

PROTEÍNAS INHIBITORIAS DE INSECTOS NOVELES

REFERENCIA A LA SOLICITUD RELACIONADA

[01] La presente solicitud demanda el beneficio de la Solicitud Provisional de Estados Unidos N. °
5 62/436.736, presentada el 20 de diciembre de 2016, que se incorpora en este documento por referencia en su totalidad.

INCORPORACIÓN DE LISTADO DE SECUENCIA

[02] El archivo denominado “MONS431WO ST25.txt” que contiene un formulado legible por
10 computadora del Listado de secuencias se creó el 13 de diciembre de 2017. El archivo es de 215 kilobytes (medido en MS-Windows®), se presenta de manera contemporánea mediante medios electrónicos (usando el sistema de presentación por Internet EFS-Web de la Oficina de Patentes de Estados Unidos), y se incorpora en esta solicitud por referencia en su totalidad.

CAMPO DE LA INVENCION

[03] La invención por lo general se relaciona con el campo de las proteínas inhibitorias de insectos. Se revela una clase innovadora de proteínas que exhiben una actividad inhibitoria de insectos frente a plagas de plantas de cultivo y semillas relevantes a nivel agrícola. En particular, las proteínas reveladas son activas como insecticidas contra las plagas de plantas de cultivo y semillas relevantes a nivel
15 agrícola, en particular las especies de plagas de insectos coleópteros, lepidópteros, hemípteros y tisanópteros. Se proveen plantas, partes de plantas y semillas que contienen una construcción polinucleótida recombinante de una o más de las proteínas de toxinas reveladas.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[04] La mejora de los campos de cultivos de plantas importantes a nivel agrícola que incluyen, entre
25 otras: maíz, soja, caña de azúcar, arroz, trigo, vegetales y algodón, se ha vuelto cada vez más importante. Además de la creciente necesidad de productos agrícolas para la alimentación, vestimenta y suministro energía de una población humana cada vez mayor, se prevé que los efectos relacionados con el clima y la presión por parte de una población en crecimiento de usar la tierra para otros fines aparte de las
30 prácticas agrícolas reduzcan la cantidad de tierra cultivable disponible para la agricultura. Estos factores

han provocado pronósticos desalentadores sobre la seguridad alimenticia, en particular ante la ausencia de mejoras importantes en las prácticas agronómicas y de biotecnología de plantas. Ante estas presiones, las mejoras medioambientales sostenibles en cuanto a técnicas agrícolas y tecnológicas y la administración de plagas constituyen herramientas vitales para ampliar la expansión de cultivos en una cantidad limitada de tierra cultivable disponible para la agricultura.

[05] Los insectos, en particular los insectos dentro del orden de coleópteros, lepidópteros, hemípteros y tisanópteros, se consideran una causa principal de los daños a los cultivos, reduciendo así el rendimiento de los cultivos sobre las áreas infestadas.

[06] Históricamente, la aplicación intensiva de insecticidas químicos sintéticos se consideró el agente de control de plagas en la agricultura. Las preocupaciones por el medio ambiente y la salud humana, además de los problemas emergentes de la resistencia, fomentaron la investigación y desarrollo de pesticidas biológicos. Este esfuerzo de investigación provocó el descubrimiento progresivo y uso de diversas especies microbianas entomopatógenas, incluidas las bacterias.

[07] El paradigma de control biológico cambió con el descubrimiento y desarrollo de la posibilidad de bacterias entomopatógenas, en especial, las bacterias pertenecientes al gen *Bacillus*, como agente biológico de control de plagas. Las cepas de la bacteria *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) se han utilizado como fuente de proteínas de pesticidas desde que se descubrió que las cepas de *Bt* muestran una alta toxicidad contra insectos específicos. Las cepas de *Bt* son conocidas por producir delta endotoxinas que se localizan dentro de los cuerpos cristalinos de inclusión parasporal al comienzo de la esporulación y durante la fase de crecimiento estacionario (por ej., proteínas Cry), y también son conocidas por producir proteínas insecticidas secretadas. Tras su ingestión por un insecto susceptible, las deltaendotoxinas, así como las toxinas secretadas aplican sus efectos en la superficie del epitelio del intestino medio, alteran la membrana celular, lo cual provoca alteración celular y muerte. Los genes que codifican las proteínas insecticidas también se han identificado en otras especies de bacterias aparte de las *Bt*, que incluyen otros *Bacillus* y una diversidad de especies bacterianas no relacionadas, como *Brevibacillus laterosporus* y *Lysinibacillus sphaericus* (“*Ls*” anteriormente conocida como *Bacillus sphaericus*).

[08] Las toxinas insecticidas solubles secretadas y cristalinas son altamente específicas para sus huéspedes y se han ganado la aceptación mundial como alternativas a los insecticidas químicos. Por ejemplo, las proteínas de toxinas insecticidas se han utilizado en diversas aplicaciones agrícolas para proteger las plantas importantes a nivel rural de las infestaciones de insectos, disminuyen la necesidad

de aplicaciones de pesticidas químicos y aumentan los rendimientos. Las proteínas de toxinas insecticidas se utilizan para controlar las plagas relevantes ruralmente de las plantas de cultivo mediante métodos mecánicos, como la fumigación para dispersar fórmulas microbianas que contienen diversas cepas de bacterias sobre superficies de plantas y mediante el uso de técnicas de transformación genética para producir plantas y semillas transgénicas que expresan la proteína de toxina insecticida.

[09] El uso de plantas transgénicas que expresan proteínas de toxinas insecticidas se ha adaptado a nivel mundial. Por ejemplo, en 2012, se plantaron 26,1 millones de hectáreas con cultivos transgénicos que expresan toxinas *Bt* (James, C., Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2012 Resumen de ISAAA N.º 44). El uso global de cultivos protegidos contra insectos transgénicos y la cantidad limitada de proteínas de toxinas insecticidas utilizadas en estos cultivos creó una presión de selección de alelos de insectos que ofrecen resistencia a las proteínas insecticidas que se utilizan actualmente.

[010] El desarrollo de la resistencia en plagas objetivo a las proteínas de toxinas insecticidas crea la necesidad constante del descubrimiento y desarrollo de nuevas formas de proteínas de toxinas insecticidas que sean útiles para administrar el aumento de la resistencia de insectos a los cultivos transgénicos que expresan proteínas de toxinas insecticidas. Las nuevas toxinas de proteínas con una mejor eficacia y que exhiban control sobre un espectro más amplio de especies de insectos susceptibles reducirán la cantidad de insectos supervivientes que puedan desarrollar alelos de resistencia. Además, el uso en una planta de dos o más proteínas de toxinas insecticidas transgénicas tóxicas para las mismas plagas de insectos que exhiben diferentes modos de acción reduce la probabilidad de resistencia en cualquiera de las especies de insectos objetivos individuales.

[011] Por lo tanto, los creadores revelan una toxina de proteína novel de la familia de *Lysinibacillus sphaericus* junto con proteínas de toxinas similares, proteínas variantes y proteínas recombinantes ejemplares que muestran la actividad insecticida contra las especies de plagas objetivo de Coleópteros, Lepidópteros, Hemípteros y Tisanópteros, en particular contra los gusanos de maíz Western (*Diabrotica virgifera virgifera*).

COMPENDIO DE LA INVENCION

[012] En el presente documento se revela un grupo novel de proteínas pesticidas con actividad inhibitoria de insectos (proteínas de toxinas), denominadas en el presente como proteínas de toxinas relacionadas TIC6280 (TIC6280, TIC6281, TIC6282 y TIC6283) y proteínas de toxinas relacionadas

TIC7016 (TIC7016, TIC7017, TIC7108, TIC7110 y TIC7589), que se muestran para exhibir actividad inhibitoria contra una o más plagas de plantas de cultivo. Las proteínas de toxinas relacionadas TIC6280 y las clases de toxinas de proteínas relacionadas TIC7016 se pueden utilizar solas, como quimeras, para realizar proteínas fusionadas o en combinación con otras proteínas insecticidas y agentes tóxicos en formulaciones e *in planta*, proporcionando así alternativas a las proteínas insecticidas y químicos insecticidas actualmente en uso en los sistemas agrícolas.

[013] En una representación, se muestra en esta solicitud una molécula de ácido nucleico recombinante que consta de un promotor heterólogo operativamente enlazado con un segmento polinucleótido que codifica una proteína pesticida o fragmento del mismo, en la que: (a) dicha proteína pesticida consta de una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en lo siguiente: SEQ ID NO (números de identificación de secuencia): 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 18, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 36, 39, 42, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97 y 99; o (b) esa proteína pesticida consta de una secuencia de aminoácidos de por lo menos 62 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 % de identidad de una secuencia de aminoácidos para una secuencia de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en lo siguiente: SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 18, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 36, 39, 42, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97 y 99; o (c) ese segmento polinucleótido híbrida un polinucleótido con una secuencia nucleótida seleccionada del grupo que consiste en lo siguiente: SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 14, 16, 17, 19, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 35, 37, 38, 40, 41, 43, 44, 45, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, y 98; (d) esa molécula de ácido nucleico recombinante forma una unión operable a un vector, y ese vector es seleccionado de un grupo que consiste en un plásmido, fagémido, fásido, cósmido y un cromosoma artificial bacteriano o de levaduras. La molécula de ácido nucleico recombinante puede incluir una secuencia que funciona para expresar la proteína pesticida en una planta o se expresa en una célula vegetal para producir una cantidad efectiva de plaguicida de proteína pesticida.

[014] En otra representación de la presente solicitud se encuentran las células huéspedes que constan de una molécula de ácido nucleico recombinante de la aplicación, en la cual la célula huésped se selecciona del grupo que consta de una célula vegetal y otra bacteriana. Las células huéspedes contempladas incluyen *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Klebsiella* y *Erwinia*; y en la que la especie *Bacillus* es una *Bacillus cereus* o una *Bacillus thuringiensis*, dicha *Brevibacillus* es una *Brevibacillus laterosperous*, y dicha *Escherichia* es una *Escherichia coli*.

Las células huéspedes vegetales contempladas incluyen una célula dicotiledónea y una monocotiledónea. Además las células huéspedes vegetales contempladas incluyen alfalfa, banana, cebada, judía, brócoli, repollo, brassica, zanahoria, mandioca, ricino, coliflor, apio, garbanzo, repollo chino, citrus, coco, café, maíz, trébol, algodón, cucurbitácea, pepino, abeto de Douglas, berenjena, eucalipto, lino, ajo, uva, lúpulo, puerro, lechuga, pino de incienso, mijo, melón, nuez, avena, aceituna, cebolla, ornamental, palmera, pasto, guisante, maní, pimienta, arvejas, pino, papa, álamo, calabaza, pino Radiata, rábano, colza, arroz, rizoma, centeno, cártamo, arbusto, sorgo, pino sureño, soja, espinaca, calabacín, frutilla, remolacha, caña de azúcar, girasol, maíz dulce, dulce, batata, pasto varilla, té, tabaco, tomate, triticale, césped, sandía y trigo.

5 [015] Pero en otra representación, la proteína pesticida exhibe la actividad contra una especie de insectos del orden de Coleópteros, que incluye los gusanos de maíz del oeste, sur, norte, mexicano, brasileño o complejo brasileño en la que la especie de insectos son los gusanos de maíz del oeste, sur, norte, mexicano, brasileño o complejo brasileño que consisten en *Diabrotica viridula* y *Diabrotica speciosa*.

15 [016] En otra representación, la proteína pesticida muestra actividad contra una especie de insecto del orden de Lepidópteros, que incluye oruga de las leguminosas, barrenador de caña de azúcar, barrenador de maíz, gusano de maíz, gusano de tabaco, gusano de soja, gardamas negras, gardamas del sur, gusano cogollero, gusano soldado, gusano del viejo mundo, gusano de hoja oriental, gusano rosa, gusano negro, barrenador de maíz del suroeste, polilla de Diamondback y barrenador de maíz europeo.

20 [017] En otra representación, la proteína pesticida exhibe actividad contra una especie de insectos del orden de Hemípteros, que incluye la chinche verde sureña, la chinche marrón neotropical, la TPB del oeste y la TPB.

