ejemplo, AtPRP4, chaleno-sintasa (chsA) (Van der Meer, et al., Plant Mol. Biol. 15, 95-109, 1990), LAT52 (Twell et al., Mol. Gen Genet. 217:240-245; 1989), apetala-3, y promotores específicos para tejidos reproductores vegetales (por ejemplo, promotores OsmADS; Publicación de Patente de EE.UU. 2007/0006344).

[00228] Los ejemplos de promotores adecuados para la expresión preferencial en tejidos verdes incluyen muchos que

regulan los genes implicados en la fotosíntesis y muchos de estos han sido clonados a partir de monocotiledóneas y dicotiledóneas. Un promotor de este tipo es el promotor PEPC de maíz del gen fosfoenol-carboxilasa (Hudspeth y Grula, Plant Molec. Biol. 12:579-589 (1989)). Otro promotor para la expresión específica en raíces es el descrito por de Framond (FEBS 290:103-106 (1991); o la Patente de EE.UU. n.º 5,466,785). Otro promotor útil en la invención es el promotor específico para tallos descrito en la Patente de EE.UU. N.º 5,625,136, que impulsa de manera natural la expresión del gen *trpA* de maíz.

[00229] Además, se pueden utilizar promotores que sean funcionales en plástidos. Los ejemplos no limitantes de tales promotores incluyen la UTR 5' del gen 9 del bacteriófago T3 y otros promotores divulgados en la Pat. de EE. UU. N.º 7.579.516. Otros promotores útiles con la invención incluyen, pero sin limitación, el promotor S-E9 de la subunidad pequeña de la RuBP-carboxilasa y el promotor del gen inhibidor de la tripsina de Kunitz (*Kti3*).

[00230] En algunas realizaciones de la invención, se pueden utilizar promotores inducibles. De este modo, por ejemplo, se pueden utilizar promotores regulados por agentes químicos para modular la expresión de un gen en una planta mediante la aplicación de un regulador químico exógeno. La regulación de la expresión de las secuencias de nucleótidos de la invención mediante promotores que se regulan químicamente hace posible que los polipéptidos de la invención se sinteticen solo cuando las plantas del cultivo se tratan con los agentes químicos inductores. Dependiendo del objetivo, el promotor puede ser un promotor inducible con

un agente químico, donde la aplicación de un agente químico induce la expresión génica, o un promotor reprimible con un agente químico, donde la aplicación del agente químico reprime la expresión génica. Algunos ejemplos de la tecnología de este tipo para la inducción química de la expresión génica se describe con detalle en la solicitud publicada EP 0 332 104 y la Patente de EE. UU. N.º 5,614,395.

[00231] Los promotores inducibles por agentes químicos son conocidos en la técnica e incluyen, sin carácter limitante, el promotor In2-2 del maíz, que es activado por protectores del herbicida bencenosulfonamida, el promotor GST de maíz, que es activado por compuestos electrófilos hidrófobos que se utilizan como herbicidas preemergencia, y el promotor PR-1 a del tabaco, que es activado por ácido salicílico (por ejemplo, el sistema PR1a), promotores sensibles a esteroides (remítase, por ejemplo, al promotor inducible por glucocorticoides en Schena *et al.* (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 10421-10425 y McNellis *et al.* (1998) *Plant J.* 14, 247-257) y promotores inducibles por tetraciclina y reprimibles por tetraciclina (véase, por ejemplo, Gatz *et al.* (1991) *Mol. Gen. Genet.* 227, 229-237 y las Patentes de EE. UU. N.ºs 5,814,618 y 5,789,156, promotores del sistema represor Lac, promotores del sistema inducible por cobre, promotores del sistema inducible por salicilato (por ejemplo, el sistema PR1a), promotores inducibles por glucocorticoides (Aoyama *et al.* (1997) *Plant J.* 11:605-612) y promotores del sistema inducible por ecdisona.

[00232] Otros ejemplos no limitantes de promotores inducibles incluyen promotores inducibles por ABA y turgencia, el promotor del gen de la proteína de unión a

auxina (Schwob *et al.* (1993) *Plant J.* 4:423-432), el promotor de la UDP glucosa flavonoide glucosil-transferasa (Ralston *et al.* (1988) *Genetics* 119:185-197), el promotor del inhibidor de la proteinasa MPI (Cordero *et al.* (1994) *Plant J.* 6:141-150), y el promotor de la gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (Kohler *et al.* (1995) *Plant Mol. Biol.* 29:1293-1298; Martinez *et al.* (1989) *J. Mol. Biol.* 208:551-565; y Quigley *et al.* (1989) *J. Mol. Evol.* 29:412-421). También se incluyen los sistemas inducibles por bencenosulfonamida (Patente de EE. UU. N.º 5,364,780) e inducibles por alcohol (Publicaciones de Solicitud de Patente Internacional N.º WO 97/06269 y WO 97/06268) y promotores de la glutatión S-transferasa. Asimismo, se puede emplear cualquiera de los promotores inducibles descritos en Gatz (1996) *Current Opinion Biotechnol.* 7:168-172 y Gatz (1997) *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48:89-108. En la Patente de EE. UU. 5,614,395 se divulgan otros promotores inducibles químicamente útiles para dirigir la expresión de las secuencias de nucleótidos de esta invención en plantas. La inducción química de la expresión génica también se describe con detalle en el documento EP 0 332 104 (concedido a Ciba-Geigy) y la Patente de EE. UU. 5,614,395.

[00233] Otra categoría de promotores útiles en la invención es la de los promotores inducibles por lesiones. Se han descrito numerosos promotores que son expresados en los sitios de las lesiones y también en los sitios de infección por fitopatógenos. Idealmente, un promotor de este tipo debería ser activo solamente a nivel local en los sitios de invasión del insecto y, de esta forma, las proteínas insecticidas solamente se acumularían en las células que

necesiten sintetizar las proteínas insecticidas para exterminar la plaga de insectos invasora. Los ejemplos de promotores de este tipo incluyen los descritos por Stanford et al. Mol. Gen. Genet. 215:200-208 (1989), Xu et al. Plant Molec. Biol. 22:573-588 (1993), Logemann et al. Plant Cell 1:151-158 (1989), Rohrmeier & Lehle, Plant Molec. Biol. 22:783-792 (1993), Firek et al. Plant Molec. Biol. 22:129-142 (1993), y Warner et al. Plant J. 3:191-201 (1993).

[00234] En las realizaciones, un ácido nucleico de la invención puede comprender, estar constituido esencialmente por, o estar constituido por un casete de expresión, o puede estar comprendido dentro de un casete de expresión.

[00235] Un casete de expresión que comprende un polinucleótido de interés puede ser quimérico, lo que significa que al menos uno de sus componentes es heterólogo con respecto a al menos otro de sus demás componentes. Un casete de expresión también puede ser uno de origen natural, pero que se ha obtenido en una forma recombinante útil para la expresión heteróloga. Normalmente, el casete de expresión es heterólogo con respecto al hospedador, es decir, la secuencia de ácido nucleico particular del casete de expresión no está presente de manera natural en la célula hospedadora y debe haber sido introducida en la célula hospedadora o en un antecesor de la célula hospedadora mediante un evento de transformación.

[00236] Además de los promotores asociados operativamente con las secuencias de nucleótidos de la invención, un casete de expresión de esta invención también puede incluir otros elementos reguladores. Los elementos reguladores incluyen, sin carácter limitante, potenciadores,

intrones, secuencias líder de la traducción, señales de terminación y secuencias señal de la poliadenilación. En la técnica existe constancia de ejemplos de señales de terminación de la transcripción adecuadas y se encuentran disponibles (por ejemplo, tml de CaMV, E9 de rbcS). Cualquier terminador disponible que se sabe que funciona en plantas se puede utilizar en el contexto de esta invención.

[00237] Se pueden incorporar otras muchas secuencias en los casetes de expresión descritos en esta invención. Estas incluyen secuencias que han mostrado potenciar la expresión tales como las secuencias intrónicas (por ejemplo, de Adhl y bronzel) y secuencias víricas líderes (por ejemplo, de TMV, MCMV y AMV).

[00238] Para un inicio más eficaz de la traducción, se pueden modificar las secuencias adyacentes a la metionina de inicio. Por ejemplo, se pueden modificar mediante la inclusión de secuencias que se sabe son eficaces en las plantas. Joshi ha propuesto un consenso apropiado para las plantas (NAR 15:6643-6653 (1987)) y Clonetech propone un iniciador de la traducción de consenso adicional (catálogo 1993/1994, página 210). Estos consensos son adecuados para su uso con las secuencias de nucleótidos de esta invención. Las secuencias se incorporan a las construcciones que comprenden las secuencias de nucleótidos, hasta e incluido el ATG (a la vez que se deja el segundo aminoácido sin modificaciones) o, como alternativa, hasta e incluido el GTC subsiguiente al ATG (con la posibilidad de modificar el segundo aminoácido del transgén).

[00239] En algunas realizaciones, puede ser deseable dirigir la expresión de los polipéptidos de la presente

invención a una ubicación celular específica en la célula vegetal. En algunos casos, puede ser deseable la localización en el citosol, mientras que en otros casos, se puede preferir la localización en algunos orgánulos subcelulares. Se puede utilizar cualquier mecanismo para dirigir productos génicos, por ejemplo, en plantas, con el fin de poner en práctica esta invención y se sabe que tales mecanismos existen en plantas y las secuencias que controlan el funcionamiento de estos mecanismos se han caracterizado con cierto detalle. Se han caracterizado las secuencias responsables de dirigir productos génicos hacia otros compartimentos celulares. Por ejemplo, las secuencias amino-terminales pueden ser responsables de dirigir una proteína de interés a un compartimento celular, tal como una vacuola, mitocondria, peroxisoma, cuerpos proteicos, retículo endoplasmático, cloroplasto, gránulo de almidón, amiloplasto, apoplasto o pared celular de una célula vegetal (por ejemplo, Unger et al. *Plant Molec. Biol.* 13: 411-418 (1989); Rogers et. al. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 6512-651; Patente de EE.UU. N.º 7,102,057; WO 2005/096704. Opcionalmente, la secuencia señal puede ser una secuencia señal N-terminal de un elemento céreo, una secuencia señal N-terminal de una gamma-zeína, un dominio de unión a almidón, un dominio de unión a almidón C-terminal, una secuencia que fija como objetivo al cloroplasto, que transporta la proteína madura al interior del cloroplasto (Comai et. al. (1988) *J. Biol. Chem.* 263: 15104-15109; van den Broeck, et. al. (1985) *Nature* 313: 358-363; Patente de EE.UU. n.º 5,639,949) o una secuencia señal de secreción de células aleuronas (Koehler y Ho, *Plant Cell* 2: 769-783 (1990)). Además, las secuencias amino-

terminales junto con las secuencias carboxi-terminales son responsables del direccionamiento a la vacuola de productos génicos y se pueden utilizar con la presente invención (Shinshi et al. (1990) Plant Molec. Biol. 14: 357-368). En una realización, la secuencia señal seleccionada incluye el sitio de escisión conocido y la construcción de fusión tiene en cuenta cualesquiera aminoácidos después del sitio o sitios de escisión que se requieren para la escisión. En algunos casos, este requisito se puede satisfacer mediante la adición de unos pocos aminoácidos entre el sitio de escisión y el ATG del transgén o, como alternativa, mediante la sustitución de algunos aminoácidos dentro de la secuencia del transgén. Estas técnicas de construcción son bien conocidas en la técnica y se pueden aplicar asimismo a cualquier compartimiento celular.

[00240] Se comprenderá que los mecanismos descritos anteriormente para la fijación como objetivo celular pueden utilizarse no solo junto con sus promotores análogos, sino también junto con promotores heterólogos con el fin de lograr un objetivo de fijación como objetivo celular específico bajo la regulación transcripcional de un promotor que tiene un patrón de expresión diferente del correspondiente al promotor del que se deriva la señal de fijación como objetivo.

[00241] Un casete de expresión de la invención también puede incluir una secuencia de nucleótidos para un marcador seleccionable, que se puede utilizar para seleccionar una planta, parte de la planta y/o célula vegetal transformada. Existen muchos ejemplos de marcadores seleccionables adecuados en la técnica y se pueden utilizar en los casetes de expresión descritos en la presente.

[00242] Los ejemplos de marcadores seleccionables incluyen, sin carácter limitante, una secuencia de nucleótidos que codifica neo o nptII, que confiere resistencia a la kanamicina, G418 y similares (Potrykus *et al.* (1985) *Mol. Gen. Genet.* 199:183-188); una secuencia de nucleótidos que codifica bar, que confiere resistencia a la fosfinotricina; una secuencia de nucleótidos que codifica una 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato (EPSP)-sintasa alterada, que confiere resistencia al glifosato (Hinchee *et al.* (1988) *Biotech.* 6:915-922); una secuencia de nucleótidos que codifica una nitrilasa tal como bxn de *Klebsiella ozaenae* que confiere resistencia al bromoxinilo (Stalker *et al.* (1988) *Science* 242:419-423); una secuencia de nucleótidos que codifica una acetolactato-sintasa (ALS) alterada que confiere resistencia a la imidazolinona, sulfonilurea u otros productos químicos que inhiben ALS (Solicitud de Patente Europea N.º 154204); una secuencia de nucleótidos que codifica una dihidrofolato-reductasa (DHFR) resistente al metotrexato (Thillet *et al.* (1988) *J. Biol. Chem.* 263:12500-12508); una secuencia de nucleótidos que codifica una dalapón-deshalogenasa que confiere resistencia al dalapón; una secuencia de nucleótidos que codifica una manosa-6-fosfato-isomerasa (denominada también fosfomanosa-isomerasa (PMI)) que confiere una capacidad para metabolizar manosa (Patentes de EE. UU. N.ºs 5,767,378 y 5,994,629); una secuencia de nucleótidos que codifica una antranilato-sintasa alterada que confiere resistencia al 5-metilriptófano; o una secuencia de nucleótidos que codifica hph que confiere resistencia a la higromicina. Un experto en la técnica puede

elegir un marcador seleccionable adecuado para su uso en un casete de expresión de esta invención.

[00243] Los marcadores seleccionables adicionales incluyen, sin carácter limitante, una secuencia de nucleótidos que codifica β -glucuronidasa o uidA (GUS) que codifica una enzima para la que se conocen varios sustratos cromogénicos; una secuencia de nucleótidos del locus R que codifica un producto que regula la producción de pigmentos de antocianina (color rojo) en tejidos vegetales (Dellaporta et al., "Molecular cloning of the maize R-nj allele by transposon-tagging with Ac" 263-282 en: Estructura y Función del Cromosoma: Impact of New Concepts, 18.º Simposio Sobre Genética Stadler (Gustafson y Appels eds., Plenum Press 1988)); una secuencia de nucleótidos que codifica β -lactamasa, una enzima para la que se conocen varios sustratos cromogénicos (por ejemplo, PADAC, una cefalosporina cromogénica) (Sutcliffe (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:3737-3741); una secuencia de nucleótidos que codifica xyle que codifica una catecol-dioxigenasa (Zukowsky et al. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:1101-1105); una secuencia de nucleótidos que codifica tirosinasa, una enzima capaz de oxidar tirosina para producir DOPA y dopaquinona, que a su vez condensa para formar melanina (Katz et al. (1983) *J. Gen. Microbiol.* 129:2703-2714); una secuencia de nucleótidos que codifica β -galactosidasa, una enzima para la que existen sustratos cromogénicos; una secuencia de nucleótidos que codifica luciferasa (lux) que permite la detección por bioluminiscencia (Ow et al. (1986) *Science* 234:856-859); una secuencia de nucleótidos que codifica aecuatorina que se puede emplear en la detección bioluminiscente sensible al calcio

(Prasher *et al.* (1985) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 126:1259-1268); o una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína fluorescente verde (Niedz *et al.* (1995) *Plant Cell Reports* 14:403-406). Un experto en la técnica puede elegir un marcador seleccionable adecuado para su uso en un casete de expresión de esta invención.

[00244] En algunas realizaciones, un casete de expresión de la invención también puede incluir polinucleótidos que codifiquen otros rasgos deseados además de las proteínas insecticidas quiméricas de la invención. Los ejemplos de otros polinucleótidos de este tipo incluyen los que codifican un polipéptido o un ARNs para el otro o los otros rasgos deseados de interés. Tales casetes de expresión que comprenden los rasgos "apilados" se pueden utilizar, por ejemplo, para crear plantas, partes de las plantas o células vegetales que tengan un fenotipo deseado con los rasgos apilados (es decir, apilamiento molecular). Tales combinaciones apiladas en plantas también se pueden crear mediante otros métodos incluido, sin carácter limitante, el cultivo selectivo cruzado de plantas mediante cualquier metodología convencional (es decir, un apilamiento por cultivo selectivo). Si se apilan mediante transformación genética de las plantas, las secuencias de nucleótidos de interés se pueden combinar en cualquier momento y en cualquier orden. Por ejemplo, se puede utilizar una planta transgénica que comprenda uno o más rasgos deseados como diana para introducir otros rasgos mediante una transformación posterior. Las secuencias de nucleótidos adicionales se pueden introducir simultáneamente en un protocolo de cotransformación con una secuencia de

nucleótidos, molécula de ácido nucleico, construcción de ácido nucleico o composición de esta invención, proporcionados mediante cualquier combinación de casetes de expresión. Por ejemplo, si se introducen dos secuencias de nucleótidos, estas se pueden incorporar en casetes separados (*trans*) o se pueden incorporar en el mismo casete (*cis*). La expresión de los polinucleótidos puede estar impulsada por el mismo promotor o por promotores diferentes. Se reconoce además que los polinucleótidos se pueden apilar en un sitio genómico deseado usando un sistema de recombinación específico para un sitio. Remítase, por ejemplo, a las Publicaciones de Solicitud de Patente Internacional N.^{os} WO 99/25821, WO 99/25854, WO 99/25840, WO 99/25855 y WO 99/25853.