[018] En otra representación, la proteína pesticida exhibe la actividad contra una especie de insectos del orden de Tisanópteros, que incluye Tisanópteros de tabaco (*Frankliniella fusca*), Tisanópteros Flower (*Frankliniella tritici*), Tisanópteros Western Flower (*Frankliniella occidentalis*), y Tisanópteros de soja (*Sericothrips variabilis*).

25 [019] En esta solicitud también se contemplan plantas que incluyen una molécula de ácido nucleico recombinante que consta de un promotor heterólogo operativamente enlazado con un segmento polinucleótido que codifica una proteína pesticida o fragmento del mismo, en la que: (a) dicha proteína pesticida contiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en lo siguiente:
30 SEQ ID NO:23, 25, 27, 29, 31, 33, 36, 39, 42, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 81, 83,

85, 87, 89, 91, 93, 95, 97 y 99; o (b) esa proteína pesticida contiene una secuencia de aminoácidos de por lo menos 62 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 % de identidad de una secuencia de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en lo siguiente: SEQ ID NO:23, 25, 27, 29, 31, 33, 36, 39, 42, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97 y 99; o (c) ese segmento polinucleótido híbrida bajo condiciones de hibridación exigente para el cumplimiento de una secuencia nucleótida seleccionada del grupo que consiste en lo siguiente: SEQ ID NO:43, 44, 45, 46, 48, 50, 52; o (d) esa planta exhibe una cantidad detectable de dicha proteína pesticida, en la que la proteína pesticida se selecciona del grupo que consiste en: SEQ ID NO:23, 25, 27, 29, 31, 33, 36, 39, 42, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, y 99. En una representación, la planta es monocotiledónea o dicotiledónea. En otra representación, la planta se selecciona del grupo que incluye alfalfa, banana, cebada, judía, brócoli, repollo, brassica, zanahoria, mandioca, ricino, coliflor, apio, garbanzo, repollo chino, citrus, coco, café, maíz, trébol, algodón, cucurbitácea, pepino, abeto de Douglas, berenjena, eucalipto, lino, ajo, uva, lúpulo, puerro, lechuga, pino de incienso, mijo, melón, nuez, avena, aceituna, cebolla, ornamental, palmera, pasto, guisante, maní, pimienta, arvejas, pino, papa, álamo, calabaza, pino Radiata, rábano, colza, arroz, rizoma, centeno, cártamo, arbusto, sorgo, pino sureño, soja, espinaca, calabacín, frutilla, remolacha, caña de azúcar, girasol, maíz dulce, dulce, batata, pasto varilla, té, tabaco, tomate, triticales, césped, sandía y trigo.

[020] En otras representaciones, se muestran semillas que constan de moléculas de ácido nucleico recombinante.

[021] En otra representación, se contempla una composición inhibitoria de insectos que consta de moléculas de ácido nucleico recombinante revelada en esta solicitud. La composición inhibitoria de insectos además puede contener una secuencia nucleótida que codifica al menos un agente pesticida más que la proteína pesticida mencionada. Ese otro agente pesticida se selecciona del grupo que consiste en una proteína inhibitoria de insectos, una molécula dsARN inhibitoria de insectos, y una proteína secundaria. Ese otro agente pesticida en la composición inhibitoria de insectos muestra actividad contra una o más plagas de los órdenes de Lepidópteros, Hemípteros y Tisanópteros. El otro agente pesticida en la composición inhibitoria de insectos se selecciona del grupo que consiste en variantes Cry1A, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1A.105, Cry1Ae, Cry1B, Cry1C, Cry1C, variantes Cry1D, Cry1E, Cry1F, Cry1A/F, quimeras Cry1G, Cry1H, Cry1I, Cry1J, Cry1K, Cry1L, Cry2A, Cry2Ab, Cry2Ae, Cry3, Cry3A variantes, Cry3B, Cry4B, Cry6, Cry7, Cry8, Cry9, Cry15, Cry34, Cry35, Cry43A, Cry43B, Cry51Aa1, ET29, ET33, ET34, ET35, ET66, ET70, TIC400, TIC407, TIC417, TIC431, TIC800,

TIC807, TIC834, TIC853, TIC900, TIC901, TIC1201, TIC1415, TIC3131, VIP3A, VIP3B, VIP3Ab, AXMI-001, AXMI-002, AXMI-030, AXMI-035, AXMI-036, AXMI-045, AXMI-52, AXMI-58, AXMI-88, AXMI-97, AXMI-102, AXMI-112, AXMI-117, AXMI-100, AXMI-115, AXMI-113, y AXMI-005, AXMI134, AXMI-150, AXMI-171, AXMI-184, AXMI-196, AXMI-204, AXMI-07, AXMI-209, AXMI-205, AXMI-218, AXMI-220, AXMI-221z, AXMI-222z, AXMI-223z, AXMI-224z y AXMI-225z, AXMI-238, AXMI-270, AXMI-279, AXMI-345, AXMI-R1 y sus variantes, IP3 y sus variantes, DIG-3, DIG-5, DIG-10 y una proteína DIG-11.

[022] Se contemplan los productos básicos que constan de una cantidad detectable de moléculas de ácido nucleico recombinante reveladas en esta solicitud. Dichos productos básicos incluyen maíz empacado por un comerciante de granos, cereales, pasteles de maíz, harina de maíz, alimento de maíz, jarabe de maíz, aceite de maíz, ensilaje de maíz, almidón de maíz, cereal de maíz y similares, y los correspondientes productos básicos del algodón como semillas de algodón enteras o procesadas, aceite de algodón, hebra, semillas y partes de plantas procesadas para alimentos para animales o seres humanos, fibras, papel, biomasas, productos combustibles como combustible derivado de aceite de algodón o bolas derivadas de basura de algodón, y los correspondientes productos básicos de soja como semillas de soja enteras o procesadas, aceite de soja, proteína de soja, alimento de soja, harina de soja, cereales de soja, salvado de soja, leche de soja, queso de soja, vino de soja, alimento para animales de soja, papel de soja, crema de soja, biomasa de soja y productos combustibles producidos por plantas y partes de plantas de soja y los correspondientes arroz, trigo, sorgo, guandú, maní, fruta, melón y productos básicos vegetales que incluyen cuando corresponda, jugos, concentrados, confituras, jaleas, mermeladas y otras formas comestibles de dichos productos básicos que contienen una cantidad detectable de los mencionados polinucleótidos o polipéptidos de esta solicitud.

[023] En esta solicitud también se contemplan los métodos de producción de semillas que constan de una cantidad detectable de las moléculas de ácido nucleico recombinante revelada en esta solicitud. El método abarcará la siembra de al menos una de las semillas que contienen moléculas de ácido nucleico recombinante reveladas en la presente solicitud; el cultivo de la planta a partir de la semilla; y la cosecha de la semilla de esas plantas, las cuales contienen las moléculas de ácido nucleico recombinante en esta solicitud.

[024] En otra representación, una planta resistente a la infestación de insectos, en las cuales las células de dicha planta comprenden de manera opcional: (a) una molécula de ácido nucleico recombinante que codifica una cantidad efectiva de insecticida de una proteína pesticida, en la que la proteína se

selecciona del grupo que consta de lo siguiente: SEQ ID NO:23, 25, 27, 29, 31, 33, 36, 39, 42, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97 y 99; o (b) una cantidad efectiva de pesticida de una proteína que contenga una secuencia de aminoácidos de por lo menos 62 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 % de identidad de una secuencia de aminoácidos seleccionados del grupo que consta de lo siguiente: SEQ ID NO:23, 25, 27, 29, 31, 33, 36, 39, 42, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, y 99.

[025] En la presente solicitud también se revelan los métodos para controlar una plaga de las especies de Coleópteros, lepidópteros, hemípteros o tisanópteros y para controlar una infestación de plagas de las especies Coleópteros, lepidópteros, hemípteros o tisanópteros de una planta, en especial de una planta de cultivo. El método incluirá (a) el contacto de la plaga con una cantidad efectiva de proteína pesticida de una o más proteínas pesticidas, en las cuales las proteínas se seleccionan de un grupo que consiste en lo siguiente: SEQ ID NO:2, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 18, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 36, 39, 42, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97 y 99; o (b) el contacto de la plaga con una cantidad efectiva de una o más proteínas pesticidas que contiene una secuencia de aminoácidos de por lo menos 62 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 % de identidad de una secuencia de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en lo siguiente: SEQ ID NO n:2, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 18, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 36, 39, 42, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, y 99.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[026] En la Figura 1 se ilustra la cantidad media de larvas *Lygus lineolaris* sobrevivientes de la nueva generación y adultos expuestos a casos de algodón transformados con casetes de expresión utilizados para la expresión de TIC7016PL en comparación con un control no transformado.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS SECUENCIAS

[027] SEQ ID NO:1 es una secuencia de ácido nucleico obtenida de una especie *Lysinibacillus sphaericus* AG0067H07 que codifica una proteína pesticida TIC6280 con una etiqueta de histidina operablemente enlazada a un extremo de 3', referida en este documento como TIC6280-His.

[028] SEQ ID NO:2 es una secuencia de aminoácidos de la proteína TIC6280-His.

- [029] SEQ ID NO:3 es una secuencia de ácido nucleico obtenida de una especie *Lysinibacillus sphaericus* AG0067H03 que codifica una proteína pesticida TIC6281 con una etiqueta de histidina operablemente enlazada a un extremo de 3', referida en este documento como TIC6281-His.
- [030] SEQ ID NO:4 es una secuencia de aminoácidos de la proteína TIC6281-His.
- 5 [031] SEQ ID NO:5 es una secuencia de ácido nucleico obtenida de una especie *Lysinibacillus sphaericus* AG0069H08 que codifica una proteína pesticida TIC6282 con una etiqueta de histidina operablemente enlazada a un extremo de 3', referida en este documento como TIC6282-His.
- [032] SEQ ID NO:6 es una secuencia de aminoácidos de la proteína TIC6282-His.
- [033] SEQ ID NO:7 es una secuencia de ácido nucleico obtenida de una especie *Lysinibacillus*
10 *sphaericus* AG0025E04 que codifica una proteína pesticida TIC6283 con una etiqueta de histidina operablemente enlazada a un extremo de 3', referida en este documento como TIC6283-His.
- [034] SEQ ID NO:8 es una secuencia de aminoácidos de la proteína TIC6283-His.
- [035] SEQ ID NO:9 es una secuencia de ácido nucleico obtenida de una especie *Lysinibacillus sphaericus* EGBS0420 que codifica una proteína pesticida TIC7016 con una etiqueta de histidina
15 operablemente enlazada a un extremo de 3', referida en este documento como TIC7016-His.
- [036] SEQ ID NO:10 es una secuencia de aminoácidos de la proteína TIC7016-His.
- [037] SEQ ID NO:11 es una secuencia de ácido nucleico obtenida de una especie *Lysinibacillus sphaericus* EGBS1094 que codifica una proteína pesticida TIC7017 con una etiqueta de histidina operablemente enlazada a un extremo de 3', referida en este documento como TIC7017-His.
- 20 [038] SEQ ID NO:12 es una secuencia de aminoácidos de la proteína TIC7017-His.
- [039] SEQ ID NO:13 es una secuencia de ácido nucleico obtenida de una especie *Lysinibacillus sphaericus* AG0025E04 que codifica una proteína pesticida TIC7107, que tiene una secuencia de aminoácido 100 % idéntica a la secuencia de aminoácido de TIC7110, con una etiqueta de histidina operablemente enlazada a un extremo de 3', referida en este documento como TIC7107-His.
- 25 [040] SEQ ID NO:14 es una secuencia de ácido nucleico obtenida de una especie *Lysinibacillus sphaericus* AG0067H01 que codifica una proteína pesticida TIC7108 con una etiqueta de histidina operablemente enlazada a un extremo de 3', referida en este documento como TIC7108-His.
- [041] SEQ ID NO:15 es una secuencia de aminoácidos de la proteína TIC7108-His.
- [042] SEQ ID NO:16 es una secuencia de ácido nucleico obtenida de una especie *Lysinibacillus*
30 *sphaericus* AG0067H03 que codifica una proteína pesticida TIC7109, que tiene una secuencia de

aminoácido 100 % idéntica a la secuencia de aminoácido de TIC7110, con una etiqueta de histidina operablemente enlazada a un extremo de 3', referida en este documento como TIC7109-His.