[00245] En realizaciones representativas, el casete de expresión también puede incluir una secuencia codificante adicional de uno o más polipéptidos o moléculas de ARN bicatenario (ARNds) de interés para un rasgo agronómico (por ejemplo, un rasgo agronómico que sea beneficioso principalmente para una empresa de semillas, un agricultor o procesador de grano). Un polipéptido de interés puede ser cualquier polipéptido codificado por una secuencia de nucleótidos de interés. Los ejemplos no limitantes de polipéptidos de interés que son adecuados para la producción en plantas incluyen aquellos que dan como resultado rasgos importantes desde un punto de vista agronómico tales como la resistencia a herbicidas (también denominada en ocasiones "tolerancia a herbicidas"), resistencia a virus, resistencia a patógenos bacterianos, resistencia a insectos, resistencia a nematodos o resistencia a hongos. Véanse, por ejemplo, las

Patentes de EE.UU. N.º 5,569,823; 5,304,730; 5,495,071; 6,329,504; y 6,337,431. En las realizaciones, un polipéptido de interés puede ser uno que aumente el vigor o rendimiento de la planta (incluidos los rasgos que permiten que una planta se desarrolle a temperaturas, condiciones de suelo y niveles de luz solar y precipitación diferentes) o uno que permita identificar una planta que exhiba un rasgo de interés (por ejemplo, un marcador seleccionable, color del revestimiento de la semilla, etc.). Se describen diversos polipéptidos de interés, así como también métodos para introducir estos polipéptidos en una planta, por ejemplo, en las Patentes de EE.UU. N.º 4,761,373; 4,769,061; 4,810,648; 4,940,835; 4,975,374; 5,013,659; 5,162,602; 5,276,268; 5,304,730; 5,495,071; 5,554,798; 5,561,236; 5,569,823; 5,767,366; 5,879,903, 5,928,937; 6,084,155; 6,329,504 y 6,337,431; así como la Publicación de Patente de EE.UU. N.º 2001/0016956. Véase también a la dirección de Internet lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/.

[00246] En algunas realizaciones de la invención, también pueden ser adecuados polinucleótidos que confieren resistencia/tolerancia a un herbicida que inhibe el punto de crecimiento o meristemo, tal como una imidazolinona o una sulfonilurea. Los polinucleótidos ejemplares en esta categoría codifican enzimas ALS y AHAS mutantes, según se describe, por ejemplo, en las Patentes de EE. UU. N.º^{os} 5,767,366 y 5,928,937. Las Patentes de EE.UU. N.º 4,761,373 y 5,013,659 se refieren a plantas resistentes a diversos herbicidas de tipo imidazolinona o sulfonamida. La Patente de EE. UU. N.º 4,975,374 se refiere a células vegetales y plantas que contienen un ácido nucleico que codifica una

glutamina-sintasa (GS) mutante resistente a la inhibición por parte de herbicidas conocidos por inhibir GS, por ejemplo, fosfinotricina y metionina-sulfoximina. La Patente de EE. UU. N.º 5,162,602 describe plantas resistentes a la inhibición por parte de herbicidas de tipo ciclohexanodiona y ácido ariloxifenoxipropanoico. La resistencia se confiere mediante una acetilcoenzima A-carboxilasa (ACCase) modificada.

[00247] Los polipéptidos codificados por secuencias de nucleótidos que confieren resistencia a glifosato también son adecuados para la invención. Véanse, por ejemplo, a la Patente de EE. UU. N.º 4,940,835 y la Patente de EE. UU. N.º 4,769,061. La Patente de EE.UU. N.º 5,554,798 divulga plantas de maíz transgénicas resistentes a glifosato, cuya resistencia ha sido conferida por un gen de 5-enolpiruvil-3-fosfoshikimato (EPSP)-sintasa alterada.

[00248] También son adecuados los polinucleótidos que codifican resistencia a compuestos de tipo fosfono, tales como glufosinato amónico o fosfinotricina, y ácidos piridinoxi- o fenoxipropiónicos, y ciclohexonas. Véase, la Solicitud de Patente N.º 0 242 246. Véanse también las Patentes de EE.UU. n.º 5,879,903, 5,276,268 y 5,561,236.

[00249] Otros polinucleótidos adecuados incluyen los que codifican resistencia a herbicidas que inhiben la fotosíntesis, tales como una triazina y un benzonitrilo (nitrilasa). Véase a la Patente de EE. UU. N.º 4,810,648. Otros polinucleótidos adecuados que codifican resistencia a herbicidas incluyen los que codifican resistencia al ácido 2,2-dicloropropiónico, setoxidim, haloxifop, herbicidas de tipo imidazolinona, herbicidas de tipo sulfonilurea, herbicidas de tipo triazolopirimidina, herbicidas de tipo s-

triazina y bromoxinilo. También son adecuados los polinucleótidos que confieren resistencia a una enzima protox, o que proporcionan una mayor resistencia a enfermedades de plantas; una mayor tolerancia a condiciones medioambientales adversas (estrés abiótico), que incluyen, sin carácter limitante, sequía, frío excesivo, calor excesivo, o una acidez o alcalinidad extremas o una salinidad del suelo excesiva; y alteraciones de la estructura o el desarrollo de la planta, incluidos los cambios en el tiempo de desarrollo. Véanse, la Publicación de Patente de EE.UU. N.º 2001/0016956 y la Publicación de Patente de EE.UU. N.º 6,084,155.

[00250] Otros polinucleótidos adecuados incluyen los que codifican polipéptidos pesticidas (por ejemplo, insecticidas). Estos polipéptidos se pueden producir en cantidades suficientes para controlar, por ejemplo, plagas de insectos (es decir, cantidades que controlan insectos). En las realizaciones, el polipéptido es un polipéptido activo contra lepidópteros, activo contra coleópteros, activo contra hemípteros y/o activo contra dípteros, o cualquier combinación de estos. Se considera que la cantidad de producción de un polipéptido pesticida en una planta necesaria para controlar insectos u otras plagas puede variar dependiendo del cultivar, el tipo de plaga, factores medioambientales y similares. Polinucleótidos útiles para la resistencia adicional a insectos o plagas incluyen, por ejemplo, los que codifican toxinas identificadas en organismos *Bacillus*. Se han clonado polinucleótidos que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican proteínas Cry de *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) de varias subespecies y se

ha observado que los clones recombinantes son tóxicos para las larvas de insectos lepidópteros, dípteros y coleópteros. Los ejemplos de dichas proteínas insecticidas de *Bt* incluyen las proteínas Cry tal como Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1B, Cry1C, Cry1D, Cry1Ea, Cry1Fa, Cry3A, Cry9A, Cry9B, Cry9C, y similares, así como proteínas insecticidas vegetativas tales como Vip1, Vip2, Vip3, y similares, y cualquier combinación de las proteínas insecticidas de *Bt* anteriores. Se puede consultar una lista completa de proteínas derivadas de *Bt* en Internet, en la Base de Datos para la Nomenclatura de Toxinas de *Bacillus thuringiensis* de cuyo mantenimiento se encarga la Universidad de Sussex (véase también, Crickmore et al. (1998) Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62:807-813).

[00251] En las realizaciones, un polipéptido adicional es un polipéptido insecticida derivado de una fuente que no es *Bt*, incluidos, sin carácter limitante, una α amilasa, una peroxidasa, una colesterol-oxidasa, una patatina, una proteasa, un inhibidor de proteasas, una ureasa, un inhibidor de alfa-amilasa, una proteína que forma poros, una quitinasa, una lectina, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo modificado, una proteína insecticida de *Bacillus cereus*, una proteína insecticida de *Xenorhabdus* spp. (tales como *X. nematophila* o *X. bovienii*), una proteína insecticida de *Photorhabdus* spp. (tales como *P. luminescens* o *P. asymbiotica*), una proteína insecticida de *Brevibacillus* spp. (tales como *B. laterosporous*), una proteína insecticida de *Lysinibacillus* spp. (tales como *L. sphearicus*), una proteína insecticida de *Chromobacterium* spp. (tales como *C. subtsugae* o *C. piscinae*), una proteína insecticida de *Yersinia* spp. (tales como *Y. entomophaga*), una proteína insecticida de

Paenibacillus spp. (tales como *P. propylaea*), una proteína insecticida de *Clostridium* spp. (tales como *C. bifermentans*), una *Pseudomonas* spp. (tales como *P. fluorescens*) y una lignina.

[00252] Los polipéptidos que son adecuados para la producción en plantas incluyen además aquellos que mejoran o facilitan la conversión de plantas o partes de las plantas recolectadas en un producto comercialmente útil, lo que incluye, por ejemplo, una distribución o un contenido de carbohidratos mayor o modificado, unas propiedades de fermentación mejoradas, un mayor contenido oleoso, un mayor contenido proteico, una digestibilidad mejorada y un mayor contenido nutricional, por ejemplo, un mayor contenido de fitosterol, un mayor contenido de tocoferol, un mayor contenido de estanol o un mayor contenido vitamínico. Los polipéptidos de interés también incluyen, por ejemplo, aquellos que dan como resultado o que contribuyen a un contenido reducido de un componente indeseado en un cultivo recolectado, por ejemplo, ácido fítico o enzimas que degradan el azúcar. Se pretende que la expresión "que da como resultado" o "que contribuye a" se refiera a que el polipéptido de interés puede contribuir directa o indirectamente a la existencia de un rasgo de interés (por ejemplo, un aumento de la degradación de celulosa mediante el uso de una enzima de tipo celulasa heteróloga).

[00253] En algunas realizaciones, el polipéptido contribuye a obtener una digestibilidad mejorada de la comida o el pienso. Las xilanasas son enzimas hemicelulolíticas que mejoran la rotura de las paredes celulares de las plantas, lo que lleva a un mejor uso de los nutrientes de la planta por

parte de un animal. Esto provoca una tasa de crecimiento y una conversión del pienso mejoradas. Además, se puede reducir la viscosidad de los piensos que contienen xilano. La producción heteróloga de xilanasas en células vegetales también puede facilitar la conversión lignocelulósica en azúcares fermentables en procesamientos industriales.

[00254] Se han identificado y caracterizado numerosas xilanasas de microorganismos fúngicos y bacterianos (véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. N.º 5,437,992; Coughlin et al. (1993) "Proceedings of the Second TRICEL Symposium on Trichoderma reesei Cellulases and Other Hydrolases" Espoo; Souminen y Reinikainen, eds. (1993) Foundation for Biotechnical and Industrial Fermentation Research 8:125-135; Publicación de Patente de EE.UU. N.º 2005/0208178; y la Publicación PCT N.º WO 03/16654). En particular, se han identificado tres xilanasas específicas (XYL-I, XYL-II y XYL-III) en *T. reesei* (Tenkanen et al. (1992) Enzyme Microb. Technol. 14:566; Torronen et al. (1992) Bio/Technology 10:1461; y Xu et al. (1998) Appl. Microbiol. Biotechnol. 49:718).

[00255] En otras realizaciones, un polipéptido útil para la invención puede ser una enzima que degrade polisacáridos. Las plantas de esta invención que producen una enzima de este tipo pueden ser útiles para generar, por ejemplo, materias primas de fermentación para procesamientos biológicos. En algunas realizaciones, enzimas útiles para un proceso de fermentación incluyen alfa-amilasas, proteasas, pululanasa, isoamilasas, celulasas, hemicelulasas, xilanasas, ciclodextrina-glicotransferasas, lipasas, fitasas,

lacasas, oxidasas, esterases, cutinasas, enzimas que hidrolizan el almidón granular y otras glucoamilasas.

[00256] Las enzimas que degradan polisacáridos incluyen: enzimas que degradan almidón tales como α -amilasas (EC 3.2.1.1), glucuronidasas (E.C. 3.2.1.131); exo-1,4-alfa-D-glucanasas tales como amiloglucosidasas y glucoamilasa (EC 3.2.1.3), beta-amilasas (EC 3.2.1.2), alfa-glucosidasas (EC 3.2.1.20) y otras exo-amilasas; enzimas que desramifican el almidón tales como a) isoamilasa (EC 3.2.1.68), pululanasa (EC 3.2.1.41) y similares; b) celulasas tales como exo-1,4-3-celobiohidrolasa (EC 3.2.1.91), exo-1,3-beta-D-glucanasa (EC 3.2.1.39), beta-glucosidasa (EC 3.2.1.21); c) L-arabinasas tales como endo-1,5-alfa-L-arabinasa (EC 3.2.1.99), alfa-arabinosidasas (EC 3.2.1.55) y similares; d) galactanasas tales como endo-1,4-beta-D-galactanasa (EC 3.2.1.89), endo-1,3-beta-D-galactanasa (EC 3.2.1.90), alfa-galactosidasa (EC 3.2.1.22), beta-galactosidasa (EC 3.2.1.23) y similares; e) mananasas tales como endo-1,4-beta-D-mananasa (EC 3.2.1.78), beta-manosidasa (EC 3.2.1.25), alfa-manosidasa (EC 3.2.1.24) y similares; f) xilanasas tales como endo-1,4-beta-xilanasas (EC 3.2.1.8), beta-D-xilosidasa (EC 3.2.1.37), 1,3-beta-D-xilanasas y similares; y g) otras enzimas tales como alfa-L-fucosidasa (EC 3.2.1.51), alfa-L-ramnosidasa (EC 3.2.1.40), levanasa (EC 3.2.1.65), inulanasa (EC 3.2.1.7) y similares. En una realización, la alfa-amilasa es la alfa-amilasa sintética, Amy797E, descrita en la Patente de EE. UU. N.º 8,093,453.

[00257] Otras enzimas que se pueden emplear con la invención incluyen proteasas tales como proteasas fúngicas y bacterianas. Las proteasas fúngicas incluyen, sin carácter

limitante, las obtenidas de *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Mucor* y *Rhizopus*, tales como *A. niger*, *A. awamori*, *A. oryzae* y *M. miehei*. En algunas realizaciones, los polipéptidos de esta invención pueden ser enzimas de tipo celobiohidrolasa (CBH) (EC 3.2.1.91). En una realización, la enzima de tipo celobiohidrolasa puede ser CBH1 o CBH2.

[00258] Otras enzimas útiles con la invención incluyen, sin carácter limitante, hemicelulasas, tales como manasas y arabinofuranosidasas (EC 3.2.1.55); ligninasas; lipasas (por ejemplo, E.C. 3.1.1.3), glucosa-oxidasas, pectinasas, xilanasas, transglucosidasas, alfa-1,6-glucosidasas (por ejemplo, E.C. 3.2.1.20); esterasas tales como ácido ferúlico-esterasa (EC 3.1.1.73) y acetilxilano-esterasas (EC 3.1.1.72); y cutinasas (por ejemplo, E.C. 3.1.1.74).

[00259] Las moléculas de ARN bicatenario (ARNds) útiles con la invención incluyen, sin carácter limitante, aquellas que suprimen genes de plagas (por ejemplo, insectos) diana. En las realizaciones, al ARNds tiene como diana un gen en una plaga de insectos lepidópteros, coleópteros, hemípteros o dípteros, o cualquier combinación de los anteriores. Se pretende que las palabras "supresión génica", tal como se utilizan en la presente, cuando se consideran conjuntamente, se refieran a cualquiera de los métodos conocidos para reducir los niveles de una proteína producida como resultado de la transcripción génica en ARNm y la traducción posterior del ARNm. También se pretende que la supresión génica se refiera a la reducción de la expresión de la proteína procedente de un gen o una secuencia codificante, lo que incluye la supresión génica posterior a la

transcripción y la supresión de la transcripción. La supresión génica posterior a la transcripción está mediada por la homología entre la totalidad o parte de un ARNm transcrito a partir de un gen o secuencia codificante que actúa como diana para la supresión y el ARN bicatenario correspondiente utilizado para la supresión, y se refiere a la reducción sustancial y medible de la cantidad de ARNm disponible en la célula para unirse a los ribosomas. El ARN transcrito se puede encontrar en la orientación sentido para realizar lo que se denomina cosupresión, en la orientación antisentido para realizar lo que se denomina supresión antisentido, o en ambas orientaciones lo cual produce un ARNs para realizar lo que se denomina interferencia por ARN (ARNi). La supresión de la transcripción está mediada por la presencia en la célula de un ARNs, un agente de supresión génica, que muestra una identidad de secuencia sustancial con una secuencia de ADN promotora o el complemento de esta para realizar lo que se conoce como una supresión trans del promotor. La supresión génica puede ser eficaz frente a un gen vegetal nativo asociado con un rasgo, por ejemplo, para proporcionar a las plantas unos niveles menores de una proteína codificada por el gen nativo o unos niveles menores o potenciados de un metabolito afectado. La supresión génica también puede ser eficaz frente a genes diana en plagas de plantas que pueden ingerir o entrar en contacto con material vegetal que contiene agentes de supresión génica, diseñados específicamente para inhibir o suprimir la expresión de una o más secuencias complementarias u homólogas en las células de la plaga. Genes de este tipo dirigidos a la supresión pueden codificar una proteína esencial, cuya función predicha se

selecciona del grupo que consiste en la formación de los músculos, la formación de la hormona juvenil, la regulación de la hormona juvenil, la regulación y el transporte de iones, la síntesis de enzimas digestivas, el mantenimiento del potencial de la membrana celular, la biosíntesis de aminoácidos, la degradación de aminoácidos, la formación de esperma, la síntesis de feromonas, la sensibilización de feromonas, la formación de antenas, la formación de alas, la formación de patas, desarrollo y diferenciación, la formación del huevo, la maduración larval, la formación de enzimas digestivas, la síntesis de hemolinfa, el mantenimiento de la hemolinfa, la neurotransmisión, la división celular, el metabolismo energético, la respiración y la apoptosis.

[00260] En las realizaciones, los ácidos nucleicos de la invención pueden comprender además, estar constituidos esencialmente por, o estar constituidos por un vector. En las realizaciones, los polinucleótidos y casetes de expresión de la invención están comprendidos en un vector. Los vectores para su uso en la transformación de plantas y otros organismos son muy conocidos en la técnica. Los ejemplos no limitantes de clases generales de vectores incluyen un plásmido, vector de fago, vector fagémido, vector cósmido, fósido, bacteriófago, cromosoma artificial o un vector viral. En las realizaciones, el vector es un vector vegetal, por ejemplo, para su uso en la transformación de plantas. En las realizaciones, el vector es un vector bacteriano, por ejemplo, para su uso en la transformación de bacterias. Los vectores adecuados para plantas, bacterias y otros organismos son de uso común en la técnica.

Plantas, partes de las plantas, células vegetales y semillas transgénicas.

[00261] La invención también engloba una célula hospedadora transgénica no humana que comprende un polinucleótido, una molécula de ácido nucleico, un casete de expresión, un vector o un polipéptido de la invención. La célula hospedadora transgénica no humana puede incluir, sin carácter limitante, una célula vegetal (incluida una célula monocotiledónea y/o una célula dicotiledónea), una célula de levadura, una célula bacteriana o una célula de insectos. Por consiguiente, en algunas realizaciones, la invención proporciona una célula bacteriana seleccionada a partir de los géneros *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Clostridium*, *Xenorhabdus*, *Photorhabdus*, *Pasteuria*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Serratia*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Pasteurella*, *Xanthomonas*, *Streptomyces*, *Rhizobium*, *Rhodopseudomonas*, *Methylophilus*, *Agrobacterium*, *Acetobacter*, *Lactobacillus*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Leuconostoc* o *Alcaligenes*. De este modo, por ejemplo, como agentes de control de insectos biológicos, las proteínas insecticidas quiméricas de la invención pueden ser producidas mediante la expresión de un polinucleótido que las codifica en una célula bacteriana. Por ejemplo, en algunas realizaciones se proporciona una célula de *Bacillus thuringiensis* que comprende un polinucleótido que codifica una proteína insecticida quimérica de la invención.

[00262] En las realizaciones, la célula vegetal transgénica es una célula vegetal dicotiledónea o una célula vegetal monocotiledónea. En realizaciones adicionales, la célula vegetal dicotiledónea es una célula de soja, una

célula de girasol, una célula de tomate, una célula del género *Brassica*, una célula de algodón, una célula de remolacha azucarera o una célula de tabaco. En realizaciones adicionales, la célula monocotiledónea es una célula de cebada, una célula de maíz, una célula de avena, una célula de arroz, una célula de sorgo, una célula de caña de azúcar o una célula de trigo. En las realizaciones, la invención proporciona una pluralidad de células dicotiledóneas o células monocotiledóneas que comprenden un polinucleótido que expresa una proteína insecticida quimérica de la invención. En las realizaciones, la pluralidad de células se yuxtaponen para formar un apoplasto y se cultivan con luz solar natural. En las realizaciones, la célula vegetal transgénica no puede regenerar una planta entera.

[00263] En las realizaciones de la invención, una proteína insecticida de la invención se expresa en un organismo superior, por ejemplo, una planta. En este caso, las plantas transgénicas que expresan cantidades eficaces de la proteína insecticida se autoprotegen contra las plagas de plantas, tales como plagas de insectos. Cuando un insecto comienza a alimentarse de una planta transgénica de este tipo, ingiere la proteína insecticida expresada. Esto puede disuadir al insecto de volver a atacar el tejido de la planta o incluso puede dañar o aniquilar al insecto. En las realizaciones, un polinucleótido de la invención se inserta en un casete de expresión, que después se integra de forma estable en el genoma de la planta. En otras realizaciones, el polinucleótido está incluido en un virus autorreplicante no patógeno.

[00264] En algunas realizaciones de la invención, una célula vegetal transgénica que comprende una molécula de ácido nucleico o polipéptido de la invención es una célula de una parte de la planta, un órgano vegetal o un cultivo vegetal (cada uno tal como se describe en la presente) que incluye, sin carácter limitante, una raíz, una hoja, una semilla, una flor, una fruta, una célula de polen, un órgano o cultivo vegetal, y similares, o una célula del callo o cultivo.

[00265] Una planta o célula vegetal transgénica de acuerdo con la invención puede ser una planta o célula vegetal monocotiledónea o dicotiledónea e incluye, sin carácter limitante, maíz, soja, arroz, trigo, cebada, centeno, avena, sorgo, mijo, girasol, cártamo, remolacha azucarera, algodón, caña de azúcar, colza oleaginosa, alfalfa, tabaco, maní, verduras (incluidos batata, poroto, arveja, achicoria, lechuga, repollo, coliflor, brócoli, nabo, zanahoria, berenjena, pepino, rábano, espinaca, papa, tomate, espárrago, cebolla, ajo, melones, pimiento, apio, zapallo, calabaza, calabacita y similares), frutas (incluidos manzana, pera, membrillo, ciruela, cereza, durazno, nectarina, damasco, frutilla, uva, frambuesa, grosella negra, piña, aguacate, papaya, mango, plátano y similares), una planta o célula vegetal especializada (tal como *Arabidopsis*) o una planta o célula vegetal leñosa (tal como árboles caducifolios y/o coníferas). En las realizaciones, una planta o célula vegetal de la invención es una planta o célula vegetal de un cultivo tal como una planta o célula vegetal de maíz, sorgo, trigo, girasol, tomate, una crucífera, pimiento, papa,

algodón, arroz, soja, remolacha azucarera, caña de azúcar, tabaco, cebada, colza oleaginosa y similares.

[00266] La invención proporciona además una parte de una planta transgénica de la invención. Opcionalmente, la parte de la planta comprende una proteína insecticida quimérica de la invención y/o un ácido nucleico que la codifica.

[00267] La invención proporciona además una semilla de una planta transgénica de la invención o una semilla que produce la planta transgénica de la invención. Opcionalmente, la semilla comprende una proteína insecticida quimérica de la invención y/o un ácido nucleico que la codifica.

[00268] Realizaciones adicionales de la invención incluyen productos recolectados producidos a partir de las plantas, partes de las plantas o semillas transgénicas de la invención, así como también un producto procesado producido a partir del producto recolectado. Un producto recolectado puede ser una planta entera o cualquier parte de la planta, tal como se describe en la presente. De este modo, en algunas realizaciones, los ejemplos no limitantes de un producto recolectado incluyen una semilla, una fruta, una flor o una parte de esta (por ejemplo, una antera, un estigma y similares), una hoja, un tallo y similares. En otras realizaciones, un producto procesado incluye, sin carácter limitante, harina, grano molido, aceite, almidón, cereales y similares, producidos a partir de una semilla u otra parte de la planta recolectada de la invención. . Opcionalmente, el producto recolectado o el producto procesado comprende una proteína insecticida quimérica de la invención y/o un ácido nucleico que la codifica.

[00269] En otras realizaciones, la invención proporciona un extracto de una planta, parte de la planta o transgénica de la invención, opcionalmente donde el extracto comprende una proteína insecticida quimérica de la invención y/o un ácido nucleico que la codifica. Los extractos de plantas o partes de las plantas se pueden preparar de acuerdo con procedimientos de uso común en la técnica (remítase a de la Torre *et al.*, *Food, Agric. Environ.* 2(1):84-89 (2004); Guidet, *Nucleic Acids Res.* 22(9): 1772-1773 (1994); Lipton *et al.*, *Food Agric. Immun.* 12:153-164 (2000)).

[00270] La proteína insecticida quimérica puede actuar en la parte de la planta, célula vegetal, órgano vegetal, semilla, producto recolectado, extracto o producto procesado, y similares, como un agente de control de insectos. En otras palabras, la proteína insecticida quimérica puede seguir realizando la función insecticida que tenía en la planta transgénica. El ácido nucleico puede actuar para expresar la proteína insecticida quimérica. Como una alternativa para codificar la proteína insecticida de la invención, el ácido nucleico puede actuar para identificar una parte de la planta, célula vegetal, órgano vegetal, semilla, producto recolectado, extracto o producto procesado transgénicos de la invención.

[00271] En las realizaciones, una planta, parte de la planta, célula vegetal, órgano vegetal o semilla transgénicos de la invención es hemicígoto para un polinucleótido o casete de expresión de la invención. En las realizaciones, una planta, parte de la planta, célula vegetal, órgano vegetal o semilla transgénicos de la invención es homocigoto para un polinucleótido o casete de expresión de la invención.

[00272] En las realizaciones, una planta, parte de la planta, célula vegetal, órgano vegetal, semilla, producto recolectado, producto procesado o extracto transgénicos tiene una mayor resistencia a una o más plagas de insectos (por ejemplo, una plaga de lepidópteros, tal como el cogollero del maíz) en comparación con un control adecuado que no comprende un ácido nucleico que codifica una proteína insecticida de la invención.

Transformación de plantas.

[00273] Los procedimientos para transformar plantas son muy conocidos y de uso rutinario en la técnica y se describen en la bibliografía. Los ejemplos no limitantes de métodos para transformar plantas incluyen la transformación mediante el suministro de ácidos nucleicos mediado por bacterias (por ejemplo, mediante *Agrobacterium*), suministro de ácidos nucleicos mediado por virus, suministro de ácidos nucleicos mediado por carburo de silicio o filamentos finos de ácidos nucleicos, suministro de ácidos nucleicos mediado por liposomas, microinyección, bombardeo de micropartículas, transformación mediada por fosfato de calcio, transformación mediada por ciclodextrinas, electroporación, transformación mediada por nanopartículas, sonicación, infiltración, captación de ácidos nucleicos mediada por polietilenglicol, así como también cualquier otro mecanismo eléctrico, químico, físico (mecánico) o biológico que dé como resultado la introducción de ácido nucleico en la célula vegetal, incluidas cualquiera de sus combinaciones. Algunas guías generales de diversos métodos de transformación de plantas conocidos en la técnica incluyen Miki et al. ("Procedures for Introducing Foreign DNA into Plants" en *Methods in Plant*

Molecular Biology and Biotechnology, Glick, B. R. y Thompson, J. E., Eds. (CRC Press, Inc., Boca Raton, 1993), páginas 67-88) y Rakowoczy-Trojanowska (Cell. Mol. Biol. Lett. 7:849-858 (2002)).

[00274] Para la transformación mediada por *Agrobacterium*, son por lo general adecuados los vectores binarios o vectores portadores de al menos una secuencia frontera de ADN-T, mientras que para la transferencia directa de genes (por ejemplo, bombardeo de partículas y similares) cualquier vector es adecuado y se puede emplear ADN lineal que contenga únicamente la construcción de interés. En el caso de la transferencia directa de genes, se puede emplear la transformación con una sola especie de ADN o cotransformación (Schocher et al., *Biotechnology* 4:1093- 1096 (1986)). Tanto para la transferencia directa de genes como para la transferencia mediada por *Agrobacterium*, la transformación se suele llevar a cabo (pero no necesariamente) con un marcador seleccionable, que puede ser una selección positiva (por ejemplo, fosfomana-isomerasa), presentar resistencia a un antibiótico (por ejemplo, kanamicina, higromicina o metotrexato) o a un herbicida (por ejemplo, glifosato o glufosinato). Sin embargo, la selección del marcador seleccionable no es crucial para la invención.

[00275] La transformación mediada por *Agrobacterium* es un método utilizado comúnmente para la transformación de plantas debido a su alta eficacia de transformación y debido a su amplia utilidad con muchas especies diferentes. La transformación mediada por *Agrobacterium* normalmente implica la transferencia del vector binario portador de ADN exógeno de interés a una cepa de *Agrobacterium* adecuada que puede

depender del complemento de genes *vir* portados por la cepa hospedadora de *Agrobacterium* en un plásmido Ti corresidente o cromosómicamente (Uknes et al. (1993), *Plant Cell* 5:159-169). La transferencia del vector binario recombinante a *Agrobacterium* se puede realizar mediante un procedimiento de apareamiento triparental utilizando *Escherichia coli* que porte el vector binario recombinante, una cepa adyuvante de *E. coli* que porte un plásmido que sea capaz de movilizar el vector binario recombinante hasta la cepa de *Agrobacterium* diana. Alternativamente, el vector binario recombinante puede ser transferido a *Agrobacterium* mediante transformación con ácidos nucleicos (Höfgen & Willmitzer (1988) *Nucleic Acids Res.* 16:9877).

[00276] Tanto las monocotiledóneas como las dicotiledóneas se pueden transformar utilizando *Agrobacterium*. Los métodos para la transformación de arroz mediada por *Agrobacterium* incluyen métodos muy conocidos para la transformación de arroz tales como los que se describen en cualquiera de los siguientes documentos: Solicitud de patente europea EP 1198985 A1, Aldemita y Hodges (*Planta* 199: 612-617, 1996); Chan et al. (*Plant Mol Biol* 22 (3): 491-506, 1993), Hiei et al. (*Plant J* 6 (2): 271-282, 1994), cuyas descripciones se incorporan al presente documento por referencia como si se hubiesen expuesto en su totalidad. En el caso de la transformación de maíz, el método preferido es como se describe en Ishida et al. (*Nat. Biotechnol* 14(6): 745-50, 1996) o Frame et al. (*Plant Physiol* 129(1): 13-22, 2002), cuyas descripciones se incorporan al presente documento por referencia como si se hubiesen expuesto en su totalidad. Dichos métodos se describen adicionalmente a modo

de ejemplo en B. Jenes et al., *Techniques for Gene Transfer*, en: *Transgenic Plants*, Vol. 1, Engineering and Utilization, eds. S. D. Kung y R. Wu, Academic Press (1993) 128-143 y en Potrykus *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol.* 42 (1991) 205-225). Los ácidos nucleicos o la construcción que se han de expresar se clonan preferentemente en un vector, que sea adecuado para transformar *Agrobacterium tumefaciens*, por ejemplo, pBin19 (Bevan et al., *Nucl. Acids Res.* 12 (1984) 8711). A continuación, el *Agrobacterium* transformado mediante un vector de este tipo se puede utilizar de forma conocida para la transformación de plantas tales como plantas utilizadas como modelo, por ejemplo, *Arabidopsis* o plantas de cultivo tales como, a modo de ejemplo, plantas de tabaco, por ejemplo, sumergiendo hojas magulladas u hojas troceadas en una solución de *Agrobacterium* y a continuación cultivándolas en un medio adecuado. La transformación de plantas mediante *Agrobacterium tumefaciens* ha sido descrita, por ejemplo, por Hagen y Willmitzer en *Nucl. Acid Res.* (1988) 16, 9877 o es conocida, entre otros, de F. F. White, *Vectors for Gene Transfer in Higher Plants*; en *Transgenic Plants*, Vol. 1, Engineering and Utilization, eds. S. D. Kung y R. Wu, Academic Press, 1993, págs. 15-38.

[00277] La transformación de una planta por *Agrobacterium* recombinante suele implicar el cultivo conjunto de *Agrobacterium* con explantes de la planta y sigue métodos muy conocidos en la técnica. El tejido transformado se regenera en un medio de selección que porta un marcador de resistencia a antibióticos o herbicidas presente entre los bordes del ADN-T plasmídico binario.

[00278] Según se ha comentado previamente, otro método para transformar plantas, partes de plantas y células vegetales implica la introducción propulsada de partículas inertes o biológicamente activas en tejidos y células vegetales. Remítase, por ejemplo, a las Patentes de EE. UU. N.ºs 4,945,050, 5,036,006 y 5,100,792. En general, este método implica la introducción propulsada de partículas inertes o biológicamente activas hacia el interior de las células vegetales en condiciones eficaces para que atraviesen la superficie externa de la célula y consigan incorporarse en el interior de esta. Cuando se utilizan partículas inertes, el vector puede introducirse en la célula recubriendo las partículas con el vector que contiene el ácido nucleico de interés. Como alternativa, la célula o células pueden estar rodeadas por el vector de tal manera que la estela de la partícula porte el vector al interior de la célula. También se pueden propulsar partículas biológicamente activas (por ejemplo, una célula de levadura desecada, una bacteria desecada o un bacteriófago, donde cada uno de los cuales contiene uno o más ácidos nucleicos que se desean introducir) hacia el interior del tejido vegetal.

[00279] En otras realizaciones, un polinucleótido de la invención se puede utilizar para transformar directamente el genoma plastídico. Una ventaja principal de la transformación plastídica es que los plástidos son, por lo general, capaces de expresar genes bacterianos sin modificación sustancial, y los plástidos son capaces de expresar múltiples marcos abiertos de lectura controlados por un único promotor. La tecnología de transformación plastídica se describe exhaustivamente en las Patentes de EE.UU. N.º

5,451,513, 5,545,817, y 5,545,818, en la solicitud PCT n.º WO 95/16783, y en McBride et al. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 7301-7305. La técnica básica para la transformación de cloroplastos implica introducir regiones de ADN plastídico clonado que flanquean un marcador seleccionable junto con el gen de interés en un tejido diana adecuado, por ejemplo, utilizando transformación biolística o del protoplasto (por ejemplo, transformación mediada por cloruro de calcio o PEG). Las regiones flanqueantes de 1 a 1.5 kb, denominadas secuencias de direccionamiento, facilitan la recombinación homóloga con el genoma plastídico y de esta forma permiten la sustitución o modificación de regiones específicas del plastoma. Inicialmente, las mutaciones puntuales en los genes *rps12* y *ARNr 16S* de cloroplasto que confieren resistencia a espectinomicina o estreptomicina se pueden utilizar como marcadores seleccionables para la transformación (Svab, Z., Hajdukiewicz, P., y Maliga, P. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 8526-8530; Staub, J. M., y Maliga, P. (1992) *Plant Cell* 4, 39-45). La presencia de sitios de clonación entre estos marcadores permite la creación de un vector de direccionamiento al plástido para introducir genes exógenos (Staub, J.M., y Maliga, P. (1993) *EMBO J.* 12, 601-606). Se pueden obtener aumentos sustanciales en la frecuencia de transformación reemplazando genes recesivos de resistencia a antibióticos de proteína-r o *ARNr* con un marcador seleccionable dominante, el gen *aadA* bacteriano que codifica la enzima detoxificante de espectinomicina aminoglucósido-3'-adeniltransferasa (Svab, Z., y Maliga, P. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 913-917). Previamente, este marcador se había usado satisfactoriamente para la transformación de alta

frecuencia del genoma plastídico de la alga verde *Chlamydomonas reinhardtii* (Goldschmidt-Clermont, M. (1991) *Nucl. Acids Res.* 19:4083-4089). Existen en la técnica otros marcadores seleccionables útiles para la transformación plastídica y estos quedan incluidos en el alcance de la invención. Normalmente, se requieren aproximadamente 15-20 ciclos de división celular después de la transformación para alcanzar un estado homoplastídico. La expresión plastídica, en la que los genes se insertan por recombinación homóloga en la totalidad de los varios miles de copias del genoma plastídico circular presentes en cada célula vegetal, aprovecha la ventaja que supone el enorme número de copias en comparación con los genes expresados en el núcleo para obtener niveles de expresión que pueden exceder fácilmente el 10% de la proteína vegetal soluble total. En una realización, un polinucleótido de la invención se puede insertar en un vector de direccionamiento al plástido y utilizar para transformar el genoma plastídico de un hospedador vegetal deseado. De este modo, se pueden obtener plantas homoplásticas para los genomas plastídicos que contienen una secuencia de nucleótidos de la invención, que son capaces de presentar una elevada expresión del polinucleótido.