[043] SEQ ID NO:17 es una secuencia de ácido nucleico obtenida de una especie *Lysinibacillus sphaericus* AG0067H07 que codifica una proteína pesticida TIC7110 con una etiqueta de histidina operablemente enlazada a un extremo de 3', referida en este documento como TIC7110-His.

[044] SEQ ID NO:18 es una secuencia de aminoácidos de la proteína TIC7110-His.

[045] SEQ ID NO:19 es una secuencia de ácido nucleico obtenida de una especie *Lysinibacillus sphaericus* AG0069H08 que codifica una proteína pesticida TIC7111, que tiene una secuencia de aminoácido 100 % idéntica a la secuencia de aminoácido de TIC7110, con una etiqueta de histidina operablemente enlazada a un extremo de 3', referida en este documento como TIC7111-His.

[046] SEQ ID NO:20 es una secuencia de ácido nucleico obtenida de una especie *Lysinibacillus sphaericus* AG0122F12 que codifica una proteína pesticida TIC7589 con una etiqueta de histidina operablemente enlazada a un extremo de 3', referida en este documento como TIC7589-His.

[047] SEQ ID NO:21 es una secuencia de aminoácidos de la proteína TIC7589-His.

[048] SEQ ID NO:22 es una secuencia de ácido nucleico obtenida de una especie *Lysinibacillus sphaericus* AG0067H07 que codifica una proteína pesticida TIC6280.

[049] SEQ ID NO:23 es una secuencia de aminoácidos de la proteína TIC6280-His.

[050] SEQ ID NO:24 es una secuencia de ácido nucleico obtenida de una especie *Lysinibacillus sphaericus* AG0067H03 que codifica una proteína pesticida TIC6281.

[051] SEQ ID NO:25 es una secuencia de aminoácidos de la proteína TIC6281-His.

[052] SEQ ID NO:26 es una secuencia de ácido nucleico obtenida de una especie *Lysinibacillus sphaericus* AG0069H08 que codifica una proteína pesticida TIC6282.

[053] SEQ ID NO:27 es una secuencia de aminoácidos de la proteína TIC6282-His.

[054] SEQ ID NO:28 es una secuencia de ácido nucleico obtenida de una especie *Lysinibacillus sphaericus* AG0025E04 que codifica una proteína pesticida TIC6283.

[055] SEQ ID NO:29 es una secuencia de aminoácidos de la proteína TIC6283-His.

[056] SEQ ID NO:30 es una secuencia de ácido nucleico obtenida de una especie *Lysinibacillus sphaericus* EGBS0420 que codifica una proteína pesticida TIC7016.

[057] SEQ ID NO:31 es una secuencia de aminoácidos de la proteína TIC7016-His.

[058] SEQ ID NO:32 es una secuencia de ácido nucleico obtenida de una especie *Lysinibacillus sphaericus* EGBS1094 que codifica una proteína pesticida TIC7017.

- [059] SEQ ID NO:33 es una secuencia de aminoácidos de la proteína TIC7017-His.
- [060] SEQ ID NO:34 es una secuencia de ácido nucleico obtenida de una especie *Lysinibacillus sphaericus* AG0025E04 que codifica una proteína pesticida TIC7107, que tiene una secuencia de aminoácido 100 % idéntica a la secuencia de aminoácido de TIC7110.
- 5 [061] SEQ ID NO:35 es una secuencia de ácido nucleico obtenida de una especie *Lysinibacillus sphaericus* AG0067H01 que codifica una proteína pesticida TIC7108.
- [062] SEQ ID NO:36 es una secuencia de aminoácidos de la proteína TIC7108.
- [063] SEQ ID NO:37 es una secuencia de ácido nucleico obtenida de una especie *Lysinibacillus sphaericus* AG0067H03 que codifica una proteína pesticida TIC7109, que tiene una secuencia de
- 10 aminoácido 100 % idéntica a la secuencia de aminoácido de TIC7110.
- [064] SEQ ID NO:38 es una secuencia de ácido nucleico obtenida de una especie *Lysinibacillus sphaericus* AG0067H07 que codifica una proteína pesticida TIC7110.
- [065] SEQ ID NO:39 es una secuencia de aminoácidos de la proteína TIC7110.
- [066] SEQ ID NO:40 es una secuencia de ácido nucleico obtenida de una especie *Lysinibacillus*
- 15 *sphaericus* AG0069H08 que codifica una proteína pesticida TIC7111, que tiene una secuencia de aminoácido 100 % idéntica a la secuencia de aminoácido de TIC7110.
- [067] SEQ ID NO:41 es una secuencia de ácido nucleico obtenida de una especie *Lysinibacillus sphaericus* AG0122F12 que codifica una proteína pesticida TIC7589.
- [068] SEQ ID NO:42 es una secuencia de aminoácidos de la proteína TIC7589.
- 20 [069] SEQ ID NO:43 es una secuencia de codificación sintética que codifica una proteína pesticida TIC6280 diseñada para la expresión en una célula vegetal.
- [070] SEQ ID NO:44 es una secuencia de codificación sintética que codifica una proteína pesticida TIC6282 diseñada para la expresión en una célula vegetal.
- [071] SEQ ID NO:45 es una secuencia de codificación sintética que codifica una proteína pesticida
- 25 TIC6283 diseñada para la expresión en una célula vegetal.
- [072] SEQ ID NO:46 es una secuencia de codificación sintética que codifica una proteína pesticida TIC7016PL diseñada para la expresión en una célula vegetal, en la cual se inserta un codón adicional que codifica el residuo de alanina inmediatamente después del codón de inicio de metionina.
- [073] SEQ ID NO:47 es una secuencia de aminoácido de TIC7016PL, en la que un residuo de alanina
- 30 adicional se inserta inmediatamente después del inicio de metionina.

- [074] SEQ ID NO:48 es una secuencia de codificación sintética que codifica una proteína pesticida TIC7017PL diseñada para la expresión en una célula vegetal, en la cual se inserta un codón adicional que codifica el residuo de alanina inmediatamente después del codón de inicio de metionina.
- [075] SEQ ID NO:49 es una secuencia de aminoácido de TIC7017PL, en la que un residuo de alanina adicional se inserta inmediatamente después del inicio de metionina.
- [076] SEQ ID NO:50 es una secuencia de codificación sintética que codifica una proteína pesticida TIC7108PL diseñada para la expresión en una célula vegetal, en la cual se inserta un codón adicional que codifica el residuo de alanina inmediatamente después del codón de inicio de metionina.
- [077] SEQ ID NO:51 es una secuencia de aminoácido de TIC7108PL, en la que un residuo de alanina adicional se inserta inmediatamente después del inicio de metionina.
- [078] SEQ ID NO:52 es una secuencia de codificación sintética que codifica una proteína pesticida TIC7110PL diseñada para la expresión en una célula vegetal, en la cual se inserta un codón adicional que codifica el residuo de alanina inmediatamente después del codón de inicio de metionina.
- [079] SEQ ID NO:53 es una secuencia de aminoácido de TIC7110PL, en la que un residuo de alanina adicional se inserta inmediatamente después del inicio de metionina.
- [080] SEQ ID NO:54 es una secuencia sintética que codifica una proteína de toxina de fusión de TIC7110/TIC6280, TIC7110-TIC6280F1, en la que las dos proteínas de toxinas que codifican secuencias son contiguas y enmarcadas.
- [081] SEQ ID NO:55 es una secuencia de aminoácido de una proteína de toxina de fusión de TIC7110/TIC6280, TIC7110-TIC6280F1, en la que las dos secuencias de aminoácidos de las proteínas de toxinas son contiguas.
- [082] SEQ ID NO:56 es una secuencia sintética que codifica una proteína de toxina de fusión de TIC7110/TIC6280, TIC7110-TIC6280F2, en donde una secuencia de molécula de unión divisible (Molécula de unión 1) se enlaza operablemente y se enmarca entre las dos secuencias de codificación de la proteína de toxina.
- [083] SEQ ID NO:57 es una secuencia de aminoácidos de una proteína de toxina de fusión de TIC7110/TIC6280, TIC7110-TIC6280F2, en la cual una secuencia del péptido de molécula de unión divisible (Molécula de unión 1) se inserta entre las dos secuencias de aminoácidos de la proteína de toxina.
- [084] SEQ ID NO:58 es una secuencia sintética que codifica una proteína de toxina de fusión de TIC7110/TIC6280, TIC7110-TIC6280F3, en donde una secuencia de molécula de unión divisible

(Molécula de unión 2) se enlaza operablemente y se enmarca entre las dos secuencias de codificación de la proteína de toxina.

[085] SEQ ID NO:59 es una secuencia de aminoácidos de una proteína de toxina de fusión de TIC7110/TIC6280, TIC7110-TIC6280F3, en la cual una secuencia del péptido de molécula de unión divisible (Molécula de unión 2) se inserta entre las dos secuencias de aminoácidos de la proteína de toxina.

[086] SEQ ID NO:60 es una secuencia sintética que codifica una proteína de toxina de fusión de TIC7111/TIC6282, TIC7111-TIC6282F1, en la que las dos proteínas de toxinas que codifican secuencias son contiguas y enmarcadas.

[087] SEQ ID NO:61 es una secuencia de aminoácido de una proteína de toxina de fusión de TIC7111/TIC6282, TIC7111-TIC6282F1, en la que las dos secuencias de aminoácidos de las proteínas de toxinas son contiguas.

[088] SEQ ID NO:62 es una secuencia sintética que codifica una proteína de toxina de fusión de TIC7111/TIC6282, TIC7111-TIC6282F2, en donde una secuencia de molécula de unión divisible (Molécula de unión 1) se enlaza operablemente y se enmarca entre las dos secuencias de codificación de la proteína de toxina.

[089] SEQ ID NO:63 es una secuencia de aminoácidos de una proteína de toxina de fusión de TIC7111/TIC6282, TIC7111-TIC6282F2, en la cual una secuencia del péptido de molécula de unión divisible (Molécula de unión 1) se inserta entre las dos secuencias de aminoácidos de la proteína de toxina.

[090] SEQ ID NO:64 es una secuencia sintética que codifica una proteína de toxina de fusión de TIC7111/TIC6282, TIC7111-TIC6282F3, en donde una secuencia de molécula de unión divisible (Molécula de unión 2) se enlaza operablemente y se enmarca entre las dos secuencias de codificación de la proteína de toxina.

[091] SEQ ID NO:65 es una secuencia de aminoácidos de una proteína de toxina de fusión de TIC7111/TIC6282, TIC7111-TIC6282F3, en la cual una secuencia del péptido de molécula de unión divisible (Molécula de unión 2) se inserta entre las dos secuencias de aminoácidos de la proteína de toxina.

[092] SEQ ID NO:66 es una secuencia sintética que codifica una proteína de toxina de fusión de TIC7109/TIC6281, TIC7109-TIC6281F1, en la que las dos proteínas de toxinas que codifican secuencias son contiguas y enmarcadas.

[093] SEQ ID NO:67 es una secuencia de aminoácido de una proteína de toxina de fusión de TIC7109/TIC6281, TIC7109-TIC6281F1, en la que las dos secuencias de aminoácidos de las proteínas de toxinas son contiguas.

[094] SEQ ID NO:68 es una secuencia sintética que codifica una proteína de toxina de fusión de TIC7109/TIC6281, TIC7109-TIC6281F2, en donde una secuencia de molécula de unión divisible (Molécula de unión 1) se enlaza operablemente y en marco entre las dos secuencias de codificación de la proteína de toxina.

[095] SEQ ID NO:69 es una secuencia de aminoácidos de una proteína de toxina de fusión de TIC7109/TIC6281, TIC7109-TIC6281F2, en la cual una secuencia del péptido de molécula de unión divisible (Molécula de unión 1) se enlaza operablemente y en marco entre las dos secuencias de aminoácidos de la proteína de toxina.