[00280] Los métodos para seleccionar plantas, células vegetales o cultivos de tejidos vegetales transgénicos transformados son de uso habitual en la técnica y se pueden emplear en los métodos de la invención proporcionados en la presente. Por ejemplo, un vector recombinante de la invención también puede incluir un casete de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos para un marcador de selección,

que se puede utilizar para seleccionar una planta, parte de planta o célula vegetal transformada.

[00281] Además, como es bien sabido en la técnica, se pueden regenerar plantas transgénicas intactas a partir de células vegetales, cultivos de tejidos vegetales o protoplastos cultivados transformados empleando cualquiera de las diferentes técnicas conocidas. La regeneración de plantas a partir de células vegetales, cultivos de tejidos vegetales o protoplastos cultivados se describe, por ejemplo, en Evans et al. (Handbook of Plant Cell Cultures, Vol. 1, MacMilan Publishing Co. Nueva York (1983)); y Vasil I. R. (ed.) (Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants, Acad. Press, Orlando, Vol. I (1984), y Vol. II (1986)).

[00282] Además, las propiedades genéticas modificadas en las semillas y plantas, partes de las plantas o células vegetales transgénicas de la invención descritas anteriormente se pueden transmitir por reproducción sexual o crecimiento vegetativo y, por lo tanto, se pueden mantener y propagar en las plantas de la progenie. Generalmente, el mantenimiento y la propagación hacen uso de métodos conocidos en agricultura desarrollados para adaptarse a propósitos específicos tales como la recolección, siembra o labranza.

[00283] Por consiguiente, un polinucleótido se puede introducir en la planta, parte de planta o célula vegetal de varias formas muy conocidas en la técnica, según se ha descrito previamente. Por lo tanto, no es necesario un método particular para introducir uno o más polinucleótidos en una planta, en su lugar se puede emplear cualquier método que permita que uno o más polinucleótidos se integren de manera estable en el genoma de la planta. Cuando deba introducirse

más de un polinucleótido, los polinucleótidos respectivos se pueden agrupar como parte de una única molécula de ácido nucleico o como moléculas separadas de ácidos nucleicos, y pueden estar situados en la misma molécula de ácido nucleico o en moléculas diferentes. Por consiguiente, los polinucleótidos pueden introducirse en la célula de interés en un único evento de transformación, en eventos de transformación separados o, por ejemplo, en plantas, como parte de un protocolo de cultivo selectivo.

[00284] Una vez que el polinucleótido deseado se ha transformado en una especie vegetal particular, se puede propagar en esa especie o trasladar a otras variedades de la misma especie, incluidas en particular las variedades comerciales, utilizando técnicas tradicionales de cultivo selectivo.

Composiciones insecticidas.

[00285] En algunas realizaciones, la invención proporciona una composición insecticida que comprende una proteína insecticida quimérica de la invención en un portador agrícolamente aceptable. Tal como se utiliza en la presente, un "portador agrícolamente aceptable" puede incluir un material orgánico o inorgánico, natural o sintético que se combina con la proteína activa para facilitar su aplicación a o en la planta o parte de esta. Los ejemplos de portadores agrícolamente aceptables incluyen, sin limitación, material pulverizado, polvos, microesferas, gránulos, aerosoles, emulsiones, coloides y soluciones. Portadores agrícolamente aceptables incluyen además, sin carácter limitante, componentes inertes, dispersantes, tensioactivos, adyuvantes, adherentes, adhesivos, aglutinantes o combinaciones de estos,

que se puedan emplear en formulaciones agrícolas. Estas composiciones se pueden aplicar de cualquier forma que ponga las proteínas plaguicidas u otros agentes de control de plagas en contacto con las plagas. Por consiguiente, las composiciones se pueden aplicar a las superficies de las plantas o partes de plantas, incluidas las semillas, hojas, flores, tallos, tubérculos, raíces y similares. En otras realizaciones, una planta que produce una proteína insecticida de la invención in planta es un portador agrícola aceptable de la proteína insecticida expresada. En las realizaciones, las composiciones y portadores agrícola aceptables de la invención excluyen las plantas transgénicas.

[00286] En realizaciones adicionales, la composición insecticida comprende una célula bacteriana o una célula bacteriana transgénica de la invención, donde la célula bacteriana o célula bacteriana transgénica produce una proteína insecticida de la invención. Una composición insecticida de este tipo se puede preparar mediante desecación, liofilización, homogenización, extracción, filtración, centrifugación, sedimentación o concentración de un cultivo de *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), incluido un cultivo de *Bt* transgénico. En las realizaciones, una composición de la invención puede comprender al menos aproximadamente un 1%, al menos aproximadamente un 5%, al menos aproximadamente un 10%, al menos aproximadamente un 20%, al menos aproximadamente un 25%, al menos aproximadamente un 30%, al menos aproximadamente un 35%, al menos aproximadamente un 40%, al menos aproximadamente un 50%, al menos aproximadamente un 60%, al menos

aproximadamente un 70%, al menos aproximadamente un 80%, al menos aproximadamente un 90%, al menos aproximadamente un 95%, al menos aproximadamente un 97%, o al menos un 99% en peso de un polipéptido de la invención. En realizaciones adicionales, la composición comprende desde aproximadamente un 1% hasta aproximadamente un 99% en peso de la proteína insecticida de la invención.

[00287] Las proteínas insecticidas de la invención se pueden utilizar combinadas con otros agentes de control de plagas para aumentar el espectro de plagas diana y/o para la prevención o la gestión de la resistencia a insectos. Además, el uso de las proteínas insecticidas de la invención en combinación con un agente insecticida que tiene un modo de acción diferente o actúa sobre un receptor diferente en el intestino del insecto tiene utilidad particular para la prevención y/o gestión de la resistencia de los insectos.

[00288] Por lo tanto, en algunas realizaciones, la invención proporciona una composición que controla una o más plagas de insectos (por ejemplo, una plaga de insectos tal como una plaga de insectos lepidópteros, una plaga de insectos coleópteros, una plaga de insectos hemípteros y/o una plaga de insectos dípteros), donde la composición comprende un primer agente de control de plagas, el cual es una proteína insecticida quimérica de la invención, y al menos un segundo agente de control de plagas que es diferente del primer agente de control de plagas. En otras realizaciones, la composición es una formulación para la aplicación tópica a una planta. En otras realizaciones más, la composición es una planta transgénica. En realizaciones adicionales, la composición es una combinación de una

formulación aplicada por vía tópica a una planta transgénica. En algunas realizaciones, la formulación comprende el primer agente de control de plagas, el cual es una proteína insecticida quimérica de la invención, cuando la planta transgénica comprende el segundo agente de control de plagas. En otras realizaciones, la formulación comprende el segundo agente de control de plagas cuando la planta transgénica comprende el primer agente de control de plagas, el cual es una proteína insecticida quimérica de la invención.

[00289] En algunas realizaciones, el segundo agente de control de plagas puede ser uno o más de un pesticida químico, tal como un insecticida, una proteína insecticida de *Bacillus thuringiensis* (Bt) y/o un agente insecticida que no procede de Bt incluidos, sin carácter limitante, una proteína insecticida de *Xenorhabdus*, una proteína insecticida de *Photorhabdus*, una proteína insecticida de *Brevibacillus laterosporus*, una proteína insecticida de *Bacillus sphaericus*, un inhibidor de proteasas (tanto del tipo serina como cisteína), una lectina, una alfa-amilasa, una peroxidasa, una colesterol-oxidasa o una molécula de ARN bicatenario (ARNds).

[00290] En otras realizaciones, el segundo agente de control de plagas, el cual es opcionalmente un recubrimiento de semillas, es uno o más pesticidas químicos. Los ejemplos no limitantes de pesticidas químicos incluyen piretroides, carbamatos, neonicotinoides, bloqueadores de los canales de sodio neuronales, lactonas macrocíclicas insecticidas, antagonistas del ácido gamma-aminobutírico (GABA), ureas insecticidas y miméticos de hormonas juveniles. En otras realizaciones, el pesticida químico es uno o más de

abamectina, acefato, acetamiprid, amidoflumet (S-1955), avermectina, azadiractina, azinfós-metilo, bifentrina, binfenazato, buprofezina, carbofurano, clorfenapir, clorfluazurón, clorpirifós, clorpirifós-metilo, cromafenozida, clotianidina, ciflutrina, beta-ciflutrina, cihalotrina, lambda-cihalotrina, cipermetrina, ciromazina, deltametrina, diafentiurón, diazinón, diflubenzurón, dimetoato, diofenolán, emamectina, endosulfán, esfenvalerato, etiprol, fenoticarb, fenoxicarb, fenpropatrina, fenproximato, fenvalerato, fipronil, flonicamid, flucitrinato, tau-fluvalinato, flufenerim (UR-50701), flufenoxurón, fonofós, halofenozida, hexaflumurón, imidacloprid, indoxacarb, isofenfós, lufenurón, malatión, metaldehído, metamidofós, metidatió, metomilo, metopreno, metoxiclor, monocrotofós, metoxifeno, nitiazina, novalurón, noviflumurón (XDE-007), oxamilo, paratió, paratió-metilo, permetrina, forato, fosadona, fosmet, fosfamidón, pirimicarb, profenofós, pimetrozina, piridalilo, piriproxifeno, rotenona, espinosad, espiromesifeno (BSN 2060), sulprofós, tebufenozida, teflubenzurón, teflutrina, terbufós, tetraclorvinfós, tiacloprid, tiametoxam, tiodicarb, tiosultap-sodio, tralometrina, triclorfón y triflumurón, aldicarb, oxamilo, fenamifós, amitraz, quinometionat, clorobencilato, cihexatina, dicofol, dienoclor, etoxazol, fenazaquin, óxido de fenbutatina, fenpropatrina, fenpiroximato, hexitiazox, propargita, piridabeno y tebufenpirad. En otras realizaciones más, el pesticida químico se selecciona entre uno o más de cipermetrina, cihalotrina, ciflutrina y beta-ciflutrina, esfenvalerato, fenvalerato, tralometrina, fenoticarb, metomilo, oxamilo, tiodicarb, clotianidina, imidacloprid,

tiacloprid, indoxacarb, espinosad, abamectina, avermectina, emamectina, endosulfán, etiprol, fipronilo, flufenoxurón, triflumurón, diofenolano, piriproxifeno, pimetozina y amitraz.

[00291] En realizaciones adicionales, el segundo agente de control de plagas puede ser uno o más de cualquier número de proteínas insecticidas de *Bacillus thuringiensis* incluidas, sin carácter limitante, una proteína Cry, una proteína insecticida vegetativa (VIP, por sus siglas en inglés) y quimeras insecticidas de cualquiera de las proteínas insecticidas anteriores. En otras realizaciones, el segundo agente de control de plagas es una proteína Cry seleccionada entre: Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ad, Cry1Ae, Cry1Af, Cry1Ag, Cry1Ah, Cry1Ai, Cry1Aj, Cry1Ba, Cry1Bb, Cry1Bc, Cry1D a, Cry1Be, Cry1Bf, Cry1Bg, Cry1Bh, Cry1Bi, Cry1Ca, Cry1Cb, Cry1Da, Cry1Db, Cry1Dc, Cry1Dd, Cry1Ea, Cry1Eb, Cry1Fa, Cry1Fb, Cry1Ga, Cry1Gb, Cry1Gc, Cry1Ha, Cry1Hb, Cry1Hc, Cry1Ia, Cry1Ib, Cry1Ic, Cry1Id, Cry1Ie, Cry1If, Cry1Ig, Cry1Ja, Cry1Jb, Cry1Jc, Cry1Jd, Cry1Ka, Cry1La, Cry1Ma, Cry1Na, Cry1Nb, Cry2Aa, Cry2Ab, Cry2Ac, Cry2Ad, Cry2Ae, Cry2Af, Cry2Ag, Cry2Ah, Cry2Ai, Cry2Aj, Cry2Ak, Cry2Al, Cry2Ba, Cry3Aa, Cry3Ba, Cry3Bb, Cry3Ca, Cry4Aa, Cry4Ba, Cry4Ca, Cry4Cb, Cry4Cc, Cry5Aa, Cry5Ab, Cry5Ac, Cry5Ad, Cry5Ba, Cry5Ca, Cry5Da, Cry5Ea, Cry6Aa, Cry6Ba, Cry7Aa, Cry7Ab, Cry7Ac, Cry7Ba, Cry7Bb, Cry7Ca, Cry7Cb, Cry7Da, Cry7Ea, Cry7Fa, Cry7Fb, Cry7Ga, Cry7Gb, Cry7Gc, Cry7Gd, Cry7Ha, Cry7Ia, Cry7Ja, Cry7Ka, Cry7Kb, Cry7La, Cry8Aa, Cry8Ab, Cry8Ac, Cry8Ad, Cry8Ba, Cry8Bb, Cry8Bc, Cry8Ca, Cry8Da, Cry8Db, Cry8Ea, Cry8Fa, Cry8Ga, Cry8Ha, Cry8Ia, Cry8Ib, Cry8Ja, Cry8Ka, Cry8Kb, Cry8La,

Cry8Ma, Cry8Na, Cry8Pa, Cry8Qa, Cry8Ra, Cry8Sa, Cry8Ta,
Cry9Aa, Cry9Ba, Cry9Bb, Cry9Ca, Cry9Da, Cry9Db, Cry9Dc,
Cry9Ea, Cry9Eb, Cry9Ec, Cry9Ed, Cry9Ee, Cry9Fa, Cry9Ga,
Cry10Aa, Cry11Aa, Cry11Ba, Cry11Bb, Cry12Aa, Cry13Aa, Cry14Aa,
Cry14Ab, Cry15Aa, Cry16Aa, Cry17Aa, Cry18Aa, Cry18Ba,
Cry18Ca, Cry19Aa, Cry19Ba, Cry19Ca, Cry20Aa, Cry20Ba,
Cry21Aa, Cry21Ba, Cry21Ca, Cry21Da, Cry21Ea, Cry21Fa,
Cry21Ga, Cry21Ha, Cry22Aa, Cry22Ab, Cry22Ba, Cry22Bb,
Cry23Aa, Cry24Aa, Cry24Ba, Cry24Ca, Cry25Aa, Cry26Aa,
Cry27Aa, Cry28Aa, Cry29Aa, Cry29Ba, Cry30Aa, Cry30Ba,
Cry30Ca, Cry30Da, Cry30Db, Cry30Ea, Cry30Fa, Cry30Ga, Cry31Aa,
Cry31Ab, Cry31Ac, Cry31Ad, Cry32Aa, Cry32Ab, Cry32Ba,
Cry32Ca, Cry32Cb, Cry32Da, Cry32Ea, Cry32Eb, Cry32Fa,
Cry32Ga, Cry32Ha, Cry32Hb, Cry32Ia, Cry32Ja, Cry32Ka,
Cry32La, Cry32Ma, Cry32Mb, Cry32Na, Cry32Oa, Cry32Pa,
Cry32Qa, Cry32Ra, Cry32Sa, Cry32Ta, Cry32Ua, Cry33Aa,
Cry34Aa, Cry34Ab, Cry34Ac, Cry34Ba, Cry35Aa, Cry35Ab,
Cry35Ac, Cry35Ba, Cry36Aa, Cry37Aa, Cry38Aa, Cry39Aa,
Cry40Aa, Cry40Ba, Cry40Ca, Cry40Da, Cry41Aa, Cry41Ab,
Cry41Ba, Cry42Aa, Cry43Aa, Cry43Ba, Cry43Ca, Cry43Cb,
Cry43Cc, Cry44Aa, Cry45Aa, Cry46Aa, Cry46Ab, Cry47Aa, Cry48Aa,
Cry48Ab, Cry49Aa, Cry49Ab, Cry50Aa, Cry50Ba, Cry51Aa,
Cry52Aa, Cry52Ba, Cry53Aa, Cry53Ab, Cry54Aa, Cry54Ab,
Cry54Ba, Cry55Aa, Cry56Aa, Cry57Aa, Cry57Ab, Cry58Aa,
Cry59Aa, Cry59Ba, Cry60Aa, Cry60Ba, Cry61Aa, Cry62Aa,
Cry63Aa, Cry64Aa, Cry65Aa, Cry66Aa, Cry67Aa, Cry68Aa,
Cry69Aa, Cry69Ab, Cry70Aa, Cry70Ba, Cry70Bb, Cry71Aa,
Cry72Aa, Cry73Aa, o cualquier combinación de las anteriores.
En las realizaciones, la proteína Cry es una Cry1Fa, por

ejemplo, tal como se representa mediante el evento de maíz TC1507.

[00292] En realizaciones adicionales, el segundo agente de control de plagas es una o más de las proteínas insecticidas vegetativas Vip3 seleccionadas de Vip3Aa1, Vip3Aa2, Vip3Aa3, Vip3Aa4, Vip3Aa5, Vip3Aa6, Vip3Aa7, Vip3Aa8, Vip3Aa9, Vip3Aa10, Vip3Aa11, Vip3Aa12, Vip3Aa13, Vip3Aa14, Vip3Aa15, Vip3Aa16, Vip3Aa17, Vip3Aa18, Vip3Aa19, Vip3Aa20, Vip3Aa21, Vip3Aa22, Vip3Aa23, Vip3Aa24, Vip3Aa25, Vip3Aa26, Vip3Aa27, Vip3Aa28, Vip3Aa29, Vip3Aa30, Vip3Aa31, Vip3Aa32, Vip3Aa33, Vip3Aa34, Vip3Aa35, Vip3Aa36, Vip3Aa37, Vip3Aa38, Vip3Aa39, Vip3Aa40, Vip3Aa41, Vip3Aa42, Vip3Aa43, Vip3Aa44, Vip3Ab1, Vip3Ab2, Vip3Ac1, Vip3Ad1, Vip3Ad2, Vip3Ae1, Vip3Af1, Vip3Af2, Vip3Af3, Vip3Ag1, Vip3Ag2, Vip3Ag3, Vip3Ag4, Vip3Ag5, Vip3Ah1, Vip3Ba1, Vip3Ba2, Vip3Bb1, Vip3Bb2, Vip3Bb3, o cualquier combinación de las anteriores. En las realizaciones, la proteína Vip3 es Vip3Aa (Patente de EE. UU. N.º 6,137,033), por ejemplo, según se representa mediante el evento de maíz MIR162 (Patente de EE. UU. N.º 8,232,456; Patente de EE. UU. N.º 8,455,720; y Patente de EE. UU. N.º 8,618,272).