[096] SEQ ID NO:70 es una secuencia sintética que codifica una proteína de toxina de fusión de TIC7109/TIC6281, la TIC7109-TIC6281F3, en donde una secuencia de enlazador flexible (Enlazador 2) se enlaza operablemente y en marco entre las dos secuencias de codificación de la proteína de toxina.

[097] SEQ ID NO:71 es una secuencia de aminoácidos de una proteína de toxina de fusión de TIC7109/TIC6281, la TIC7109-TIC6281F3, en la cual una secuencia del péptido enlazador flexible (Enlazador 2) se enlaza operablemente y en marco entre las dos secuencias de aminoácidos de la proteína de toxina.

[098] SEQ ID NO:72 es una secuencia de ADN sintético que codifica un enlazador segmentable, el Enlazador 1, que está operablemente enlazado y enmarcado entre las dos secuencias de codificación de toxinas.

[099] SEQ ID NO:73 es la secuencia de aminoácidos del enlazador segmentable, el Enlazador 1.

[0100] SEQ ID NO:74 es una secuencia de ADN sintético que codifica un enlazador segmentable, el Enlazador 2, que está operablemente enlazado y enmarcado entre las dos secuencias de codificación de toxinas.

[0101] SEQ ID NO:75 es la secuencia de aminoácidos del enlazador flexible, el Enlazador 2.

[0102] SEQ ID NO:76 es una secuencia sintética de un operón, la TIC7110-TIC6280operón, que comprende la secuencia de codificación de la TIC7110 seguida de la secuencia de codificación de la TIC6280, en donde un enlazador de operón (Operón_Linker) se inserta entre las dos secuencias de codificación.

- [0103] SEQ ID NO:77 es una secuencia sintética de un operón, la TIC7111-TIC6282 operón, que comprende la secuencia de codificación de la TIC7111 seguida de la secuencia de codificación de la TIC6282, en donde un enlazador de operón (Operón_Linker) se inserta entre las dos secuencias de codificación.
- 5 [0104] SEQ ID NO:78 es una secuencia sintética de un operón, la TIC7109-TIC6281operón, que comprende la secuencia de codificación de la TIC7109 seguida de la secuencia de codificación de la TIC6281, en donde un enlazador de operón (Operón_Linker) se inserta entre las dos secuencias de codificación.
- [0105] SEQ ID NO:79 es una secuencia sintética de un enlazador, el Operón_Linker, que comprende en
10 el extremo 5' un codón de terminación para finalizar la traducción de un primer gen de toxina y se inserta entre dos secuencias de codificación de proteína de toxina para permitir la expresión de ambas proteínas de toxina en el huésped bacteriano.
- [0106] SEQ ID NO:80 es una secuencia de ácido nucleico obtenida de un metagenoma de raspado de placa designado como MTG000070 y que codifica una proteína plaguicida TIC8808 con una etiqueta de
15 histidina operablemente enlazada a un extremo 3', referida en este documento como TIC8808-His.
- [0107] SEQ ID NO:81 es una secuencia de aminoácidos de la proteína TIC8808-His.
- [0108] SEQ ID NO:82 es una secuencia de ácido nucleico obtenida de una metagenoma de raspado de placa designado como MTG000415 y que codifica una proteína plaguicida TIC9480 con una etiqueta de histidina operablemente enlazada a un extremo 3', referida en este documento como TIC9480-His.
- 20 [0109] SEQ ID NO:83 es una secuencia de aminoácidos de la proteína TIC9480-His.
- [0110] SEQ ID NO:84 es una secuencia de ácido nucleico obtenida de una metagenoma de raspado de placa designado como MTG000199 y que codifica una proteína plaguicida TIC9257 con una etiqueta de histidina operablemente enlazada a un extremo 3', referida en este documento como TIC9257-His.
- [0111] SEQ ID NO:85 es una secuencia de aminoácidos de la proteína TIC9257-His.
- 25 [0112] SEQ ID NO:86 es una secuencia de ácido nucleico obtenida de una metagenoma de raspado de placa designado como MTG000120 y que codifica una proteína plaguicida TIC9258 con una etiqueta de histidina operablemente enlazada a un extremo 3', referida en este documento como TIC9258-His.
- [0113] SEQ ID NO:87 es la secuencia de aminoácidos de la proteína TIC9258-His.
- [0114] SEQ ID NO:88 es una secuencia de ácido nucleico obtenida de una metagenoma de raspado de
30 placa designado como MTG000184 y que codifica una proteína plaguicida TIC9259 con una etiqueta de histidina operablemente enlazada a un extremo 3', referida en este documento como TIC9259-His.

- [0115] SEQ ID NO:89 es la secuencia de aminoácidos de la proteína TIC9259-His.
- [0116] SEQ ID NO:90 es una secuencia de ácido nucleico obtenida de un metagenoma de raspado de placa designado como MTG000184, que codifica una proteína plaguicida TIC8808.
- [0117] SEQ ID NO:91 es una secuencia de aminoácidos de la proteína TIC8808.
- 5 [0118] SEQ ID NO:92 es una secuencia de ácido nucleico obtenida de un metagenoma de raspado de placa designado como MTG000415, que codifica una proteína plaguicida TIC9480.
- [0119] SEQ ID NO:93 es una secuencia de aminoácidos de la proteína TIC9480.
- [0120] SEQ ID NO:94 es una secuencia de ácido nucleico obtenida de un metagenoma de raspado de placa designado como MTG000199, que codifica una proteína plaguicida TIC9257.
- 10 [0121] SEQ ID NO:95 es la secuencia de aminoácidos de la proteína TIC9257.
- [0122] SEQ ID NO:96 es una secuencia de ácido nucleico obtenida de un metagenoma de raspado de placa designado como MTG000120, que codifica una proteína plaguicida TIC9258.
- [0123] SEQ ID NO:97 es la secuencia de aminoácidos de la proteína TIC9258.
- [0124] SEQ ID NO:98 es una secuencia de ácido nucleico obtenida de un metagenoma de raspado de
- 15 placa designado como MTG000184, que codifica una proteína plaguicida TIC9259.
- [0125] SEQ ID NO:99 es la secuencia de aminoácidos de la proteína TIC9259.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

- 20 [0126] El problema en el arte del control de plagas para la agricultura puede caracterizarse como una necesidad de nuevas proteínas de toxinas que sean eficaces contra las plagas de destino, que exhiban una toxicidad de amplio espectro contra las especies de plagas de destino, que sean capaces de expresarse en plantas sin causar problemas agronómicos no deseados y que proporcionen un modo de acción alternativo comparado con las toxinas actuales que se usan comercialmente en las plantas.
- 25 [0127] Las clases de proteínas plaguicidas novedosas ejemplificadas por la proteína TIC6280 y los miembros de la proteína de toxina relacionada con la TIC6280, junto con la proteína TIC7016 y los miembros de la proteína de toxina relacionada con la TIC7016, se detallan en este documento y abordan cada una de estas necesidades, en particular contra un amplio espectro de plagas de insectos coleópteros, lepidópteros, hemípteros y tisanópteros, y más en particular contra especies de plagas del escarabajo del
- 30 maíz occidental.

[0128] La mención, en esta aplicación, a TIC6280, “proteína TIC6280”, “toxina de proteína TIC6280”, “proteína de toxina TIC6280”, “proteína plaguicida TIC6280”, “toxinas relacionadas con la TIC6280” o “proteínas de toxina relacionadas con la TIC6280” y similares, se refieren a cualquier proteína plaguicida novedosa o proteína inhibitoria de insectos, que comprende, consiste, es sustancialmente homóloga, similar o deriva de cualquier proteína plaguicida o secuencias de proteína inhibitoria contra insectos de TIC6280 (SEQ ID NO:23), TIC6281 (SEQ ID NO:25), TIC6282 (SEQ ID NO:27), TIC6283 (SEQ ID NO:29), TIC8808 (SEQ ID NO:91), TIC9480 (SEQ ID NO:93) y TIC9257 (SEQ ID NO:95) y los segmentos de pesticidas o inhibidores de insectos del mismo, o combinaciones del mismo, que confieren actividad contra plagas de coleópteros, lepidópteros, hemípteros y/o tisanópteros, incluido cualquier pesticida que exhiba proteínas o actividad inhibitoria de insectos, si la alineación de dicha proteína con TIC6280 se traduce en la identidad de secuencia de aminoácidos de cualquier porcentaje de fracción desde aproximadamente 62 a aproximadamente 100 por ciento.

[0129] La mención en esta aplicación a TIC7016, “proteína TIC7016”, “toxina de proteína TIC7016”, “proteína de toxina TIC7016”, “proteína plaguicida TIC7016”, “toxinas relacionadas con la TIC7016” o “proteínas de toxina relacionadas con la TIC7016” y similares, se refieren a cualquier proteína de pesticida novedosa o proteína inhibitoria de insectos, que comprende, consiste, es sustancialmente homóloga, similar o deriva de cualquier proteína plaguicida o secuencias de proteína inhibitoria contra insectos TIC7016 (SEQ ID NO:31), TIC7017 (SEQ ID NO:33), TIC7108 (SEQ ID NO:36), TIC7110 (SEQ ID NO:39), TIC7589 (SEQ ID NO:42), TIC9258 (SEQ ID NO:97) y TIC9259 (SEQ ID NO:99) y los segmentos plaguicidas o inhibidores de insectos del mismo, o combinaciones del mismo, que confieren actividad contra plagas de coleópteros, lepidópteros, hemípteros y/o tisanópteros, incluida cualquier proteína que exhiba actividad plaguicida o inhibitoria de insectos si la alineación de dicha proteína con TIC7016 se traduce en la identidad de la secuencia del aminoácidos de cualquier porcentaje de fracción desde aproximadamente 62 a aproximadamente 100 por ciento.

[0130] El término “segmento” o “fragmento” se usa en esta aplicación para describir secuencias consecutivas de aminoácidos o ácidos nucleicos que son más cortos que la secuencia completa de aminoácidos o ácidos nucleicos que describen una proteína TIC6280 o proteína de toxina relacionada con TIC6280, o una proteína TIC7016 o proteína de toxina relacionada con TIC7016. Un segmento o fragmento que exhibe actividad inhibitoria contra insectos también se detalla en esta aplicación si la alineación de tal segmento o fragmento, con la sección correspondiente de la proteína TIC6280 presentada en la secuencia SEQ ID NO:23 o la proteína TIC7016 presentada en la secuencia SEQ ID

NO:31, se traduce en la identidad de la secuencia de aminoácidos de cualquier porcentaje de fracción de aproximadamente 62 a 100 por ciento entre el segmento o fragmento y la sección correspondiente de la proteína TIC6280 o la proteína TIC7016, respectivamente.

[0131] En incorporaciones más específicas, un fragmento de una proteína TIC6280 o proteína de toxina relacionada con la TIC6280, o una proteína TIC7016 o proteína de toxina relacionada con la TIC7016, puede definirse como exhibidora de actividad plaguicida poseída por la molécula de proteína inicial de la cual deriva. Un fragmento de una proteína TIC6280 o proteína de toxina relacionada con la TIC6280, o una proteína TIC7016 o proteína de toxina relacionada con la TIC7016, puede definirse como exhibidora de actividad plaguicida poseída por la molécula de la proteína inicial de la cual deriva. Un fragmento o variante descrita en este documento puede incluso comprender un dominio identificado en este documento y que es responsable por la actividad plaguicida de una proteína.

[0132] En incorporaciones específicas, se proporcionan fragmentos de una proteína TIC6280 o proteína de toxina relacionada con la TIC6280, o una proteína TIC7016 o proteína de toxina relacionada con la TIC7016, que comprenden al menos aproximadamente 50, al menos aproximadamente 75, al menos aproximadamente 95, al menos aproximadamente 100, al menos aproximadamente 125, al menos aproximadamente 150, al menos aproximadamente 175, al menos aproximadamente 200, al menos aproximadamente 225, al menos aproximadamente 250, al menos aproximadamente 275, al menos aproximadamente 300, al menos aproximadamente 500, al menos aproximadamente 600, al menos aproximadamente 700, al menos aproximadamente 750, al menos aproximadamente 800, al menos aproximadamente 900, al menos aproximadamente 1000, al menos aproximadamente 1100, al menos aproximadamente 1150 o al menos aproximadamente 1175 aminoácidos contiguos o más largo, de una proteína TIC6280 o proteína de toxina relacionada con la TIC6280, o una proteína TIC7016 o proteína de toxina relacionada con la TIC7016 que poseen actividad plaguicida como se detalla en este documento. En ciertas incorporaciones, la invención proporciona fragmentos de cualquiera de la TIC6280 (SEQ ID NO:23), TIC6281 (SEQ ID NO:25), TIC6282 (SEQ ID NO:27), TIC6283 (SEQ ID NO:29), TIC8808 (SEQ ID NO:91), TIC9480 (SEQ ID NO:93) y TIC9257 (SEQ ID NO:95), o de la TIC7016 (SEQ ID NO:31), TIC7017 (SEQ ID NO:33), TIC7108 (SEQ ID NO:36), TIC7110 (SEQ ID NO:39), TIC7589 (SEQ ID NO:42), TIC9258 (SEQ ID NO:97) y TIC9259 (SEQ ID NO:99), y que poseen la actividad de la secuencia de largo completa. Los métodos para producir tales fragmentos a partir de una molécula inicial son conocidos en este arte.

[0133] La referencia en esta aplicación a los términos “activo” o “actividad”, “actividad plaguicida”, “pesticida” o “actividad insecticida”, “inhibitorio de insectos” o “insecticida” se refieren a la eficacia de un agente tóxico, tal como una toxina de proteína, para inhibir (inhibir crecimiento, alimentación, fecundidad o viabilidad), suprimir (suprimir crecimiento, alimentación, fecundidad o viabilidad), controlar (controlar infestación de plaga, controlar actividades de alimentación de plaga en un cultivo particular que contenga una cantidad efectiva de una proteína TIC6280 o proteína de toxina relacionada con la TIC6280, o una proteína TIC7016 o proteína de toxina relacionada con la TIC7016) o matar (causar la morbilidad, mortalidad o reducir la fecundidad) una plaga. Estos términos tienen por objetivo incluir el resultado de proporcionar una cantidad efectiva, en función del plaguicida, de una proteína tóxica para una plaga en la que la exposición de la plaga a la proteína tóxica se traduce en morbilidad, mortalidad, fecundidad reducida o atrofia. Estos términos también incluyen la repulsión de la plaga de la planta, un tejido de la planta, una parte de la planta, semilla, células de la planta o de una ubicación geográfica particular en donde la planta pudiera estar creciendo, como resultado de proporcionar una cantidad efectiva en términos del plaguicida de la proteína tóxica en o sobre la planta. En general, la actividad plaguicida se refiere a la capacidad de una proteína tóxica de ser efectiva para inhibir el crecimiento, desarrollo, viabilidad, comportamiento alimenticio, comportamiento de apareamiento, fecundidad o cualquier disminución mensurable en los efectos adversos causados por un insecto que se alimenta de esta proteína, fragmento de proteína, segmento de proteína o polinucleótido de una plaga de destino particular, incluyendo aunque no limitándose al orden de los lepidópteros, coleópteros, hemípteros o tisanópteros. La proteína tóxica puede reproducirse por la planta o puede aplicarse a la planta o al ambiente dentro de la ubicación en la que se encuentra la planta. Los términos “bioactividad”, “efectivo”, “eficaz” o variaciones de estos también son términos intercambiables utilizados en esta aplicación para describir los efectos de las proteínas de la presente invención en la plagas de insectos de destino.

[0134] Una cantidad efectiva, en términos del plaguicida, de un agente tóxico proporcionado en la dieta de una plaga de destino, exhibe actividad pesticida cuando el agente tóxico entra en contacto con la plaga. Un agente tóxico puede ser una proteína plaguicida o uno o más agentes químicos conocidos en la técnica. Los agentes plaguicidas o insecticidas y los agentes de proteína plaguicida o insecticida pueden utilizarse solos o en combinándose unos con otros. Los agentes químicos incluyen aunque no se limitan a las moléculas siRNA dirigidas a genes específicos para la supresión en una plaga de destino, organoclorados, organofosfatos, carbamatos, piretroides, neonicotinoides y rianoides. Los agentes de

proteína plaguicida o insecticida incluyen las toxinas de proteína expuestas en esta aplicación, así como también a otros agentes tóxicos proteináceos que incluyen a lo que tienen como destino las especies de lepidópteros, coleópteros, hemípteros o tisanópteros.

[0135] Se espera que la referencia a una plaga, particularmente a una plaga de una planta de cultivo, 5 signifique que las plagas de insectos de plantas de cultivo, en particular aquellas que están controladas por la proteína TIC6280 o por la proteína de toxina relacionada con la TIC6280, o una proteína TIC7016 o proteína de toxina relacionada con la TIC7016. La referencia a una plaga también puede incluir plagas de insectos homópteros de las plantas, así como también nemátodos y hongos cuando los agentes tóxicos que tiene como destino estas plagas están ubicados conjuntamente o presentes conjuntamente con la 10 proteína de toxina relacionada con la TIC6280 o proteína de toxina relacionada con la TIC7016, o una proteína que es idéntica de 62 a aproximadamente 100 por ciento a las proteínas de toxina TIC6280 o TIC7016, respectivamente.

[0136] Las proteínas de toxina relacionadas con la TIC6280 y la TIC7016 exhiben actividad insecticida hacia plagas de insectos de las especies de coleópteros y lepidópteros, las cuales incluyen adultos, 15 crisálidas, larvas y neonatos, así como también especies de insectos hemípteros, incluidos adultos y ninfas y las especies de insectos tisanópteros, entre los que se incluyen a adultos, crisálidas, precrisálidas y larvas.

[0137] Los insectos de la orden de lepidópteros incluyen, aunque no se limitan a, polillas, gusanos cortadores, orugas y polillas de la familia Noctuidae, por ejemplo, cogollero del maíz (*Spodoptera frugiperda*), gusano soldado (*Spodoptera exigua*), polilla africana (*Spodoptera exempta*), oruga militar del sur (*Spodoptera eridania*), polilla de Bertha (*Mamestra configurata*), gusano cortador negro (*Agrotis 20 ipsilon*), oruga del repollo (*Trichoplusia ni*), oruga de la soja (*Pseudoplusia includens*), oruga de las leguminosas (*Anticarsia gemmatilis*), gusano de trébol verde (*Hypena scabra*), gusano cogollero (*Heliothis virescens*), gusano graneado (*Agrotis subterranea*), oruga militar verdadera (*Pseudaletia 25 unipuncta*), gusano occidental (*Agrotis orthogonia*); polillas, barrenadores, polillas de red, polillas de cono, polillas de repollo y oruguetas de la familia Pyralidae, por ejemplo, taladro del maíz (*Ostrinia nubilalis*), gusano naranja (*Amyelois transitella*), polilla de la raíz del maíz (*Crambus caliginosellus*), polilla del césped (*Herpetogramma licarsisalis*), polilla del girasol (*Homoeosoma electellum*), barrenador menor del maíz (*Elasmopalpus lignosellus*); enrolladores de hoja, gusano de capullo, 30 gusanos de semilla y gusanos de grutas, y en la familia de Tortricidae, por ejemplo, carpocapsa (*Cydia pomonella*), polilla de la uva (*Endopiza viteana*), polilla de fruta oriental (*Grapholita molesta*), polilla

del capullo de girasol (*Suleima helianthana*) y muchos otros lepidópteros económicamente importantes, como por ejemplo, polilla de las coles (*Plutella xylostella*), lagarta rosada (*Pectinophora gossypiella*) y polilla gitana (*Lymantria dispar*). Otras plagas de insectos del orden de los lepidópteros incluyen, por ejemplo, oruga de la hoja (*Alabama argillacea*), enrollador de hoja de fruta (*Archips argyrospila*),
5 enrollador europeo (*Archips rosana*) y otras especies de *Archips*, (*Chilo suppressalis*, polillas asiáticas del arroz o polilla del tallo de arroz), enrollador de hoja de arroz (*Cnaphalocrocis medinalis*), polilla de raíz del maíz (*Crambus caliginosellus*), polilla de césped azul (*Crambus teterrellus*), polilla del maíz sureño (*Diatraea grandiosella*), polilla de la caña de azúcar (*Diatraea saccharalis*), oruga espinosa del algodónero (*Earias insulana*), oruga manchada (*Earias vittella*), oruga americana (*Helicoverpa armigera*), gusano elotero (*Helicoverpa zea*, también conocido como gusano de la soja y gusano del algodón), gusano cogollero (*Heliothis virescens*), polilla del césped (*Herpetogramma licarsisalis*), gusano de frijol occidental (*Striacosta albicosta*), polilla de vid europea (*Lobesia botrana*), polilla de hoja cítrica (*Phyllocnistis citrella*), mariposa blanca grande (*Pieris brassicae*), mariposa blanca pequeña (*Pieris rapae*, también conocida como gusano del repollo), gusano soldado (*Spodoptera exigua*), gusano
10 cogollero (*Spodoptera litura*, también conocido como oruga de racimo) y polilla del tomate (*Tuta absoluta*).

[0138] Los insectos del orden de los coleópteros incluyen, aunque no se limitan a, *Agriotes* spp., *Anthonomus* spp., *Atomaria linearis*, *Chaetocnema tibialis*, *Cosmopolites* spp., *Curculio* spp., *Dermestes* spp., *Diabrotica* spp., *Epilachna* spp., *Eremnus* spp., *Leptinotarsa decemlineata*, *Lissorhoptrus* spp.,
20 *Melolontha* spp., *Oryzaephilus* spp., *Otiorhynchus* spp., *Phlyctinus* spp., *Popillia* spp., *Psylliodes* spp., *Rhizopertha* spp., *Scarabeidae*, *Sitophilus* spp., *Sitotroga* spp., *Tenebrio* spp., *Tribolium* spp. y *Trogoderma* spp, en particular cuando la plaga es *Diabrotica virgifera* (escarabajo del maíz occidental, WCR en inglés), *Diabrotica barberi* (escarabajo del maíz nortea, NCR en inglés), *Diabrotica virgifera zea* (escarabajo del maíz mejicano, MCR en inglés), *Diabrotica balteata* (escarabajo del maíz brasileño (BZR en inglés), *Diabrotica undecimpunctata howardii* (escarabajo del maíz sureño, SCR en inglés) y un complejo de escarabajo del maíz brasileño (BCR, en inglés) que consiste *Diabrotica viridula* y *Diabrotica speciosa*.

[0139] Los insectos hemípteros incluyen, aunque no se limitan a, *Chinavia hilaris*, *Chinavia marginata*, *Chinavia pensylvanica*, *Chlorochroa granulose*, *Chlorochroa kanei*, *Chlorochroa ligata*, *Chlorochroa lineate*, *Chlorochroa opuntiae*, *Chlorochroa persimilis*, *Chlorochroa rossiana*, *Chlorochroa sayi*,
30 *Chlorochroa uhleri*, *Chlorochroa belfragii*, *Chlorochroa faceta*, *Chlorochroa osborni*, *Chlorochroa*

saucia, *Chlorochroa senilis*, *Nezara viridula*, *Edessa meditabunda*, *Edessa bifida*, *Edessa florida*, *Euschistus heros*, *Euschistus acuminatus*, *Euschistus biformis*, *Euschistus conspersus*, *Euschistus crenator*, *Euschistus egglestoni*, *Euschistus ictericus*, *Euschistus inflatus*, *Euschistus latimarginatus*, *Euschistus obscures*, *Euschistus politus*, *Euschistus quadrator*, *Euschistus sevus*, *Euschistus strenuous*,
5 *Euschistus tristigma*, *Euschistus variolarius* *Halyomorpha halys*, *Thyanta accerra*, *Thyanta calceata*, *Thyanta custator*, *Thyanta pallidovirens*, *Thyanta perditor*, *Thyanta maculate*, *Thyanta pseudocasta* *Dichelops melacanthus*, *Dichelops avilapiresi*, *Dichelops bicolor*, *Dichelops dimidatus*, *Dichelops furcatus*, *Dichelops furcifrons*, *Dichelops lobatus*, *Dichelops miriamae*, *Dichelops nigrum*, *Dichelops peruanus*, *Dichelops phoenix*, *Dichelops saltensis*, *Piezodorus guildinni*, *Piezodorus lituratus*
10 *Megacopta cribraria*, *Lygus hesperus*, *Lygus lineolaris* y *Pseudatomoscelis seriatus*.