[00293] En las realizaciones, el segundo agente de control de plagas se puede obtener a partir de otras fuentes que no son *B. thuringiensis*. Por ejemplo, el segundo agente de control de plagas puede ser una α amilasa, una peroxidasa, una colesterol-oxidasa, una patatina, una proteasa, un inhibidor de proteasas, una ureasa, un inhibidor de alfa-amilasa, una proteína que forma poros, una quitinasa, una lectina, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo modificado, una proteína insecticida de *Bacillus cereus*, una proteína

insecticida de *Xenorhabdus* spp. (tales como *X. nematophila* o *X. bovienii*), una proteína insecticida de *Photorhabdus* spp. (tales como *P. luminescens* o *P. asymobiotica*), una proteína insecticida de *Brevibacillus* spp. (tales como *B. laterosporous*), una proteína insecticida de *Lysinibacillus* spp. (tales como *L. sphaericus*), una proteína insecticida de *Chromobacterium* spp. (tales como *C. subtsugae* o *C. piscinae*), una proteína insecticida de *Yersinia* spp. (tales como *Y. entomophaga*), una proteína insecticida de *Paenibacillus* spp. (tales como *P. propylaea*), una proteína insecticida de *Clostridium* spp. (tales como *C. bifermentans*), una *Pseudomonas* spp. (tales como *P. fluorescens*) y una lignina. En otras realizaciones, el segundo agente puede ser al menos una proteína insecticida obtenida a partir de un complejo de toxina insecticida (Tc) de *Photorhabdus*, *Xenorhabdus*, *Serratia* o *Yersinia*. En otras realizaciones, la proteína insecticida puede ser una ADP-ribosiltransferasa obtenida a partir de una bacteria insecticida, tal como *Photorhabdus* spp. En otras realizaciones, la proteína insecticida puede ser una proteína VIP, tal como VIP1 y/o VIP2 de *B. cereus*. En otras realizaciones más, la proteína insecticida puede ser una toxina binaria obtenida a partir de una bacteria insecticida, tal como ISP1A e ISP2A de *B. laterosporous* o BinA y BinB de *L. sphaericus*. En otras realizaciones más, la proteína insecticida puede estar modificada o puede ser un híbrido o una quimera de cualquiera de las proteínas insecticidas anteriores.

[00294] En algunas realizaciones, el segundo agente pesticida puede ser no proteínaceo, por ejemplo, una molécula de ARN interferente tal como un ARNds, el cual se puede

expresar trangénicamente o aplicar como parte de una composición (por ejemplo, utilizando métodos tópicos). Un ARN interferente comprende típicamente al menos un fragmento de ARN contra un gen diana, una secuencia espaciadora y un segundo fragmento de ARN que es complementario al primero, de modo que se pueda formar una estructura de ARN bicatenario. La interferencia por ARN (ARNi) ocurre cuando un organismo reconoce moléculas de ARN bicatenario (ARNds) y las hidroliza. Los productos de hidrólisis resultantes son fragmentos de ARN pequeños con una longitud de aproximadamente 19-24 nucleótidos denominados ARN interferentes pequeños (ARNsi). Los ARNsi difunden o son transportados a continuación por todo el organismo, incluso a través de las membranas celulares, donde se hibridan con ARNm (u otros ARN) y provocan la hidrólisis del ARN. Los ARN interferentes son reconocidos por el complejo de silenciamiento por interferencia por ARN (RISC, por sus siglas en inglés) en el que se integra una hebra efectora (o "hebra guía") del ARN. Esta hebra guía actúa como un molde para el reconocimiento y la destrucción de las secuencias dúplex. Este proceso se repite cada vez que el ARNsi se hibrida con su ARN diana complementario, lo que evita de forma eficaz que esos ARNm se traduzcan y "silencia" así la expresión de genes específicos a partir de los cuales se transcribieron los ARNm. En la técnica existe constancia de ARN interferentes que son útiles para el control de insectos (véase, por ejemplo, la publicación WO 2013/192256, incorporada a modo de referencia a este documento). Un ARN interferente diseñado para su uso en el control de insectos produce un ARN bicatenario que no tiene un origen natural,

que aprovecha las rutas de ARNi nativas en el insecto para activar la represión regulada de genes diana que pueden dar lugar al cese de la alimentación y/o el crecimiento y pueden provocar la muerte de la plaga de insectos. La molécula de ARN interferente puede conferir resistencia a insectos contra la misma plaga diana que la proteína de la invención, o puede tener como diana una plaga diferente. La plaga de plantas de insectos diana puede alimentarse masticando, chupando o perforando. En la técnica existe constancia de ARN interferentes que son útiles para el control de insectos. En las realizaciones, el ARNs útil para el control de insectos se describe en las Aplicaciones Provisionales de EE. UU. N.^{os} 62/371,259, 62/371,261 o 62/371,262, presentadas el 5 de agosto de 2016. En las realizaciones, el ARNs útil para el control de insectos se describe en las Patentes de EE. UU. N.^{os} 9,238,8223, 9,340, 797 u 8,946,510. En las realizaciones, el ARNs útil para el control de insectos se describe en las Solicitudes de Patente de EE. UU. N.^{os} 12/868,994, 13/831, 230, 14/207,313 o 14/207318. En otras realizaciones, el ARN interferente puede conferir resistencia contra una plaga de plantas que no son insectos, tal como una plaga de nematodos o una plaga de virus.

[00295] En más realizaciones adicionales, el primer agente de control de insectos, el cual es una proteína insecticida quimérica de la invención y el segundo agente de control de plagas se coexpresan en una planta transgénica. Esta coexpresión de más de un principio pesticida en la misma planta transgénica se puede conseguir modificando genéticamente una planta para que contenga y exprese las secuencias de ácidos nucleicos que codifican los agentes de

control de insectos. Por ejemplo, la coexpresión de más de un agente pesticida en la misma planta transgénica se puede conseguir preparando un único vector recombinante que comprenda secuencias codificantes de más de un agente pesticida en un "apilamiento molecular" y modificando genéticamente una planta para que contenga y exprese todos los agentes pesticidas en la planta transgénica. Dichos apilamientos moleculares también se pueden preparar utilizando minicromosomas tal como se describe, por ejemplo, en la patente de EE. UU. 7,235,716. Como alternativa, una planta, Progenitor 1, se puede modificar genéticamente para que exprese la proteína insecticida quimérica de la invención. Se puede modificar genéticamente una segunda planta, Progenitor 2, para que exprese el segundo agente de control de plagas. Al cruzar el Progenitor 1 con el Progenitor 2 se obtiene una progenie de plantas que expresan ambos agentes de control de insectos de los Progenitores 1 y 2.

[00296] En otras realizaciones, la invención proporciona una planta transgénica apilada resistente a la infestación por parte de una plaga de plantas que comprende una secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, ADN) que codifica un ARNd para suprimir un gen esencial en una plaga diana y una secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, ADN) que codifica una proteína insecticida quimérica de la invención que muestra actividad insecticida contra la plaga diana. Se ha publicado que los ARNds son ineficaces contra ciertas plagas de lepidópteros (Rajagopol et al. 2002. J. Biol. Chem. 277:468-494), probablemente debido al pH elevado del intestino medio que desestabiliza el ARNd. Por lo tanto,

en algunas realizaciones donde la plaga diana es una plaga de lepidópteros, una proteína insecticida quimérica de la invención actúa para reducir de manera transitoria el pH del intestino medio lo que estabiliza el ARNs ingerido conjuntamente y hace que el ARNs sea eficaz para silenciar los genes diana.

[00297] Las plantas o semillas transgénicas que comprenden y/o expresan una proteína insecticida de la invención también se pueden tratar con un insecticida o recubrimiento de semillas insecticida como se describe en las Patentes de EE.UU. N.ºs 5,849,320 y 5,876,739. En las realizaciones, cuando tanto el insecticida o recubrimiento de semillas insecticida como la planta o semilla transgénica de la invención sean activos contra el mismo insecto diana, por ejemplo, una plaga de lepidópteros (por ejemplo, cogollero del maíz), la combinación es útil (i) en un método para potenciar aún más la actividad de la composición de la invención contra el insecto diana y/o (ii) en un método para prevenir el desarrollo de resistencia a la composición de la invención proporcionando otro mecanismo más de acción contra el insecto diana. De este modo, en las realizaciones, la invención proporciona un método para potenciar el control de una población de insectos lepidópteros, que comprende proporcionar una planta o semilla transgénica de la invención y aplicar a la planta o la semilla un insecticida o recubrimiento de semillas insecticida a una planta o semilla transgénica de la invención.

[00298] Incluso cuando el insecticida o recubrimiento de semillas insecticida es activo contra un insecto diferente, el insecticida o recubrimiento de semillas

insecticida es útil para ampliar la gama de control de insectos, por ejemplo, añadiendo un insecticida o recubrimiento de semillas insecticida que tiene actividad contra insectos coleópteros a una semilla transgénica de la invención que, en algunas realizaciones, tiene actividad contra insectos lepidópteros, la semilla transgénica recubierta producida controla tanto plagas de insectos lepidópteros como coleópteros.

Métodos para generar y utilizar proteínas insecticidas quiméricas, ácidos nucleicos y plantas transgénicas.

[00299] La invención también engloba métodos para producir una planta transgénica resistente a insectos (por ejemplo, resistente a insectos lepidópteros). En realizaciones representativas, el método comprende: introducir en una planta un polinucleótido, casete de expresión o vector de la invención que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína insecticida quimérica de la invención (incluidos fragmentos de toxina y formas modificadas que son sustancialmente idénticos a los polipéptidos divulgados específicamente en la presente), donde la secuencia de nucleótidos se expresa en la planta para producir la proteína insecticida quimérica de la invención, conferir de esta manera a la planta resistencia a la plaga de insectos y producir una planta transgénica resistente a insectos (por ejemplo, en comparación con una planta de control adecuada, tal como una planta que no comprende el polinucleótido, casete de expresión o vector de la invención y/o no expresa un polipéptido de la invención).

[00300] En las realizaciones, el método para introducir el polinucleótido, casete de expresión o vector de

la invención en la planta comprende primero transformar una célula vegetal con el polinucleótido, casete de expresión o vector y regenerar una planta transgénica a partir de esta, donde la planta transgénica comprende el polinucleótido, casete de expresión o vector y expresa la proteína insecticida quimérica de la invención.

[00301] Como alternativa, o además, el paso de introducción puede comprender cruzar una primera planta que comprende el polinucleótido, casete de expresión o vector con una segunda planta (por ejemplo, una planta diferente de la primera planta, por ejemplo, una planta que no comprende el polinucleótido, casete de expresión o vector) y, opcionalmente, producir una planta de la progenie que comprende el polinucleótido, casete de expresión o vector y expresa una proteína insecticida quimérica de la invención, lo que da como resultado de esta manera una mayor resistencia a al menos una plaga de insectos. De este modo, una planta transgénica de la invención engloba una planta que es el resultado directo de un evento de transformación y la progenie de esta (de cualquier generación) que comprende el polinucleótido, casete de expresión o vector y opcionalmente expresa la proteína insecticida quimérica, lo que da como resultado una mayor resistencia a al menos una plaga de insectos.

[00302] La invención proporciona además un método para identificar una planta transgénica de la invención, comprendiendo el método detectar la presencia de un polinucleótido, casete de expresión, vector o proteína insecticida quimérica de la invención en una planta (o una célula vegetal, parte de la planta y similares derivados de

esta), e identificar de esta manera la planta como una planta transgénica de la invención en función de la presencia del polinucleótido, casete de expresión, vector o una proteína insecticida quimérica de la invención.

[00303] La invención proporciona además un método para producir una planta transgénica con una mayor resistencia a al menos una plaga de insectos (por ejemplo, al menos una plaga de lepidópteros), comprendiendo el método: plantar una semilla que comprende un polinucleótido, casete de expresión o vector de la invención y cultivar una planta transgénica a partir de la semilla, donde la planta transgénica comprende el polinucleótido, casete de expresión o vector y produce la proteína insecticida quimérica.

[00304] En las realizaciones, las plantas transgénicas producidas por los métodos de la invención comprenden un polinucleótido, casete de expresión o vector de la invención. En las realizaciones, una planta transgénica producida por los métodos de la invención comprende una proteína insecticida quimérica de la invención y, opcionalmente, tiene una mayor resistencia a al menos una plaga de insectos.

[00305] Los métodos para producir una planta transgénica descritos en la presente comprenden opcionalmente un paso adicional de recolectar una semilla a partir de la planta transgénica, donde la semilla comprende el polinucleótido, casete de expresión o vector y produce la proteína insecticida quimérica. Opcionalmente, la semilla produce una planta transgénica adicional que comprende el polinucleótido, casete de expresión o vector y produce la proteína insecticida quimérica, y de esta manera tiene una mayor resistencia a al menos una plaga de insectos.

[00306] La invención proporciona además partes de las plantas, células vegetales, órganos vegetales, cultivos vegetales, semillas, extractos vegetales, productos recolectados y productos procesados de las plantas transgénicas producidas mediante los métodos de la invención.

[00307] Como un aspecto adicional, la invención también proporciona un método para producir semillas, comprendiendo el método: proporcionar una planta transgénica que comprende un polinucleótido, casete de expresión o vector de la invención y recolectar una semilla a partir de la planta transgénica, donde la semilla comprende el polinucleótido, casete de expresión, vector y produce la proteína insecticida quimérica. Opcionalmente, la semilla produce una planta transgénica adicional que comprende el polinucleótido, casete de expresión o vector y produce la proteína insecticida quimérica, y de esta manera tiene una mayor resistencia a al menos una plaga de insectos. En realizaciones representativas, el paso de proporcionar la planta transgénica comprende plantar una semilla que produzca la planta transgénica.

[00308] La invención proporciona además un método para producir una semilla de la planta híbrida, comprendiendo el método: cruzar una primera planta endogámica, la cual es una planta transgénica que comprende un polinucleótido, casete de expresión o vector de la invención, y expresar opcionalmente una proteína insecticida quimérica de la invención con una planta endogámica diferente (por ejemplo, una planta endogámica que no comprende un polinucleótido, casete de expresión o vector de la invención) y permitir que se forme una semilla híbrida. Opcionalmente, el método comprende

además recolectar una semilla híbrida. En las realizaciones, la semilla híbrida comprende el polinucleótido, casete de expresión o vector de la invención, y en las realizaciones puede comprender además una proteína insecticida quimérica de la invención y tener una mayor resistencia a una plaga de insectos. En las realizaciones, la semilla híbrida produce una planta transgénica que comprende el polinucleótido, casete de expresión o vector de la invención, expresa la proteína insecticida quimérica de la invención y tiene una mayor resistencia a al menos una plaga de insectos.

[00309] En algunas realizaciones, una planta transgénica de la invención es resistente a al menos una plaga de insectos lepidópteros (tal como se describe en la presente). En las realizaciones, la planta transgénica controla una colonia o plaga de insectos que son cogolleros del maíz que es resistente a Vip3A (por ejemplo, una proteína Vip3Aa, por ejemplo, tal como se expresa en el evento de maíz MIR162) y/o una proteína Cry1F (por ejemplo, una proteína Cry1Fa, por ejemplo, tal como se expresa en el evento de maíz TC1507).

[00310] En realizaciones adicionales, un método para controlar al menos una plaga de insectos (por ejemplo, al menos una plaga de insectos lepidópteros, tales como el cogollero del maíz) comprende proporcionar una proteína insecticida quimérica de la invención. En las realizaciones, el método comprende administrar (por ejemplo, administrar por vía oral) a la plaga de insectos o un entorno de estos, una cantidad eficaz de una proteína insecticida quimérica de la invención. Por lo general, para que sea eficaz, el polipéptido es ingerido por el insecto por vía oral. Sin

embargo, la proteína insecticida quimérica se puede administrar al insecto de muchas formas reconocidas. Las formas para administrar por vía oral una proteína a un insecto incluyen, pero sin limitación, proporcionar la proteína (1) en una planta transgénica, donde el insecto come (ingiere) una o más partes de la planta transgénica, de este modo ingiere el polipéptido que se expresa en la planta transgénica; (2) en una o más composiciones proteicas formuladas que se pueden aplicar o incorporar, por ejemplo, al medio de crecimiento del insecto; (3) en una o más composiciones proteicas que se pueden aplicar a la superficie, por ejemplo, pulverizar sobre la superficie de una parte de la planta, que a continuación es ingerida por el insecto cuando el insecto come una o más de las partes de la planta pulverizadas; (4) una matriz de cebo; o (5) cualquier otro sistema de administración de proteínas reconocido en la técnica. De este modo, se puede emplear cualquier método de suministro oral a un insecto para suministrar las proteínas tóxicas de la invención. En algunas realizaciones particulares, la proteína insecticida quimérica de la invención se administra por vía oral a un insecto, por ejemplo, donde el insecto ingiere una o más partes de una planta transgénica de la invención.

[00311] En otras realizaciones, la proteína insecticida de la invención se suministra por vía oral a un insecto, donde el insecto ingiere una o más partes de una planta pulverizada con una composición que comprende la proteína insecticida de la invención. El suministro de la composición de la invención a la superficie de una planta se puede llevar a cabo empleando cualquier método conocido por

los expertos en la técnica para aplicar compuestos, composiciones, formulaciones y similares a superficies de plantas. Algunos ejemplos no limitantes de suministro o de puesta en contacto con una planta o parte de esta incluyen pulverización, espolvoreación, aspersión, dispersión, nebulización, atomización, difusión, remojo, inyección al suelo, incorporación al suelo, empapamiento (por ejemplo, tratamiento del suelo o las raíces), inmersión, vertido, recubrimiento, infiltración en el tallo o las hojas, recubrimiento lateral o tratamiento de semillas y similares, y combinaciones de estos. Estos y otros procedimientos para poner en contacto una planta o parte de esta con uno o más compuestos, una o más composiciones o una o más formulaciones son de uso común para los expertos en la técnica.