[0140] Los insectos tisanópteros incluyen, aunque no se limitan a, tisanópteros del tabaco (*Frankliniella fusca*), tisanópteros de flor (*Frankliniella tritici*), tisanópteros de flor occidental (*Frankliniella occidentalis*) y tisanópteros de la soja (*Sericothrips variabilis*).

[0141] La referencia en esta aplicación a una “molécula de ADN aislada” o a un término o expresión
15 equivalente, tiene por objetivo significar que la molécula de ADN es la que está presente o se combina con otras composiciones, aunque no dentro de su ambiente natural. Por ejemplo, elementos del ácido nucleico tales como una secuencia de codificación, secuencia de intrón, secuencia líder no traducida, secuencia promotora, secuencia de terminación transcripcional y otras similares, que se encuentran naturalmente dentro del ADN del genoma de una organismo, no se consideran “aisladas” en la medida
20 en que el elemento se encuentra dentro del genoma del organismo y en la ubicación dentro del genoma en el cual se encuentra naturalmente. Sin embargo, cada uno de estos elementos y las subpartes de estos elementos, estarían “aisladas” dentro del alcance de esta divulgación en la medida en que el elemento no se encuentre dentro del genoma del organismo y en la ubicación dentro del genoma en el cual se encuentra naturalmente. De manera similar, una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína
25 insecticida o cualquier variante insecticida que ocurra naturalmente de esa proteína sería una secuencia de nucleótidos aislada, en la medida en que la secuencia de nucleótidos no se encontraba dentro del ADN de la bacteria en donde se encuentra naturalmente la secuencia que codifica la proteína. Una secuencia de nucleótidos sintética que codifica la secuencia de aminoácidos de la proteína insecticida que ocurre naturalmente se consideraría aislada a los fines de esta divulgación. A los fines de esta
30 divulgación, cualquier secuencia de nucleótidos transgénica, por ejemplo, la secuencia de nucleótidos del ADN inserto en el genoma de las células de una planta o bacteria, o presente en un vector

extracromosomático, se consideraría una secuencia de nucleótidos aislada ya sea que esté presente dentro del plásmido o estructura similar utilizada para transformar las células, dentro del genoma de la planta o bacteria, o presente en monto detectables en tejidos, progenie, muestras biológicas o productos de materia primas derivados de la planta o bacteria.

- 5 [0142] Como se describe en la Tabla 1, los marcos de lectura abiertos (ORF) que codifican las proteínas de toxina relacionadas con la TIC6280 y TIC7016 se descubrieron en ADN obtenido de varias cepas diferentes de *Lysinibacillus sphaericus* o metagenomas raspados de placa (MTG).

10 **Tabla 1. Marcos de lectura abiertos que codifican la TIC6280 y las proteínas de toxina relacionadas con la TIC7016 obtenidas de cepas de *Lysinibacillus sphaericus*.**

Proteína codificada por la secuencia de ácido nucleico	SEQ ID NO de la secuencia de ácido nucleico	SEQ ID NO de la secuencia de aminoácidos	Cepa de <i>Lysinibacillus sphaericus</i>
TIC6280	(SEQ ID NO:22)	(SEQ ID NO:23)	AG0067H07
TIC6281	(SEQ ID NO:24)	(SEQ ID NO:25)	AG0067H03
TIC6282	(SEQ ID NO:26)	(SEQ ID NO:27)	AG0069H08
TIC6283	(SEQ ID NO:28)	(SEQ ID NO:29)	AG0025E04
TIC8808	(SEQ ID NO:90)	(SEQ ID NO:91)	MTG000070
TIC9480	(SEQ ID NO:92)	(SEQ ID NO:93)	MTG000415
TIC9257	(SEQ ID NO:94)	(SEQ ID NO:95)	MTG000199
TIC7016	(SEQ ID NO:30)	(SEQ ID NO:31)	EGBS0420
TIC7017	(SEQ ID NO:32)	(SEQ ID NO:33)	EGBS1094
TIC7107	(SEQ ID NO:34)	(SEQ ID NO:39)	AG0025E04
TIC7108	(SEQ ID NO:35)	(SEQ ID NO:36)	AG0067H01
TIC7109	(SEQ ID NO:37)	(SEQ ID NO:39)	AG0067H03
TIC7110	(SEQ ID NO:38)	(SEQ ID NO:39)	AG0067H07
TIC7111	(SEQ ID NO:40)	(SEQ ID NO:39)	AG0069H08
TIC7589	(SEQ ID NO:41)	(SEQ ID NO:42)	AG0122F12

Proteína codificada por la secuencia de ácido nucleico	SEQ ID NO de la secuencia de ácido nucleico	SEQ ID NO de la secuencia de aminoácidos	Cepa de <i>Lysinibacillus sphaericus</i>
TIC9528	(SEQ ID NO:96)	(SEQ ID NO:97)	MTG000120
TIC529	(SEQ ID NO:98)	(SEQ ID NO:99)	MTG000184

[0143] Las secuencias de codificación respectivas fueron clonadas y expresadas en células huésped microbianas para producir la proteína utilizada en estandarización biológica. Como se detalla en el gráfico, las secuencias de ácido nucleico que codifican TIC7107, TIC7109, TIC7110 y TIC7111 codifican la misma secuencia de aminoácidos, referida en este documento como TIC7110, y difieren unas de otras por 1 a 6 nucleótidos.

[0144] Para expresión en las células de la plantas, puede decirse que las proteínas de toxina relacionadas con la TIC6280 y las proteínas de toxina relacionadas con la TIC7016 residen en el citosol o tienen como destino los diferentes orgánulos de la célula de la planta. Por ejemplo, transportar una proteína al cloroplasto puede derivar en el incremento de los niveles de la proteína expresada en una planta transgénica al tiempo que previene la ocurrencia de fenotipos erróneos. El transporte también puede traducirse en un incremento de la eficacia de resistencia de la plaga en el evento transgénico. Un péptido de transporte o péptido de tránsito es una cadena péptida corta (de 3 a 70 aminoácidos de largo) que direcciona el transporte de una proteína a una región específica de la célula, que incluye el núcleo, mitocondria, retículo endoplasmático (RE), cloroplasto, apoplasto, peroxisoma y membrana plasmática. Algunos péptidos de transporte se segmentan desde la proteína por peptidasas de señal después de que se transportan las proteínas. Para el transporte al cloroplasto, las proteínas contienen péptidos de tránsito que son aproximadamente de 40 a 50 aminoácidos. Para descripciones del uso de péptidos de tránsito del cloroplasto, ver números de patente 5.188.642 y 5.728.925. Muchas proteínas ubicadas en el cloroplasto se expresan a partir de genes nucleares como precursores y se transportan al cloroplasto por un péptido de tránsito de cloroplasto (CTP). Ejemplos de tales proteínas de cloroplasto aisladas incluyen, aunque no se limitan a, aquellas asociadas con la subunidad pequeña (SSU) de ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa, ferredoxina, ferredoxina oxidoreductasa, la proteína I y II del complejo captador de luz, tiorredoxina F, enolpiruvilsiquimato fosfato sintasa (epsps) y los péptidos de tránsito descritos en la patente de EE.UU. número 7.193.133. Se ha demostrado *in vivo* e *in vitro* que las proteínas que no son del cloroplasto pueden transportarse al cloroplasto mediante el uso de fusiones de proteína con CTP

heterólogo y que el CTP es suficiente para transportar una proteína al cloroplasto. La incorporación de un péptido de tránsito del cloroplasto adecuado tal como el CTP (CTP2) de EPSPS de *Arabidopsis thaliana* (Ver Klee *et al.*, *Mol. Gen. Genet.* 210:437-442, 1987) o el CTP (CTP4) de EPSPS de *Petunia hybrida* (Ver della-Cioppa *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:6873-6877, 1986) ha demostrado

5 transportar secuencias de proteína de EPSPS heteróloga a cloroplastos en plantas transgénicas (Ver números de patente de EE. UU. 5.627.061, 5.633.435 y 5.312.910, y EP 0218571, EP 189707, EP 508909 y EP 924299). Para transportar la proteína TIC6280 o la proteína de toxina relacionada con la TIC6280, o la proteína TIC7016 o la proteína de toxina relacionada con la TIC7016, una secuencia que

10 codifica un péptido de tránsito de cloroplasto se ubica 5' en el enlace operable y enmarcado en una secuencia de codificación sintética que codifica la proteína TIC6280 o la proteína de toxina relacionada con la TIC6280, o la proteína TIC7016 o la proteína de toxina relacionada con la TIC7016 que se ha designado para la expresión óptima en células de planta.

[0145] Se contempla que las secuencias de proteína de toxina adicionales relacionadas con las proteínas de toxina de TIC6280 y las proteínas de toxina de TIC7016 pueden crearse usando las secuencias de

15 aminoácidos que ocurren naturalmente de las proteínas de toxina TIC6280 y las proteínas de toxina TIC7016 para crear proteínas novedosas y con propiedades novedosas. Las proteínas de toxina de TIC6280 y TIC7016 pueden alinearse con otras proteínas similares a TIC6280 o TIC7016 para combinar diferencias en el nivel de secuencia de aminoácidos en variantes de secuencia de aminoácidos novedosa y hacer cambios apropiados a la secuencia de ácido nucleico recombinante que codifica las variantes.

20 [0146] La divulgación incluso contempla que las variantes mejoradas de las clases de toxina de proteína TIC6280 y TIC7016 pueden diseñarse *in planta* usando varios métodos de edición genética conocidos en la técnica. Tales tecnologías usadas para el genoma incluyen, aunque no se limitan a, ZFN (nucleasas con dedos de zinc), meganucleasas, TALEN (nucleasas efectoras similares al activador de la transcripción) y CRISPR (repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente

25 interespaciadas)/Sistemas Cas (asociados con CRISPR). Estos métodos de edición del genoma pueden usarse para alterar la secuencia de codificación de la proteína de toxina transformada dentro de una célula de planta en una secuencia de codificación de toxina diferente. Específicamente, por medio de estos métodos, uno o más codones dentro de la secuencia de codificación de la toxina se alteran para diseñar una nueva secuencia de aminoácidos de proteína. Alternativamente, un fragmento dentro de la

30 secuencia de codificación se reemplaza o elimina, o se insertan fragmentos de ADN adicionales en la secuencia de codificación, para diseñar una nueva secuencia de codificación de toxina. La nueva

secuencia de codificación puede codificar una proteína de toxina con propiedades nuevas tales como actividad aumentada o espectro contra plagas de insectos, así como también proporcionar actividad contra un especie de plaga de insectos en la cual la resistencia se ha desarrollado contra la proteína de toxina contra insectos originaria. La célula de la planta que comprende la secuencia de codificación de toxina editada del gen puede usarse por medio de métodos conocidos en la técnica para generar plantas enteras que expresen la nueva proteína de toxina.

[0147] También se contempla que los fragmentos de las clases de proteína de toxina TIC6280 y TIC7016, o las variantes de proteínas de las mismas pueden ser formas truncas en las cuales uno o más aminoácidos se eliminan del extremo N-terminal, extremo de C-terminal, la mitad de la proteína o combinaciones de la misma con actividad inhibitoria contra insectos. Estos fragmentos pueden ocurrir naturalmente o ser variantes sintéticas de las proteínas de toxina TIC6280 o proteínas de toxina TIC7016, o variantes de proteína derivada, pero deben retener la actividad inhibitoria contra insectos de la TIC6280 o TIC7016. Las variantes de eliminación de extremo N-terminal o C-terminal incluyen, aunque no se limitan a, las proteínas TIC6280, proteínas TIC7016 o variantes de proteína de la misma que carecen de residuos de aminoácidos ya sea del N-término y/o C-término. Un fragmento o variante descrita en este documento puede incluso comprender un dominio identificado en este documento y que es responsable por la actividad plaguicida de una proteína.

[0148] Las proteínas que se parecen a las clases de toxina de proteína TIC6280 y TIC7016 pueden identificarse por comparación de unas con otras usando varios algoritmos basados en computación conocidos en la técnica. Por ejemplo, las identidad de secuencia de aminoácidos de las proteínas relacionadas con las clases de toxina de proteína de la TIC6280 y TIC7016 pueden analizarse usando una alineamiento Clustal W usando estos parámetros predeterminados: Matriz de peso: BLOSUM; penalidad de apertura de pasaje: 10,0. Penalidad de extensión de pasaje: 0,05. Pasajes hidrofílicos: Activados. Residuos hidrofílicos: GPSNDQERK. Penalidades de pasaje específicos de residuos: En (Thompson, *et al* (1994) Nucleic Acids Research, 22:4673-4680). La identidad del aminoácido de porcentaje se calcula además por el producto del 100 % multiplicado por (identidades del aminoácido/largo de la proteína del sujeto). Otros algoritmos de alineamiento también están disponibles en la técnica y proporcionan resultados similares a los obtenidos usando un alineamiento de Clustal W.

[0149] Se espera que una proteína que exhiba actividad inhibitoria de insectos contra una especie de insectos lepidópteros, coleópteros, hemípteros o tisanópteros está relacionada con la clase de toxina de proteína TIC6280 o TIC7016 si la proteína se utiliza en una consulta, por ejemplo, en una alineación de

Clustal W, y en al menos una de las proteínas de la presente invención descripta como TIC6280 o TIC7016 se identifican como aciertos en tal alineación, en la cual la proteína de consulta exhibe identidad de aminoácido de al menos de 62 % hasta aproximadamente 100 % junto con el largo de la proteína de consulta, que es de aproximadamente 62 %, 63 %, 64 %, 65 %, 66 %, 67 %, 68 %, 69 %, 70 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 85 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 100 % o cualquier porcentaje de fracción en este rango.

[0150] Proteínas ejemplares de la clase de proteína de toxina TIC6280 – TIC6280 (SEQ ID NO:23), TIC6281 (SEQ ID NO:25), TIC6282 (SEQ ID NO:27), TIC6283 (SEQ ID NO:29), TIC8808 (SEQ ID NO:91), TIC9480 (SEQ ID NO:93) y TIC9257 (SEQ ID NO:95) – se alienaron unas con otras usando un algoritmo de Clustal W. Se creó una matriz de pares de las identidades de la secuencia de aminoácidos porcentuales, tal como se informa en la Tabla 2.

Tabla 2. Visualización de la matriz de pares del ejemplo de proteínas de toxinas relacionadas con TIC6280.

Toxina	TIC6280	TIC6281	TIC6282	TIC6283	TIC8808	TIC9480	TIC9527
TIC6280	-	99,3 % (286)	99,3 % (286)	99,3 % (286)	92,7 % (267)	87,5 % (252)	87,5 % (252)
TIC6281	99,3 % (286)	-	98,6 % (284)	97,9 % (282)	92 (265)	86,8 % (250)	86,8 % (250)
TIC6282	99,3 % (286)	98,6 % (284)	-	99,3 % (286)	92,7 % (267)	87,5 % (252)	87,5 % (252)
TIC6283	98,6 % (284)	97,9 % (282)	99,3 % (286)	-	92,4 % (266)	87,2 % (251)	87,2 % (251)
TIC8808	92,7 % (267)	92 (265)	92,7 % (267)	92,4 % (266)	-	93,8 % (270)	93,8 % (270)
TIC9480	83,2 % (252)	82,5 % (250)	83,2 % (252)	82,8 % (251)	89,1 % (270)	-	99,7 % (302)

TIC9257	83,2 % (252)	82,5 % (250)	83,2 % (252)	82,8 % (251)	89,1 % (270)	99,7 % (302)	-
----------------	-----------------	-----------------	-----------------	-----------------	-----------------	-----------------	---

Descripción de la tabla: El alineamiento de Clustal W entre (X) e (Y) se informa en una matriz de pares. El porcentaje de identidad de aminoácidos entre todos los pares se calcula y se representa con el primer número de cada casillero. El segundo número (entre paréntesis) de cada casillero representa la cantidad de aminoácidos idénticos entre el par.

[0151] Proteínas ejemplares de la clase de proteína de toxina TIC7016 – TIC7016 (SEQ ID NO:31), TIC7017 (SEQ ID NO:33), TIC7108 (SEQ ID NO:36), TIC7110 (SEQ ID NO:39), TIC7589 (SEQ ID NO:42), TIC9258 (SEQ ID NO:97) y TIC9259 (SEQ ID NO:99) – se alienaron unas con otras usando un algoritmo de Clustal W. Se creó una matriz de pares de las identidades de la secuencia de aminoácidos porcentuales, tal como se informa en la Tabla 3. La cantidad de aminoácidos idénticos entre dos secuencias se indica entre paréntesis.

Tabla 3. Visualización de la matriz de pares del ejemplo de proteínas de toxinas relacionadas con TIC7016.

Toxina	TIC7016	TIC9259	TIC9258	TIC7017	TIC7108	TIC7110	TIC7589
TIC7016	-	99,6 % (273)	99,3 % (272)	98,9 % (271)	96,4 % (264)	96,7 % (265)	62,8 % (172)
TIC9259	99,6 % (273)	-	98,9 % (271)	98,5 % (270)	96 (263)	96,4 % (264)	62,4 % (171)
TIC9258	99,3 % (272)	98,9 % (271)	-	98,2 % (269)	95,6 % (262)	96 (263)	63,5 % (174)
TIC7017	98,9 % (271)	98,5 % (270)	98,2 % (269)	-	95,6 % (262)	96 (263)	63,1 % (173)
TIC7108	96,4 %	96	95,6 %	95,6 %	-	99,6 %	62

	(264)	(263)	(262)	(262)		(273)	(170)
TIC7110	96,7 % (265)	96,4 % (264)	96 (263)	96 (263)	99,6 % (273)	-	62,4 % (171)
TIC7589	62,5 % (172)	62,2 % (171)	63,3 % (174)	62,9 % (173)	61,8 % (170)	62,2 % (171)	-

Descripción de la tabla: El alineamiento de Clustal W entre (X) e (Y) se informa en una matriz de pares. El porcentaje de identidad de aminoácidos entre todos los pares se calcula y se representa con el primer número de cada casillero. El segundo número (entre paréntesis) de cada casillero representa la cantidad de aminoácidos idénticos entre el par.

[0152] Las secuencias de codificación *Lysinibacillus sphaericus* que codifican a TIC7107 (SEQ ID NO:34), TIC7109 (SEQ ID NO:37), y TIC7111 (SEQ ID NO:40) codifican una secuencia de aminoácidos que es 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de TIC7110 (SEQ ID NO: 39). Cada una de las secuencias de codificación difiere de 1 a 6 nucleótidos, según las dos secuencias que se comparan. Las secuencias de codificación TIC7107 (SEQ ID NO:34), TIC7109 (SEQ ID NO:37), TIC7110 (SEQ ID NO:38) y TIC7111 (SEQ ID NO:40) se alinearon entre sí mediante un algoritmo Clustal W. Se creó una matriz de pares de las identidades de la secuencia de ácido nucleico porcentual, tal como se informa en la Tabla 4. La cantidad de ácido nucleico idéntico entre dos secuencias se indica entre paréntesis.

Tabla 4. Visualización de la matriz de pares de las secuencias de codificación de *Lysinibacillus sphaericus* TIC7107, TIC7109, TIC7110 y TIC7111.

Toxina	TIC7107	TIC7111	TIC7109	TIC7110
TIC7107	-	99,6 % (822)	99,4 % (820)	99,3 % (819)
TIC7111	99,6 % (822)	-	99,8 % (823)	99,6 % (822)

Toxina	TIC7107	TIC7111	TIC7109	TIC7110
TIC7109	99,4 % (820)	99,8 % (823)	-	99,9 % (824)
TIC7110	99,3 % (819)	99,6 % (822)	99,9 % (824)	-

Descripción de la tabla: El alineamiento de Clustal W entre (X) e (Y) se informa en una matriz de pares. El porcentaje de identidad de aminoácidos entre todos los pares se calcula y se representa con el primer número de cada casillero. El segundo número (entre paréntesis) de cada casillero representa la cantidad de aminoácidos idénticos entre el par.

[0153] Además de la identidad porcentual, las proteínas de la clase de toxinas de proteínas TIC6280 también pueden estar relacionadas con la estructura primaria (motivos de aminoácidos conservados), con la longitud (aproximadamente 288 aminoácidos) y otras características. Las características de la clase de proteínas de toxinas TIC6280 se informan en la Tabla 5.

Tabla 5. Características de la clase de proteínas de toxinas TIC6280.

Proteína	Peso molecular (en Daltons)	Longitud del aminoácido	Punto isoeléctrico	Carga a PH 7.0	Cantidad de aminoácidos fuertemente básicos (-)	Cantidad de aminoácidos fuertemente ácidos	Cantidad de aminoácidos hidrofóbicos	Cantidad de aminoácidos polares
TIC6280	32370,1 5 %	288	4,7933 %	-7,0 %	31	36	128	160
TIC6281	32342,1 3 %	288	4,8894 %	-6,0 %	31	35	128	160

TIC6 282	32370,1 5 %	288	4,7987 %	-7,0 %	31	36	128	160
TIC6 283	32384,1 3 %	288	4,7073 %	-8,0 %	30	36	128	160
TIC8 808	32463,2 7 %	288	5,1723 %	-5,5 %	34	36	126	162
TIC9 480	34397,0 8	303	6,6320	0,5 %	39	35	140	163
TIC9 527	34411,1 1 %	303	6,6323 %	0,5 %	39	35	140	163

[0154] Las proteínas de la clase de toxinas de proteínas TIC7016 también pueden estar relacionadas con la estructura primaria (motivos de aminoácidos conservados), con la longitud (aproximadamente 274 aminoácidos) y otras características. Las características de la clase de proteínas de toxinas TIC7016 se informan en la Tabla 6.

Tabla 6. Características de la clase de proteínas de toxinas TIC7016.

Pro teín a	Peso molecu lar (en Dalton es)	Longitu d del aminoá cido	Punto isoelect rico	Carga a PH 7.0	Cantida d de aminoác idos fuertem ente básicos (-)	Cantida d de aminoác idos fuertem ente ácidos	Cantida d de aminoác idos hidrofób icos	Canti dad de amino ácidos polare s
TIC 701 6	30426,3 0 %	274	5,3772 %	-3,5 %	31	32	128	146
TIC	30383,2	274	5,3772	-3,5 %	31	32	129	145

701 7	8 %		%					
TIC 710 8	30531,4 9 %	274	5,3772 %	-3,5 %	31	32	130	144
TIC 711 0	30519,4 3 %	274	5,3772 %	-3,5 %	31	32	129	145
TIC 758 9	30798,6 5 %	275	5,9612 %	-2,0 %	34	33	124	151
TIC 925 8	30428,2 8 %	274	5,3772 %	-3,5 %	31	32	127	147
TIC 925 9	30357,1 9 %	274	5,1504 %	-4,5 %	30	32	128	146

[0155] Tal como se describe en los ejemplos de esta solicitud, las secuencias de la molécula de ácido nucleico sintético que codifican a TIC6280, TIC6282, TIC6283, TIC7016PL, TIC7017PL, TIC7108PL y TIC7110PL fueron diseñadas para uso en plantas. Las secuencias de moléculas de ácido nucleico recombinante ejemplar diseñadas para uso en plantas que codifican a las proteínas TIC6280, TIC6282, TIC6283, TIC7016PL, TIC7017PL, TIC7108PL y TIC7110PL se establece como ID de secuencia n.º:43, 44, 45, 46, 48, 50, y 52, respectivamente. Las proteínas TIC7016PL, TIC7017PL, TIC7018PL, TIC7110PL tienen un aminoácido de alanina adicional inmediatamente después de iniciar la metionina. Se cree que las inserciones adicionales del residuo de alanina mejoran la expresión de las proteínas en plantas. Otros miembros de la clase de toxina de proteínas TIC6280 y TIC7016 también se puede diseñar para uso en plantas.