[00312] En realizaciones adicionales, la invención proporciona un método para controlar una plaga de insectos lepidópteros que es resistente a una proteína Vip3A (por ejemplo, una proteína Vip3Aa, por ejemplo, tal como se expresa mediante el evento de maíz MIR162) y/o una proteína Cry1F (por ejemplo, una proteína Cry1Fa, por ejemplo, tal como se expresa mediante el evento de maíz TC1507) que comprende suministrar al insecto lepidóptero o un entorno de este una cantidad eficaz de una composición o proteína insecticida quimérica de la invención. En realizaciones representativas, la plaga de insectos resistente es una colonia o plaga de insectos que son cogolleros del maíz resistente.

[00313] En otras realizaciones, la invención proporciona un método para evitar el desarrollo de resistencia en una población de una plaga de insectos

lepidópteros diana a una proteína Vip3A (por ejemplo, una proteína Vip3Aa, por ejemplo, como se expresa por el evento de maíz MIR162) y/o Cry1F (por ejemplo, una proteína Cry1Fa, por ejemplo, como se expresa mediante el evento de maíz TC1507) expresada en una planta transgénica, comprendiendo el método administrar a la población diana una planta transgénica que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína Vip3A y/o una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína Cry1F; y un polinucleótido, casete de expresión o vector de la invención que expresa una proteína insecticida quimérica de la invención. En algunas realizaciones, la plaga de insectos lepidópteros diana es el cogollero del maíz. De acuerdo con las realizaciones anteriores, la planta transgénica puede comprender un apilamiento por cultivo selectivo de dos o más de los rasgos insecticidas, un apilamiento molecular de dos o más de los rasgos insecticidas, o una combinación de ambos.

[00314] En algunas realizaciones, la invención abarca un método para proporcionar a un agricultor un medio para controlar una plaga de insectos (por ejemplo, una plaga de lepidópteros, tal como el cogollero del maíz), comprendiendo el método suministrar o vender al agricultor material vegetal tal como una semilla, comprendiendo el material vegetal un polinucleótido, casete de expresión, vector capaz de expresar una proteína insecticida quimérica de la invención. En las realizaciones, el material vegetal comprende la proteína insecticida quimérica de la invención y, opcionalmente, tiene una mayor resistencia a al menos una plaga de insectos. En las realizaciones, el material vegetal es una semilla, y una planta cultivada a partir de la semilla comprende el

polinucleótido, casete de expresión o vector de la invención, expresa una proteína insecticida quimérica de la invención y tiene una mayor resistencia a dicha al menos una plaga de insectos.

[00315] Además de proporcionar composiciones, la invención proporciona métodos para producir una proteína insecticida quimérica tóxica para una plaga de lepidópteros. Un método de este tipo comprende cultivar una célula hospedadora transgénica no humana que comprende un polinucleótido, casete de expresión o vector de la invención que expresa una proteína insecticida quimérica de la invención en condiciones en las que la célula hospedadora produce la proteína insecticida quimérica que es tóxica para la plaga de lepidópteros. En algunas realizaciones, la célula hospedadora transgénica no humana es una célula vegetal. En algunas realizaciones distintas, la célula vegetal es una célula de maíz. En otras realizaciones, las condiciones en las que la célula vegetal o célula de maíz se cultivan incluyen la luz solar natural. En otras realizaciones, la célula hospedadora transgénica no humana es una célula bacteriana. En otras realizaciones más, la célula hospedadora transgénica no humana es una célula de levadura.

[00316] En algunas realizaciones, los métodos de la invención proporcionan control de al menos una plaga de insectos lepidópteros, incluidos, sin carácter limitante, uno o más de los siguientes: *Ostrinia* spp. tal como *O. nubilalis* (gusano barrenador europeo del maíz) y/o *O. furnacalis* (barrenador asiático del maíz); *Plutella* spp. tal como *P. xylostella* (polilla de las coles); *Spodoptera* spp. tal como *S. frugiperda* (cogolleros del maíz), *S. littoralis* (oruga de

la hoja del algodón egipcio), *S. ornithogalli* (cogollero de rayas amarillas), *S. praeifica* (cogollero de rayas amarillas occidental), *S. eridania* (cogollero del sur) y/o *S. exigua* (cogollero de la remolacha); *Agrotis* spp. tal como *A. ipsilon* (gusano cortador negro), *A. segetum* (gusano cortador común), *A. gladiaria* (gusano cortador granuloso), y/o *A. orthogonia* (gusano cortador pálido del oeste); *Striacosta* spp. tal como *S. albicosta* (gusano cortador del poroto del oeste); *Helicoverpa* spp. tal como *H. zea* (gusano elotero), *H. punctigera* (isoca), y/o *H. armigera* (isoca bolillera); *Heliothis* spp. tal como *H. virescens* (cogollero del tabaco); *Diatraea* spp. tal como *D. grandiosella* (barrenador del maíz del suroeste) y/o *D. saccharalis* (barrenador de la caña de azúcar); *Trichoplusia* spp. tal como *T. ni* (oruga de la col); *Sesamia* spp. tal como *S. nonagroides* (barrenador del maíz mediterráneo) y/o *S. calamistis* (barrenador del tallo rosado); *Pectinophora* spp. tal como *P. gossypiella* (lagarta rosada); *Cochylis* spp. tal como *C. hospes* (polilla de bandas del girasol); *Manduca* spp. tal como *M. sexta* (esfíngido del tabaco) y/o *M. quinquemaculata* (esfíngido del tomate); *Elasmopalpus* spp. tal como *E. lignosellus* (barrenador menor del tallo del maíz); *Pseudoplusia* spp. tal como *P. includens* (oruga de la soja); *Anticarsia* spp. tal como *A. gemmatalis* (oruga de las leguminosas); *Plathypena* spp. tal como *P. scabra* (oruga verde); *Pieris* spp. tal como *P. brassicae* (mariposa de la col), *Papaipema* spp. tal como *P. nebris* (barrenador del tallo); *Pseudaletia* spp. tal como *P. unipuncta* (cogollero común); *Peridroma* spp. tal como *P. saucia* (gusano cortador variegado); *Keiferia* spp. tal como *K. lycopersicella* (gusano alfiler del tomate); *Artogeia* spp. tal

como *A. rapae* (gusano de la col importado); *Phthorimaea* spp. tal como *P. operculella* (polilla de la patata); *Chrysodeixis* spp. Tal como *C. includes* (oruga de la soja); *Feltia* spp. tal como *F. ducens* (gusano cortador sucio); *Chilo* spp. tal como *C. suppressalis* (barrenador rayado de cabeza oscura), *Cnaphalocrocis* spp. tal como *C. medinalis* (enrulador de las hojas del arroz), o cualquier combinación de los anteriores. En las realizaciones, los métodos de la invención proporcionan control de una colonia o plaga de insectos que son cogolleros del maíz que es resistente a Vip3A (por ejemplo, una proteína Vip3Aa, por ejemplo, tal como se expresa en el evento de maíz MIR162) y/o una proteína Cry1F (por ejemplo, una proteína Cry1Fa, por ejemplo, tal como se expresa en el evento de maíz TC1507).

[00317] La invención también proporciona usos de las proteínas insecticidas quiméricas, ácidos nucleicos, plantas transgénicas, partes de plantas, semillas y composiciones insecticidas de la invención, por ejemplo, para controlar una plaga de insectos, tal como una plaga de lepidópteros (tal como se describe en la presente).

[00318] En las realizaciones, la invención proporciona un método para utilizar un polinucleótido, casete de expresión, vector o célula hospedadora de la invención para producir una composición insecticida para controlar una plaga de insectos (por ejemplo, una plaga de insectos lepidópteros).

[00319] En las realizaciones, la invención proporciona un método para utilizar un polinucleótido, casete de expresión o vector de la invención para producir una semilla transgénica, donde la semilla transgénica se desarrolla en

una planta transgénica con una mayor resistencia a una plaga de insectos.

[00320] En otro aspecto, la invención también contempla el uso de una planta transgénica de la invención para producir una semilla transgénica, que es opcionalmente una semilla híbrida.

[00321] En las realizaciones, la invención proporciona un método para utilizar una proteína insecticida quimérica, polinucleótido, casete de expresión, vector, planta transgénica o composición insecticida de la invención para prevenir el desarrollo de la resistencia en una población de una plaga de insectos lepidópteros diana respecto a la proteína Vip3A y/o proteína Cry1F (cada una tal como se describe en la presente).

[00322] Las afirmaciones de la invención incluyen, sin limitación:

[00323] 1. Una proteína insecticida quimérica que es tóxica para una plaga de insectos lepidópteros que comprende en una dirección N-terminal a C-terminal: (a) una región N-terminal de una primera proteína Cry1, que es una región N-terminal de una proteína BT-0029 de la SEQ ID NO:2, o una secuencia de aminoácidos que es al menos un 90% idéntica a la misma, fusionada a (b) una región C-terminal de una proteína Cry1 diferente; donde una posición de cruzamiento entre la primera proteína Cry1 y la proteína Cry1 diferente está ubicada en el bloque conservado 3.

[00324] 2. La proteína insecticida quimérica de acuerdo con la afirmación 1, donde la proteína Cry1 diferente es una proteína Cry1F, una proteína Cry1G, una proteína Cry1I o una proteína Cry1K.

[00325] 3. La proteína insecticida quimérica de acuerdo con la afirmación 1, donde la proteína Cry1 diferente es una proteína Cry1Fa.

[00326] 4. La proteína insecticida quimérica de acuerdo con la afirmación 1, donde la proteína Cry1 diferente es una proteína Cry1Ia o una proteína Cry1If.

[00327] 5. La proteína insecticida quimérica de acuerdo con la afirmación 1, donde la proteína Cry1 diferente es una proteína BT-0022 de la SEQ ID NO: 1.

[00328] 6. La proteína insecticida quimérica de acuerdo con la afirmación 1, donde la región C-terminal de la proteína Cry1 diferente comprende una secuencia de aminoácidos correspondiente a una secuencia de aminoácidos desde la posición 464 a 602 de la SEQ ID NO: 8 o una secuencia de aminoácidos que es idéntica a esta en al menos un 80%.

[00329] 7. La proteína insecticida quimérica de acuerdo con la afirmación 1, donde la región C-terminal de la proteína Cry1 diferente comprende una secuencia de aminoácidos correspondiente a una secuencia de aminoácidos desde la posición 498 a 636 de la SEQ ID NO: 1 o una secuencia de aminoácidos que es idéntica a esta en al menos un 80%.

[00330] 8. La proteína insecticida quimérica de acuerdo con una cualquiera de las afirmaciones 1 a 7, donde la región N-terminal de la primera proteína Cry1 comprende una secuencia de aminoácidos que corresponde a una secuencia de aminoácidos desde la posición 1 hasta 458 de la SEQ ID NO: 2 o una secuencia de aminoácidos que es idéntica a esta en al menos un 90%.

[00331] 9. La proteína insecticida quimérica de acuerdo con una cualquiera de las afirmaciones 1 a 8, donde la proteína insecticida quimérica comprende además en el extremo N-terminal, un fragmento de peptidilo que se escinde de la protoxina después de la ingesta por la plaga de insectos lepidópteros.

[00332] 10. La proteína insecticida quimérica de acuerdo con una cualquiera de las afirmaciones 1 a 9, donde la proteína insecticida quimérica comprende además en el extremo C-terminal una cola pro-toxina de una proteína Cry que se escinde de la protoxina después de la ingesta por la plaga de insectos lepidópteros.

[00333] 11. La proteína insecticida quimérica de acuerdo con una cualquiera de las afirmaciones 1 a 10, donde la proteína insecticida quimérica comprende: (a) la secuencia de aminoácidos desde la posición 1 hasta 597 de la SEQ ID NO: 3 o un fragmento de toxina de esta, o (b) una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80% idéntica a la secuencia de aminoácidos de (a).

[00334] 12. La proteína insecticida quimérica de acuerdo con una cualquiera de las afirmaciones 1 a 11, donde la proteína insecticida quimérica comprende: (a) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3 o un fragmento de toxina de esta; o (b) una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80% idéntica a la secuencia de aminoácidos de (a).

[00335] 13. La proteína insecticida quimérica de acuerdo con una cualquiera de las afirmaciones 1 a 10, donde la proteína insecticida quimérica comprende: (a) la secuencia de aminoácidos de las posiciones 1 a 597 de la SEQ ID NO: 9 o un fragmento de toxina de esta; o (b) una secuencia de

aminoácidos que es al menos un 80% idéntica a la secuencia de aminoácidos de (a).

[00336] 14. La proteína insecticida quimérica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 o 13, donde la proteína insecticida quimérica comprende: (a) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9 o un fragmento de toxina de esta; o (b) una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80% idéntica a la secuencia de aminoácidos de (a).

[00337] 15. La proteína insecticida quimérica de acuerdo con una cualquiera de las afirmaciones 1 a 14, donde la proteína insecticida quimérica comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, o SEQ ID NO: 9.

[00338] 16. La proteína insecticida quimérica de acuerdo con una cualquiera de las afirmaciones 1 a 15, donde la proteína insecticida quimérica tiene actividad insecticida contra uno o más de *Spodoptera frugiperda* (cogolleros del maíz), *Chrysodeixis includes* (oruga de la soja), *Diatraea saccharalis* (barrenador de la caña de azúcar), *Diatraea grandiosella* (barrenador del maíz del suroeste), y *Agrotis ipsilon* (gusano cortador negro).

[00339] 17. La proteína insecticida quimérica de acuerdo con una cualquiera de las afirmaciones 1 a 16, donde la proteína insecticida quimérica tiene actividad insecticida contra una plaga o colonia de insectos *Spodoptera frugiperda* con resistencia a una proteína Vip3A y/o una proteína Cry1F.

[00340] 18. Un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína insecticida quimérica de acuerdo con una cualquiera de las afirmaciones 1 a 17.

[00341] 19. El polinucleótido de acuerdo con la afirmación 18, donde el polinucleótido tiene codones optimizados para la expresión en una planta.

[00342] 20. El polinucleótido de acuerdo con la afirmación 18 o la afirmación 19, donde el polinucleótido comprende una secuencia de nucleótidos que comprende: (a)

una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, o SEQ ID NO: 14 o un fragmento que codifica una toxina de estas; (b) una secuencia de nucleótidos que es sustancialmente idéntica a la secuencia de nucleótidos de (a); o (c) una secuencia de nucleótidos que se hibrida en condiciones de hibridación rigurosas a la secuencia de nucleótidos de (a) o (b); o (d) una secuencia de nucleótidos que difiere de la secuencia de nucleótidos de (a), (b) o (c) debido a la degeneración del código genético.

[00343] 21. El polinucleótido de acuerdo con la afirmación 18 o la afirmación 19, donde la secuencia de nucleótidos comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, o SEQ ID NO: 14.

[00344] 22. Una molécula de ácido nucleico que comprende el polinucleótido de acuerdo con una cualquiera de las afirmaciones 18 a 21 asociado operativamente con un promotor heterólogo.

[00345] 23. La molécula de ácido nucleico de acuerdo con la afirmación 22, donde el promotor heterólogo es un promotor que se puede expresar en una planta.

[00346] 24. Un vector que comprende el polinucleótido de acuerdo con una cualquiera de las afirmaciones 18 a 21 o

la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la afirmación 22 o la afirmación 23.

[00347] 25. Una célula transgénica que comprende el polinucleótido de acuerdo con una cualquiera de las afirmaciones 18 a 21, la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la afirmación 22 o la afirmación 23, o el vector de acuerdo con la afirmación 24.

[00348] 26. La célula transgénica de acuerdo con la afirmación 25, donde la célula es una célula bacteriana transgénica.

[00349] 27. La célula transgénica de acuerdo con la afirmación 25, donde la célula es una célula de planta transgénica.

[00350] 28. La célula de planta transgénica de acuerdo con la afirmación 27, donde la célula de planta es: (i) una célula monocotiledónea, opcionalmente una célula de cebada, una célula de maíz, una célula de avena, una célula de arroz, una célula de sorgo, una célula de caña de azúcar o una célula de trigo; o (ii) una célula dicotiledónea, opcionalmente una célula de soja, una célula de girasol, una célula de tomate, una célula del género Brassica, una célula de algodón, una célula de remolacha azucarera o una célula de tabaco.

[00351] 29. Una planta transgénica que comprende la célula de planta transgénica de acuerdo con la afirmación 27 o la afirmación 28.

[00352] 30. La planta transgénica de acuerdo con la afirmación 29, donde la planta es: (i) una planta monocotiledónea, opcionalmente una planta de cebada, una planta de maíz, una planta de avena, una planta de arroz, una

planta de sorgo, una planta de caña de azúcar o una planta de trigo; o (ii) una planta dicotiledónea, opcionalmente una planta de soja, una planta de girasol, una planta de tomate, una planta del género Brassica, una planta de algodón, una planta de remolacha azucarera o una planta de tabaco.

[00353] 31. La planta transgénica de acuerdo con la afirmación 28 o la afirmación 29, donde la planta transgénica comprende una secuencia de nucleótidos adicional que codifica un segundo agente de control de insectos.

[00354] 32. Una parte de planta transgénica de la planta transgénica de acuerdo con una cualquiera de las afirmaciones 29 a 31, donde la parte de planta transgénica comprende la proteína insecticida quimérica.

[00355] 33. Una semilla transgénica de la planta transgénica de acuerdo con una cualquiera de las afirmaciones 29 a 31.

[00356] 34. Un producto recolectado derivado de la planta transgénica de acuerdo con una cualquiera de las afirmaciones 29 a 31, la parte de planta transgénica de acuerdo con la afirmación 32, o la semilla transgénica de acuerdo con la afirmación 33, donde el producto recolectado comprende la proteína insecticida quimérica.

[00357] 35. Un producto procesado derivado del producto recolectado de acuerdo con la afirmación 34, donde el producto procesado es una harina, grano molido, un aceite, un almidón, o un producto derivado de cualquiera de los anteriores.

[00358] 36. Una composición insecticida que comprende la proteína insecticida quimérica de acuerdo con una

cualquiera de las afirmaciones 1 a 17 y un portador agrícolamente aceptable.

[00359] 37. La composición insecticida de acuerdo con la afirmación 36, donde el portador agrícolamente aceptable es un polvo, un polvillo, una microesfera, un gránulo, una pulverización, una emulsión, un coloide o una solución.

[00360] 38. La composición insecticida de acuerdo con la afirmación 36 o la afirmación 37, donde la composición es una composición desecada, liofilizada, homogeneizada, extraída, filtrada, centrifugada y/o sedimentada, y/o es un concentrado de cultivo bacteriano.

[00361] 39. La composición insecticida de acuerdo con una cualquiera de las afirmaciones 36 a 38, donde la composición comprende una célula bacteriana transgénica que produce la proteína insecticida quimérica.

[00362] 40. La composición insecticida de acuerdo con una cualquiera de las afirmaciones 36 a 39, donde la composición comprende de aproximadamente el 1% a aproximadamente el 99% en peso de la proteína insecticida quimérica.

[00363] 41. La composición insecticida de acuerdo con una cualquiera de las afirmaciones 36 a 40, donde la composición comprende un segundo agente de control de insectos.

[00364] 42. Un método para producir una planta transgénica con una mayor resistencia a una plaga de insectos lepidópteros, comprendiendo el método la introducción en una planta del polinucleótido de una cualquiera de las afirmaciones 18 a 21, la molécula de ácido nucleico de la afirmación 22 o la afirmación 23, o el vector de la

afirmación 24, donde la proteína insecticida quimérica se expresa en la planta, produciendo así una planta transgénica con una mayor resistencia a una plaga de insectos.

[00365] 43. El método de acuerdo con la afirmación 42, donde la etapa de introducción comprende: (i) transformar una célula vegetal con el polinucleótido, molécula de ácido nucleico o vector y regenerar una planta transgénica; o (ii) cruzar una primera planta que comprende el polinucleótido, molécula de ácido nucleico o vector con una segunda planta.

[00366] 44. El método de acuerdo con la afirmación 42 o la afirmación 43, donde el método comprende además obtener una planta de la progenie de la planta transgénica, donde la planta de la progenie comprende el polinucleótido, la molécula de ácido nucleico o el vector y tiene una mayor resistencia a una plaga de insectos.

[00367] 45. Un método para producir una planta transgénica con una mayor resistencia a una plaga de insectos lepidópteros, comprendiendo el método: (a) plantar una semilla que comprende el polinucleótido de acuerdo con una cualquiera de las afirmaciones 18 a 21, la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la afirmación 22 o la afirmación 23, o el vector de acuerdo con la afirmación 24; y (b) cultivar una planta transgénica a partir de la semilla, donde la planta transgénica comprende el polinucleótido, molécula de ácido nucleico o vector y produce la proteína insecticida quimérica.

[00368] 46. El método de acuerdo con la afirmación 45, donde el método comprende además: (c) recolectar una semilla de la planta transgénica de (b), donde la semilla recolectada comprende la proteína insecticida quimérica.

[00369] 47. Un método para producir una semilla, comprendiendo el método: (a) proporcionar una planta transgénica que comprende el polinucleótido de acuerdo con una cualquiera de las afirmaciones 18 a 21, la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la afirmación 22 o la afirmación 23, o el vector de acuerdo con la afirmación 24; y (b) recolectar una semilla de la planta transgénica de (a), donde la semilla recolectada comprende la proteína insecticida quimérica.

[00370] 48. Un método para producir una semilla de la planta híbrida, comprendiendo el método: (a) cruzar una primera planta endogámica, que es una planta transgénica que comprende el polinucleótido de acuerdo con una cualquiera de las afirmaciones 18 a 21, la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la afirmación 22 o la afirmación 23, o el vector de acuerdo con la afirmación 24, con una planta endogámica diferente; y (b) permitir la formación de una semilla híbrida.

[00371] 49. Un método para controlar una plaga de insectos lepidópteros, comprendiendo el método administrar a la plaga de insectos o un entorno de esta, una composición que comprende una cantidad eficaz de la proteína insecticida quimérica de una cualquiera de las afirmaciones 1 a 17 o la composición insecticida de una cualquiera de las afirmaciones 36 a 41.

[00372] 50. Un método para controlar una plaga de insectos lepidópteros resistente a una proteína Vip3A y/o una proteína Cry1F, comprendiendo el método administrar a la plaga de insectos lepidópteros resistente o un entorno de la misma la proteína insecticida de una cualquiera de las

afirmaciones 1 a 17 o la composición insecticida de una cualquiera de las afirmaciones 36 a 41.

[00373] 51. Un método para reducir el desarrollo de resistencia a una proteína Vip3A y/o una proteína Cry1F en una población de una plaga de insectos lepidópteros diana, comprendiendo el método administrar a la población diana o un entorno de esta, una planta transgénica que comprende: (i) el polinucleótido de acuerdo con una cualquiera de las afirmaciones 18 a 21, la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la afirmación 22 o la afirmación 23, o el vector de acuerdo con la afirmación 24; y (ii) un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína Vip3A y/o una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína Cry1F; donde la proteína insecticida quimérica y la proteína Vip3A y/o la proteína Cry1F se producen en la planta transgénica.

[00374] 52. El método de acuerdo con una cualquiera de las afirmaciones 42 a 51, donde la plaga de insectos lepidópteros incluye uno o más de *Spodoptera frugiperda* (cogolleros del maíz), *Chrysodeixis includes* (oruga de la soja), *Diatraea saccharalis* (barrenador de la caña de azúcar), *Diatraea grandiosella* (barrenador del maíz del suroeste) y *Agrotis ipsilon* (gusano cortador negro).

[00375] 53. El método de acuerdo con una cualquiera de las afirmaciones 42 a 52, donde la plaga de insectos lepidópteros incluye un *Spodoptera frugiperda* (cogolleros del maíz) que es resistente a una proteína Vip3A y/o una proteína Cry1F.

[00376] 54. El método de acuerdo con una cualquiera de las afirmaciones 42 a 53, donde la planta es: (i) una

planta monocotiledónea, opcionalmente una planta de cebada, una planta de maíz, una planta de avena, una planta de arroz, una planta de sorgo, una planta de caña de azúcar o una planta de trigo; o (ii) una planta dicotiledónea, opcionalmente una planta de soja, una planta de girasol, una planta de tomate, una planta del género Brassica, una planta de algodón, una planta de remolacha azucarera o una planta de tabaco.

[00377] 55. El método de acuerdo con una cualquiera de las afirmaciones 42 a 54, donde la planta es una planta de maíz.

[00378] A continuación, la invención se describirá haciendo referencia a los siguientes ejemplos. Los expertos en la técnica apreciarán que estos ejemplos no limitan el alcance de las reivindicaciones de la invención, sino que más bien se pretende que sirvan de ejemplo respecto a ciertas realizaciones. Otras realizaciones de la invención se pueden poner en práctica sin alejarse de la naturaleza ni el alcance de la invención, cuyo alcance está definido por la divulgación y las reivindicaciones adjuntas.

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Descubrimiento de una proteína BT-0029 quimérica, Bt29-Bt22 con actividad insecticida contra el cogollero del maíz

[00379] Se han divulgado dos proteínas activas contra lepidópteros de *Bacillus thuringiensis* (Bt), BT-0022 (SEQ ID NO: 1; miembro de la familia Cry más cercano conocido Cry1If) y BT-0029 (SEQ ID NO:2; miembro de la familia Cry más cercano conocido Cry1Gb), en el documento PCT/US16/038947.

[00380] Tal como se muestra en la Tabla 1 a continuación, los datos del espectro de insectos para BT-0022 y BT-0029 indican que BT-0022 no tiene actividad contra el cogollero del maíz (FAW, por sus siglas en inglés, *Spodoptera frugiperda*) y BT-0029 únicamente tiene actividad débil contra FAW. Otras plagas de insectos lepidópteros estudiadas fueron: Barrenador del maíz europeo (ECB, por sus siglas en inglés; *Ostrinia nubilalis*), gusano cortador negro (BCW, por sus siglas en inglés; *Agrotis ipsilon*), gusano elotero (CEW, por sus siglas en inglés; *Helicoverpa zea*), barrenador de la caña de azúcar (SCB, por sus siglas en inglés; *Diatraea saccharalis*), barrenador del maíz del suroeste (SWCB, por sus siglas en inglés; *Diatraea grandiosella*), gusano portador del poroto del oeste (WBCW, por sus siglas en inglés; *Striacosta albicosta*), u oruga de la soya (SBL, por sus siglas en inglés; *Pseudoplusia includens*), oruga de las leguminosas (VBC, por sus siglas en inglés; *Anticarsia gemmatalis*) y gusano cogollero del tabaco (TBW, por sus siglas en inglés; *Heliothis virescens*).

Tabla 1. Actividad insecticida de BT-0022 y BT-0029 contra varios insectos lepidópteros.

	% de mortalidad									
	ECB	BCW	FAW	CEW	SCB	SWCB	WBCW	SBL	VBC	TBW
BT-0022	100	100	0	20 (M)	92	100	0	100	0	42 (S)
BT-0029	0	25	25	8	33	17	ND	100	100	ND

M - larvas de tamaño medio

S - larvas de tamaño pequeño

ND - no determinado

[00381] Se utilizó una estrategia de modificación de proteínas en un intento de potenciar la actividad contra FAW de BT-0029. Utilizando BT-0029 como molde, se diseñaron seis

proteínas modificadas reemplazando el dominio III (DIII) de BT-0029 por un dominio III de una proteína Cry diferente. La Tabla 2 ilustra seis proteínas quiméricas con la información de composición de sus dominios. La Tabla 3 proporciona la información secuencial de las proteínas completas.

Tabla 2. Proteínas BT-0029 modificadas mediante el intercambio de dominio

Nombre	Dominio I	Dominio II	Dominio III	Cola de la protoxina
Bt29-1Ab	BT-0029	BT-0029	Cry1Ab	BT-0029
Bt29-Bt22	BT-0029	BT-0029	BT-0022	BT-0029
Bt29-Bt67	BT-0029	BT-0029	BT-0067	BT-0029
Bt29-Bt51	BT-0029	BT-0029	BT-0051	BT-0029
Bt29-8D	BT-0029	BT-0029	Cry8D	BT-0029
Bt29-3A	BT-0029	BT-0029	Cry3A	BT-0029

Tabla 3. Información secuencial de la proteína completa.

Nombre	Miembro de la familia Cry más cercano	Secuencia
BT-0029	Cry1Gb	SEQ ID NO: 2
Cry1Ab	No aplicable	N.º de acceso GenBank AAA22330.1
BT-0022	Cry1If	SEQ ID NO: 1
Bt-0067	Cry9Eb	WO2016/094165
Bt-0051	Cry9Ca	WO2016/094159
Cry8D	No aplicable	N.º de acceso GenBank

		BAF93483.1
Cry3A	No aplicable	N.º de acceso GenBank AAA22336.1
Cry1Ca	No aplicable	N.º de acceso GenBank AF362020.1

[00382] Los ADNc que codifican las proteínas modificadas se sintetizaron por Genewiz (South Plainfield, NJ) y se clonaron en un vector de expresión de *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) que contenía un promotor de Cry1Ac y ningún terminador. Los ADN plasmídicos se introdujeron en una cepa AB227 de *Bt* mediante un procedimiento de transformación mediado por electroporación. La totalidad de las seis proteínas modificadas se produjeron como proteínas cristalinas en *Bt*. Las proteínas cristalinas se purificaron a partir de los cultivos y se disolvieron en un tampón que contenía Na₂CO₃ 50 mM, pH 11.0, y DTT 2 mM. A continuación, se evaluó cada proteína soluble en un bioensayo con insectos.

[00383] Resumiendo, se examinó la actividad insecticida de las proteínas quiméricas mediante un bioensayo con insectos basado en una dieta artificial en la cual se recubrió la superficie de la dieta artificial para insectos con las proteínas cristalinas solubilizadas, con una concentración final de 2 - 3.2 µg/cm². El tampón (Na₂CO₃ 50 mM, pH 11.0, y DTT 2 mM) utilizado para solubilizar las proteínas cristalinas de *Bt* sirvió como control negativo. La proteína Cry1Fa completa (SEQ ID NO: 8) se utilizó como un control positivo para la actividad contra FAW. Cada proteína quimérica se estudió por duplicado. Se evaluó la mortalidad de los insectos en el día 7.

[00384] Los resultados se muestran en la Tabla 4. Cuando las proteínas quiméricas se ensayaron en el bioensayo con insectos, la quimera Bt29-Bt22 (SEQ ID NO: 3) mostró una fuerte actividad insecticida contra FAW, mientras que las otras dos proteínas quiméricas (Bt29-Bt67 y Bt29-3A) únicamente mostraron una actividad poco importante frente a la plaga. La quimera Bt29-1Ab no demostró ninguna actividad detectable contra FAW.

[00385] Para esta prueba, no se produjo suficiente proteína de las quimeras Bt29-Bt51 y Bt29-8D para evaluar la actividad insecticida.

Tabla 4: Actividad insecticida contra el cogollero del maíz

Tratamiento	FAW % de mortalidad	Tratamiento	FAW % de mortalidad
Tampón (control negativo)	8	Bt29-Bt67	17
Cry1Fa (longitud completa; control positivo)	100	Bt29-3A	25
Bt29-Bt22	100	Bt29-3A	33
Bt29-Bt22	83	Bt29-1Ab	0
Bt29-Bt67	8	Bt29-1Ab	0
Bt29-Bt67	17		

Ejemplo 2: Actividad insecticida de proteínas BT-0029 quiméricas contra varias plagas de lepidópteros

[00386] Se examinaron cuatro de las proteínas quiméricas descritas en el Ejemplo 1 (Bt29-3A, Bt29-Bt22, Bt29-1Ab y Bt29-Bt67) para determinar su actividad insecticida contra las siguientes plagas de lepidópteros utilizando métodos de bioensayo con dieta artificial reconocidos en la técnica: barrenador de la caña de azúcar (SCB; *Diatraea saccharalis*), barrenador del maíz del suroeste (SWCB; *Diatraea grandiosella*), oruga de la soya (SBL; *Pseudoplusia includens*), gusano elotero (CEW; *Helicoverpa zea*), cogollero del tabaco (TBW; *Heliothis virescens*), gusano cortador negro (BCW; *Agrotis ipsilon*) y barrenador del maíz europeo (ECB; *Ostrinia nubilalis*).

[00387] Tal como se muestra en la Tabla 5, la totalidad de las cuatro proteínas quiméricas estudiadas mantuvo la fuerte actividad contra SBL de la BT-0029 nativa. Bt29-Bt22 y Bt29-Bt67 tuvieron una actividad débil contra SCB comparable a la BT-0029 nativa, mientras que Bt29-3A y Bt29-1Ab perdieron esencialmente toda la actividad contra SCB. Se observó un ligero aumento de la actividad contra SWCB en Bt29-Bt67 en comparación con la BT-0029 completa. De manera bastante coherente con los resultados de la Tabla 1 para la BT-0029 nativa, únicamente se observó una actividad contra BCW débil en Bt29-3A, Bt29-Bt22 y Bt29-Bt67 y ninguna de las quimeras tuvieron actividad contra CEW, TBW o ECB.

Tabla 5: Actividad insecticida de proteínas quiméricas de BT-0029 contra plagas de lepidópteros

Tratamiento	% de mortalidad						
	SCB	SWCB	SBL	CEW	TBW	BCW	ECB

Tampón (control negativo)	0	17	0	0	0	8	0
Cry1Fa (longitud completa; control positivo)	25	42	100	73	100	42	100
Bt29-3A	0	42	100	0	0	8	0
Bt29-3A	8	25	100	0	0	25	0
Bt29-Bt22	50	17	100	0	0	17	0
Bt29-Bt22	33	67	100	0	0	25	0
Bt29-Bt67	25	58	100	0	0	33	0
Bt29-Bt67	42	73	100	0	0	8	0
Bt29-1Ab	8	0	100	0	0	0	0
Bt29-1Ab	0	0	100	0	0	0	0
Bt29-1Fa	100	100	100	0	0	0	75

Ejemplo 3: Bt29-1F posee actividad insecticida contra el cogollero del maíz

[00388] Para examinar proteínas quiméricas adicionales, se diseñó y se ensayó un segundo conjunto de proteínas quiméricas de BT-0029 (Tabla 6). Bt29-1Fa es una proteína quimérica en la cual el dominio III de BT-0029 se reemplazó por el dominio III de Cry1Fa. La secuencia de aminoácidos de longitud completa de Cry1Fa se proporciona como la SEQ ID NO: 8 (véase también el número de acceso GenBank AAB00376.1). La secuencia de aminoácidos de la quimera Bt29-1Fa se proporciona como la SEQ ID NO: 9, donde la secuencia Cry1Fa son los aminoácidos 459 a 597.

[00389] Bt29-1Ka es una proteína quimérica en la cual el dominio III de BT-0029 se reemplazó por el dominio III de Cry1Ka. La secuencia de aminoácidos de longitud completa de Cry1Ka se proporciona como la SEQ ID NO: 12 (véase también el número de acceso GenBank AAB00376.1). La secuencia de aminoácidos de la quimera Bt29-1Ka también se proporciona como la SEQ ID NO: 13, donde la secuencia Cry1Ka son los aminoácidos 459 a 597. Se hizo una segunda versión de una proteína quimérica Bt29-1Ka (designada en la presente como Bt29-1Kav2) moviendo la unión de entrecruzamiento entre la secuencia Cry1Ka y la secuencia BT-0029 en el extremo C-terminal desde el dominio III del aminoácido 598 (el entrecruzamiento en la primera quimera Bt29-1Ka) hasta el aminoácido 610. La secuencia de aminoácidos de la quimera Bt29-1Kav2 se proporciona como la SEQ ID NO: 15, donde la secuencia Cry1Ka son los aminoácidos 459 a 609.

[00390] Bt29-1Ca es una proteína quimérica en la cual el dominio III de Bt-0029 se reemplazó por el dominio III de Cry1Ca. La secuencia de aminoácidos de longitud completa de Cry1Ca se proporciona como la SEQ ID NO: 17 (véase también el número de acceso Genbank AF362020.1). La secuencia de aminoácidos de la quimera Bt29-1Ca se proporciona como la SEQ ID NO: 18, donde la secuencia Cry1Ca son los aminoácidos 467 a 617.

Tabla 6. Proteínas BT-0029 modificadas mediante el intercambio del dominio III

Nombre	Dominio I	Dominio II	Dominio III	Cola de la protoxina
Bt29-	BT-0029	BT-0029	Cry1Fa	BT-0029

1Fa				
Bt29-1Ka	BT-0029	BT-0029	Cry1Ka	BT-0029
Bt29-1Ca	BT-0029	BT-0029	Cry1Ca	BT-0029

[00391] A

ctividad insecticida de las quimeras Bt29-1Fa (SEQ ID NO: 9), Bt29-1Ka (SEQ ID NO: 13, Bt29-1Kav2 (SEQ ID NO: 16) y Bt29-1Ca (SEQ ID NO: 18) se examinó mediante un bioensayo con insectos basado en una dieta artificial en la cual se recubrió la superficie de la dieta artificial para insectos con las proteínas solubilizadas, con una concentración final de 2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. El tampón (Na_2CO_3 50 mM, pH 10.5, y DTT 2 mM) utilizado para solubilizar las proteínas cristalinas de *Bt* sirvió como control negativo. La proteína Cry1Fa completa (SEQ ID NO: 8) se utilizó como un control positivo para la actividad contra FAW. Cada proteína quimérica se estudió por triplicado. Se evaluó la actividad insecticida como mortalidad efectiva en el día 7 (las larvas que presentan inhibición del crecimiento y están moribundas se califican como muertas en la práctica).

[00392] Tal como se muestra en la Tabla 7, la proteína quimérica designada Bt29-1Fa demostró una fuerte actividad contra FAW.

[00393] En esta prueba, no se produjo proteína Bt29-1Ka suficiente para la evaluación en el bioensayo. Sorprendentemente, la quimera Bt29-1Kav2 produjo una proteína y estuvo activa contra los cogolleros del maíz (véase la Tabla 7).

Tabla 7: Actividad insecticida del híbrido Bt29-1Fa contra el cogollero del maíz

Tratamiento	FAW % de mortalidad
Bt29-1Fa	100
Bt29-1Fa	100
Bt29-1Fa	100
Bt29-1Ca	100
Bt29-1Kav2	75
Cry1Fa (longitud completa; control positivo)	100
Tampón (control negativo)	8

Ejemplo 4: Bt29-Bt22 y Bt29-1Fa poseen actividad insecticida contra el cogollero del maíz resistente a Cry1F

[00394] Para determinar si la toxicidad de las proteínas quiméricas de BT-0029 frente a FAW se produce mediante un modo de acción (MOA, por sus siglas en inglés) diferente de Cry1Fa, se produjeron las dos proteínas quiméricas, Bt29-Bt22 y Bt29-1Fa como se describe en el Ejemplo 1, y se aislaron y purificaron las proteínas cristalinas. Los cristales purificados se disolvieron en Tampón 1 (Na₂CO₃/NaHCO₃ 50 mM, pH 11, DTT 2 mM) y la pureza del preparado de las proteínas disueltas se monitorizó utilizando un sistema Experion de Bio-Rad (BioRad, Hercules, CA).

[00395] Las proteínas purificadas se estudiaron para determinar la eficacia contra una cepa de FAW que es

resistente a la toxina insecticida Cry1Fa. Se realizó un ensayo de recubrimiento de la dieta con varias dosis de cada toxina purificada (125, 500 y 2000 ng/cm²), esencialmente tal como se describe en el Ejemplo 1. La proteína Vip3A (control positivo) se disolvió en PBS y las otras proteínas en Tampón 1 (Na₂CO₃/NaHCO₃ 50 mM, pH 11, DTT 2 mM). Los dos tratamientos de control negativo fueron PBS y Tampón 1. También se ensayó una población de FAW que es susceptible a Cry1Fa o Vip3A, es decir, una cepa susceptible a FAW. Cada proteína se estudió por duplicado. Se evaluó la actividad insecticida como mortalidad efectiva en el día 7 (las larvas que presentan inhibición del crecimiento y están moribundas se cuentan como muertas en la práctica).

[00396] Tal como se muestra en la Tabla 8, las larvas de FAW susceptibles se controlaron mediante Cry1Fa, Vip3A, Bt29-Bt22 y Bt29-1Fa, incluso con la concentración más baja. Por el contrario, la cepa de FAW resistente a Cry1F no se controló mediante ninguna dosis de Cry1Fa estudiada, lo que demuestra que la cepa es resistente a esta toxina (Tabla 9). Sorprendentemente, tanto Bt29-Bt22 como Bt29-1Fa fueron altamente eficaces para controlar FAW resistentes a Cry1F incluso a una dosis muy baja de 125 ng/cm² como se muestra en la Tabla 9, lo que sugiere que el modo de acción de estas dos proteínas quiméricas contra los FAW resistentes es diferente del modo de acción de una proteína Cry1Fa.

Tabla 8: Actividad insecticida de Bt29-Bt22 y Bt29-1Fa contra el cogollero del maíz susceptible a varias concentraciones

Tratamiento	Dosis (ng/cm ²)	% de mortalidad
Vip3Aa	125	100

Vip3Aa	500	100
Vip3Aa	2000	100
Cry1Fa	125	100
Cry1Fa	500	100
Cry1Fa	2000	100
Bt29-Bt22	125	90
Bt29-Bt22	500	96
Bt29-Bt22	2000	100
Bt29-1Fa	125	92
Bt29-1Fa	500	100
Bt29-1Fa	2000	100
Tampón 1		0
PBS		0

Tabla 9: Actividad insecticida de Bt29-Bt22 y Bt29-1Fa contra el cogollero del maíz resistente a Cry1Fa

Tratamiento	Dosis (ng/cm²)	% de mortalidad
Vip3Aa	125	100
Vip3Aa	500	100
Vip3Aa	2000	100
Cry1Fa	125	0
Cry1Fa	500	0
Cry1Fa	2000	0
Bt29-Bt22	125	100
Bt29-Bt22	500	100
Bt29-Bt22	2000	100
Bt29-1Fa	125	100
Bt29-1Fa	500	100
Bt29-1Fa	2000	100

Tampón 1		0
PBS		0

Ejemplo 5: Bt29-Bt22 y Bt29-1Fa poseen actividad insecticida contra el cogollero del maíz resistente a Vip3A

[00397] Para determinar si la toxicidad de las proteínas quiméricas de BT-0029 se produce mediante un MOA diferente de la proteína Vip3A, se produjeron las proteínas Bt29-Bt22 y Bt29-1Fa como se describe en el Ejemplo 1, y se aislaron y purificaron las proteínas cristalinas. Los cristales purificados se disolvieron en Tampón 1 ($\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 50 mM, pH 11, DTT 2 mM) y la pureza del preparado de las proteínas disueltas se monitorizó utilizando un sistema Experion de Bio-Rad (BioRad, Hercules, CA).

[00398] Las proteínas purificadas se estudiaron para determinar la eficacia contra una cepa de FAW que es resistente a la toxina insecticida Vip3A. Se realizó un ensayo de recubrimiento de la dieta con varias dosis de cada toxina purificada (125, 500 y 2000 ng/cm²), esencialmente tal como se describe en el Ejemplo 1. La proteína Vip3A se disolvió en PBS y las otras proteínas en Tampón 1 ($\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 50 mM, pH 11, DTT 2 mM). Los dos tratamientos de control negativo fueron PBS y Tampón 1. Las proteínas Cry1Fa se utilizaron como un control positivo para la cepa de FAW resistente a Vip3A. Cada proteína se estudió por duplicado. Se evaluó la actividad insecticida como mortalidad efectiva en el día 7 (las larvas que presentan inhibición del crecimiento y están moribundas se califican como muertas en la práctica).

[00399] La cepa de FAW resistente a Vip3A no se controló mediante ninguna dosis de Vip3A estudiada, lo que

demuestra que la cepa es resistente a esta toxina (Tabla 10). En contraste, tanto Bt29-Bt22 como Bt29-1Fa demostraron un alto grado de eficacia contra FAW resistentes a Vip3A, lo que sugiere que el modo de acción de estas dos proteínas quiméricas contra FAW resistentes es diferente del modo de acción de una proteína Vip3A.

Tabla 10: Actividad insecticida de Bt29-Bt22 y Bt29-1Fa contra el cogollero del maíz resistente a Vip3A

Tratamiento	Dosis (ng/cm ²)	% de mortalidad
Vip3Aa	125	0
Vip3Aa	500	0
Vip3Aa	2000	0
Cry1Fa	125	100
Cry1Fa	500	100
Cry1Fa	2000	100
Bt29-Bt22	125	100
Bt29-Bt22	500	100
Bt29-Bt22	2000	100
Bt29-1Fa	125	100
Bt29-1Fa	500	100
Bt29-1Fa	2000	100
Tampón 1		0
PBS		0

Ejemplo 6. Truncamiento en la región de la cola de la protoxina

[00400] Es bien sabido que la forma de protoxina de las proteínas Cry de *Bt* se procesa tanto en el extremo N como C-terminal para producir la toxina madura. Se hicieron seis formas truncadas C-terminales de la quimera Bt29-Bt22 (SEQ ID

NO: 3), que comprende una región de cola de protoxina BT-0029, como se muestra en la Figura 3. En todas las versiones truncadas, designadas en la presente como Bt29-Bt22Tr1 (SEQ ID NO: 20), Bt29-Bt22Tr2 (SEQ ID NO: 21), Bt29-Bt22Tr3 (SEQ ID NO: 22), Bt29-Bt22Tr4 (SEQ ID NO: 23), Bt29-Bt22Tr5 (SEQ ID NO: 24), Bt29-Bt22Tr6 (SEQ ID NO: 25), se retuvieron el dominio III de BT-0022 (con terminación PVTA), y al menos los primeros 6 aminoácidos de la cola de protoxina BT-0029 (TFEAEY). Los expertos en la técnica apreciarán que el final del dominio III y el comienzo de la cola de la protoxina no se ha delimitado con precisión para BT-0029 o las quimeras descritas en la presente. El dominio central III mostrado en las Figuras 1A y 1B se basa en alineamientos con otras proteínas Cry en las que se ha delineado la región del dominio III.

[00401] Las formas truncadas Bt29-Bt22Tr1, -Tr2, -Tr4, y -Tr5 mostraron todas las actividades de FAW evaluadas como inhibición del crecimiento (sin mortalidad) en bioensayos de insectos cuando se analizaron como lisados de *E. coli*. Las formas Bt29-Bt22Tr1 y -Tr4 fueron las más prometedoras, demostrando la mayor actividad en este ensayo (67% y 75% de inhibición del crecimiento, respectivamente).

[00402] Se realizó una segunda quimera de longitud completa Bt29-Bt22 donde la región de la cola de protoxina es de BT-0022 (Cry1I) en lugar de BT-0029 (Cry1G). Se hicieron y se ensayaron seis formas truncadas C-terminales de esta quimera de longitud completa, presentadas en la presente como las SEQ ID Nos.26-31, frente a los cogolleros del maíz y la oruga de la soja. Se usó Cry1Fa como control positivo. Los resultados se muestran en la Tabla 11.

Tabla 11. Actividad insecticida de Bt29-Bt22 con la cola de protoxina BT-0022 truncada frente a cogolleros del maíz y oruga de la soja.

Quimera	SEQ ID NO:	Mortalidad eficaz (%)	
		FAW	SBL
BT29BT22-TL22v1	26	75	100
BT29BT22-TL22v2	27	63	100
BT29BT22-TL22v3	28	50	100
BT29BT22-TL22v4	29	58	100
BT29BT22-TL22v5	30	54	100
BT29BT22-TL22v6	31	83	100
Tampón	ND	0	0
Cry1Fa	8	100	100

[00403] Se produjeron cuatro formas truncadas de la Bt29-1Fa (SEQ ID NO: 9), que comprende la región de la cola de protoxina BT-0029, presentada en la presente como Bt29-1FaTr1 (SEQ ID NO:32), Bt29-1FaTr2 (SEQ ID NO: 33), Bt29-1FaTr3 (SEQ ID NO: 34) y Bt29-1FaTr4 (SEQ ID NO:35), en un sistema de expresión de E. coli y los lisados se ensayaron frente a los cogolleros del maíz. Los resultados se muestran en la Tabla 12.

Tabla 12. Actividad insecticida de las proteínas quiméricas Bt29-1Fa truncadas.

Proteína Quimérica	SEQ ID NO:	% de mortalidad de FAW
Bt29-1FaTr1	32	17
Bt29-1FaTr2	33	8

Bt29-1FaTr3	34	42
Bt29-1FaTr4	35	58
Cry11Fa	8	100
Tampón	ND	0
pET29	ND	0

Ejemplo 7. Expresión y actividad de las proteínas quiméricas Bt29-Bt22 y Bt29-Cry1Fa en plantas de maíz

[00404] Antes de la expresión en plantas, los polinucleótidos sintéticos que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica una quimera Bt29-Bt22 y Bt29-1Fa se sintetizaron en una plataforma de síntesis de genes automatizada (Genscript, Inc., Piscataway, NJ). Para este ejemplo, se hizo un primer y segundo casete de expresión que comprendía un promotor de ubiquitina de maíz (Ubi1) unido operativamente a la secuencia codificante quimérica Bt29-Bt22 o Bt29-1Fa que se unió operativamente a un terminador de ubiquitina de maíz y se hizo un tercer casete de expresión que comprendía un promotor Ubi1 unido operativamente a una secuencia codificante de fosfomanosa isomerasa (PMI) que se unió operativamente a un terminador Ubi. La expresión de PMI permite la selección positiva de plantas transgénicas en manosa. Para la transformación de plantas, el primer y tercer casetes de expresión y el segundo y tercer casetes de expresión se clonaron en un vector adecuado para la transformación de maíz mediada por *Agrobacterium*.

[00405] La transformación de embriones inmaduros de maíz se realiza esencialmente como se describe en Negrotto et al., 2000, *Plant Cell Reports* 19: 798 803. Resumiendo, la cepa de *Agrobacterium* LBA4404 (pSB1), que comprende un vector de expresión que expresa Bt29-Bt22 o Bt29-Cry1Fa se cultiva

en medio sólido YEP (extracto de levadura (5 g/L), peptona (10 g/L), NaCl (5 g/L), 15 g/L de agar, pH 6.8) durante 2-4 días a 28 °C. Se suspenden aproximadamente 0.8×10^9 células de *Agrobacterium* en medio LS-inf complementado con As 100 µM. Las bacterias se preinducen en este medio durante aproximadamente 30-60 minutos.

[00406] Se extirpan embriones inmaduros de una línea de maíz endogámica a partir de mazorcas de 8-12 días en LS-inf líquido + As 100 µM. Los embriones se enjuagan una vez con medio de infección fresco. Posteriormente, se añade la solución de *Agrobacterium*, los embriones se agitan en un vórtex 30 segundos y se dejan reposar con las bacterias durante 5 minutos. Posteriormente, los embriones se transfieren con el escutelo hacia arriba al medio LSAs y se cultivan en la oscuridad durante de dos a tres días. Posteriormente, se transfieren entre aproximadamente 20 y 25 embriones por placa de Petri al medio LSDc complementado con cefotaxima (250 mg/l) y nitrato de plata (1.6 mg/l) y se cultivan en la oscuridad a aproximadamente 28 °C durante 10 días.

[00407] Los embriones inmaduros, que producen callo embriogénico, se transfieren a un medio LSD1M0.5S. Los cultivos se seleccionan en este medio durante aproximadamente 6 semanas con un paso de subcultivo pasadas aproximadamente 3 semanas. Los callos que sobreviven se transfieren a un medio Reg1 complementado con manosa. Después del cultivo a la luz (régimen de 16 horas luz/8 horas de oscuridad), los tejidos verdes se transfieren entonces a un medio Reg2 sin reguladores de crecimiento y se incuban durante aproximadamente 1-2 semanas. Las plántulas se transfieren a

cajas Magenta GA-7 (Magenta Corp, Chicago, Illinois) que contienen medio Reg3 y se cultivan a la luz. Después de aproximadamente 2-3 semanas, las plantas se analizan para detectar la presencia de genes PMI y el gen *cry* de *Bt* quimérico mediante PCR. Las plantas que dan positivo en el ensayo de PCR se transfieren a un invernadero para una evaluación adicional.

[00408] Las plantas transgénicas se evalúan para determinar el número de copias (determinado mediante un análisis Taqman), el nivel de la expresión de proteínas (determinado por ELISA) y la eficacia contra especies de insectos de interés en bioensayos de escisión de hojas. Específicamente, se extirpa tejido vegetal (hoja o barbas) de eventos con una única copia (etapa V3-V4) y se infesta con larvas recién nacidas de una plaga diana, a continuación se incuba a temperatura ambiente durante 5 días. Se estudian los discos foliares de plantas transgénicas que expresan cada proteína *Bt* quimérica contra cogolleros del maíz (*Spodoptera frugiperda*, FAW).

[00409] Los resultados confirman que las plantas transgénicas expresan las proteínas quiméricas de la invención y son activas contra las plagas de insectos. La expresión de proteínas en los eventos transgénicos para la quimera Bt29-Bt22 varió de aproximadamente 25-125 ng/mg de proteína soluble total (TSP) y para la quimera Bt29-1Fa varió de aproximadamente 25-290 ng/mg de TSP. Aproximadamente el 90% y el 92% de los eventos transgénicos que expresan las quimeras Bt29-Bt22 y Bt29-1Fa, respectivamente, produjeron un 100% de mortalidad y la inhibición del crecimiento larvario en los cogolleros del maíz.

[00410] Los ejemplos anteriores ilustran claramente las ventajas de la invención. Aunque la presente invención se ha descrito haciendo referencia a detalles específicos de ciertas de sus realizaciones, no se pretende que tales detalles se consideren como limitaciones del alcance de la invención reivindicada excepto cuando se incluyan en las reivindicaciones adjuntas y en la medida en la que se incluyan en estas.

[00411] Se hace constar que con relación a esta fecha, el mejor método conocido por la solicitante para llevar a la práctica la citada invención, es el que resulta claro de la presente descripción de la invención.