[0156] Además, tal como se describe en los ejemplos de esta solicitud, TIC6280, TIC6282, TIC6283, TIC7016, TIC7017, TIC7108, y TIC7110 exhiben actividad insecticida respecto de las especies de

insectos Coleoptera y Lepidoptera, incluso adultos, pupas, larvas y recién nacidos, además de especies Hemiptera, incluso ninfas y adultos.

- [0157] Los vectores y los casetes de expresión que contienen estas secuencias de moléculas de ácido nucleico recombinante se pueden crear e introducir al maíz, la soja, el algodón u otras células de las plantas de acuerdo con los métodos de transformación y las técnicas conocidas en la técnica. Las células transformadas se pueden regenerar en plantas transformadas que se observan como proteínas inhibitorias de insectos TIC6280, TIC6282, TIC6283, TIC7016PL, TIC7017PL, TIC7108PL, o TIC7110PL. Para probar la actividad pesticida, se realizan bioensayos en presencia de larvas de plagas Lepidoptera mediante discos de hojas de plantas obtenidos de las plantas transformadas tal como se describe en el ejemplo a continuación. Para probar la actividad pesticida contra las plagas de Coleoptera, se utilizan plantas transformadas de generación R_0 y F_1 en un ensayo con gusanos de raíz tal como se describe en el ejemplo a continuación. Para probar la actividad pesticida contra las plagas Hemiptera, se utilizan vainas, chala de maíz u hojas de plantas transformadas en el ensayo, ya sea a partir del tejido extraído de la planta o el tejido que queda en la planta tal como se describe en los ejemplos a continuación.
- [0158] Como alternativa a los métodos de transformación tradicionales, un transgén, casete de expresión etc. se puede insertar o integrar a un sitio o locus específico dentro del genoma de las plantas o célula de la planta mediante la integración dirigida al sitio. Por lo tanto, la(s) creación(es) del ADN recombinante y la(s) molécula(s) de esta declaración pueden incluir una secuencia de patrones de donantes que comprenden al menos un transgén, casete de expresión o cualquier otra secuencia de ADN para insertarla al genoma de las plantas o la célula de la planta. Dicho patrón de donantes para la integración dirigida en el sitio podrá incluir uno o dos brazos de homología orientados hacia una secuencia de inserción (es decir, la secuencia, el transgén, el casete, etc. para insertar al genoma de las plantas). La(s) creación(es) del ADN recombinante de esta afirmación puede(n) comprometer un(os) casete(s) de expresión que codifican una nucleasa específica del sitio y/o proteína(s) asociada(s) para llevar a cabo la integración dirigida al sitio. Estos casetes de expresión de nucleasa pueden estar presentes en la misma molécula o vector que el patrón de donantes (en cis) o en una molécula o vector separado (en trans). Se conocen diversos métodos orientados a la integración dirigida en el sitio en el trabajo relacionado con diferentes proteínas (o complejos de proteínas y/o ARN guía) que cortan el ADN genómico para producir una rotura de doble cadena (DSB) o corte en el sitio o locus genómico deseado. En resumen, se entiende que durante el proceso de reparación de la DSB o corte introducido por la enzima nucleasa, el ADN del patrón del donante podría integrarse al genoma en el sitio del DSB o corte. La presencia de

brazo(s) de homología en el patrón de donante podría promover la adopción y orientación de la secuencia de inserción en el genoma de las plantas durante el proceso de reparación mediante recombinación homóloga, aunque se podría producir un evento de inserción mediante la unión de extremos no homólogos (NHEJ). Entre los ejemplos de nucleasas específicas del sitio que se pueden utilizar podemos citar nucleasas con dedos de zinc, meganucleasas de ingeniería o nativas, endonucleasas TALE y endonucleasas guiadas por ARN (*por ejemplo*, Cas9 o Cpf1). En el caso de los métodos que utilizan nucleasas específicas del sitio guiadas por ARN (*por ejemplo*, Cas9 o Cpf1), la creación del ADN recombinante también incluirá una secuencia que codificará a uno o más ARN guía para dirigir la nucleasa al sitio deseado dentro del genoma de las plantas.

[0159] Tal como se usa en el presente, una “molécula de ADN recombinante” es una molécula de ADN que comprende una combinación de moléculas de ADN que naturalmente no se presentarían juntas sin intervención de seres humanos. Por ejemplo, una molécula de ADN recombinante puede ser una molécula de ADN compuesta por al menos dos moléculas de ADN heterólogas respecto a las demás, una molécula de ADN que comprende una secuencia de ADN se aparta de las secuencias de ADN existentes en la naturaleza o una molécula de ADN que se ha incorporado al ADN de la célula huésped mediante transformación genética o edición de genes. Del mismo modo, una “molécula de proteína recombinante” es una molécula de proteína que incluye una combinación de aminoácidos que no se encontrarían juntos sin intervención humana. Por ejemplo, una molécula de proteína recombinante podría ser una molécula de proteína compuesta de al menos dos moléculas de aminoácidos heterólogas respecto de las otras, una molécula de proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que se aparta de las secuencias de aminoácidos que existen en la naturaleza o una molécula de proteína que se expresa en una célula huésped como resultado de la transformación genética de la célula huésped o mediante la edición del gen del genoma de la célula huésped.

[0160] Se contemplan las composiciones de moléculas de ácido nucleico recombinante que codifican las proteínas de las clases de proteínas de toxinas TIC6280 y TIC7016. Por ejemplo, las proteínas de las clases de proteínas de toxinas TIC6280 y TIC7016 se pueden expresar con creaciones de ADN recombinante en las cuales una molécula de polinucleótido con un ORF que codifica la proteína está operativamente enlazada a los elementos de la expresión genética tales como promotor y cualquier otro elemento regulador necesario para la expresión en el sistema para el cual está prevista la creación. Los ejemplos no limitantes comprenden el promotor funcional de plantas operativamente enlazadas a las secuencias codificadas de proteínas de las clases de proteínas de toxinas TIC6280 y TIC7016 para la

expresión de la proteína en plantas o un promotor funcional *Bt* operativamente enlazado a secuencias de codificación para las proteínas de las clases de proteínas TIC6280 y TIC7016 para la expresión de la proteína en *Bt bacterium* o cualquier otra especie de *Bacillus*. Otros elementos pueden estar operativamente enlazados a las secuencias de codificación de proteínas de las clases de proteínas de toxinas TIC6280 y TIC7016 incluso, por ejemplo, intensificadores, intrones, líderes no traducidos, etiquetas de inmovilización de proteínas codificadas (etiqueta HIS), péptidos de translocación (es decir, péptidos de tránsito del plástido, péptidos de señales), secuencia de polipéptidos para enzimas modificadoras postraduccionales, sitios de unión ribosómica y sitios objetivo RNAi. Las moléculas de polinucleótidos recombinantes ejemplares proporcionadas en el presente incluyen, por ejemplo, un promotor heterólogo operativamente enlazado a un polinucleótido tales como SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 14, 16, 17, 19, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 35, 37, 38, 40, 41, 43, 44, 45, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, y 98 que codifica los polipéptidos o proteínas como secuencia de aminoácidos tal como se indica en los SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 18, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 36, 39, 42, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97 y 99. Un promotor heterólogo también puede estar operativamente enlazado con las secuencias de codificación de ADN sintético que se codifican a una proteína orientada o no orientada de las clases de proteínas de toxinas TIC6280 o TIC7016. Los codones de una molécula de ácido nucleico recombinante para la proteína expuesta en el presente se pueden sustituir por codones sinónimos (conocidos en la técnica como sustitución silenciosa). Las mutaciones silenciosas que ocurren de manera natural se demuestran en las secuencias de codificación que codifican TIC7107 (SEQ ID NO:34), TIC7109 (SEQ ID NO:37), TIC7110 (SEQ ID NO:38) y TIC7111 (SEQ ID NO:40), mientras que cada secuencia de codificación codifica la misma secuencia de aminoácidos de proteínas, TIC7110 (SEQ ID NO:39).

[0161] Una creación de ADN recombinante que consta de una secuencia de codificación de una proteína de las clases de proteínas de toxinas TIC6280 o TIC7016 pueden además comprender una región de ADN que se codifica para uno o más agentes inhibitorios de insectos que se pueden configurar para expresar de manera concomitante o conjunta con una secuencia de ADN que codifica una proteína de las clases de proteínas de toxinas TIC6280 o TIC7016, una proteína diferente de una proteína de las clases de proteínas de toxinas TIC6280 o TIC7016, una molécula siRNA inhibitoria de insectos o una proteína secundaria. Las proteínas secundarias incluyen, por ejemplo, cofactores, enzimas, ligandos u otros agentes que funcionan para permitir la eficacia de un agente inhibitorio de insectos, por ejemplo, al

ayudar en la expresión, ejercer influencia sobre la estabilidad en plantas, optimizar la energía libre para oligomerización, aumentar la toxicidad y aumentar el espectro de la actividad. La proteína secundaria puede facilitar la captación de uno o más agentes inhibitorios de insectos, por ejemplo, o potenciar los efectos tóxicos del agente tóxico.

5 [0162] Se puede armar la creación de ADN recombinante para permitir la expresión de todas las proteínas o moléculas de siRNA desde un promotor o cada proteína o moléculas de siRNA bajo control de un promotor separado o una combinación de estos. Las proteínas de esta invención se pueden expresar a partir de un sistema de expresión de gen múltiple en el cual una o más proteínas de las clases de proteínas de toxinas TIC6280 y TIC7016 se expresan a partir de un segmento nucleótido común que
10 además contiene otros marcos y promotores de lectura abierta, según el tipo de sistema de expresión seleccionado. Por ejemplo, un sistema de expresión de gen múltiple puede utilizar un único promotor para impulsar la expresión de marcos de lectura abierta en serie o vinculados de manera múltiple desde un único operón (es decir, expresión policistónica). En otro ejemplo, un sistema de expresión de gen múltiple puede utilizar casetes de expresión no enlazados de multiplicación donde cada uno expresa una
15 proteína o agente diferente como una o más moléculas de siRNA.

[0163] Las creaciones de moléculas de ácido nucleico recombinante o ADN recombinante que constan de una secuencia de codificación a partir de las clases de proteínas de toxinas TIC6280 o TIC7016 se pueden transportar a las células huésped por medio de vectores, por ejemplo, plásmido, baculovirus, cromosoma sintético, virión, cósmido, fagémido, fage o vector viral. Dichos vectores se pueden utilizar
20 para alcanzar una expresión estable o transitoria de una secuencia codificadora de proteína a partir de las clases de proteínas de toxinas TIC6280 y TIC7016 en una célula huésped o una expresión posterior del polipéptido codificado. Una creación de polinucleótido recombinante exógeno o ADN recombinante que incluye una secuencia codificadora de proteínas a partir de la clase de proteína de toxinas TIC6280 y TIC7016 que se introduce a una célula huésped se denomina en el presente “transgén”.

25 [0164] Este documento contiene las bacterias transgénicas, las células de las plantas transgénicas, las plantas transgénicas y las partes de plantas transgénicas que contienen un polinucleótido recombinante que permite la expresión de una o más proteínas a partir de las clases de proteínas de toxinas TIC6280 o TIC7016. El término “célula bacteriana” o “bacterium” puede incluir, por ejemplo, una célula *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Pseudomonas* o *Rhizobium*. El término “célula de la
30 planta” o “planta” puede incluir, por ejemplo, una célula dicotiledónea y una monocotiledónea. Las plantas y las células de las plantas contempladas incluyen, por ejemplo alfalfa, banana, cebada, judía,

brócoli, repollo, brassica, zanahoria, mandioca, ricino, coliflor, apio, garbanzo, repollo chino, citrus, coco, café, maíz, trébol, algodón, cucurbitácea, pepino, abeto de Douglas, berenjena, eucalipto, lino, ajo, uva, lúpulo, puerro, lechuga, pino de incienso, mijo, melón, nuez, avena, aceituna, cebolla, ornamental, palmera, pasto, guisante, maní, pimienta, arvejas, pino, papa, álamo, calabaza, pino Radiata, rábano, colza, arroz, rizoma, centeno, cártamo, arbusto, sorgo, pino sureño, soja, espinaca, calabacín, frutilla, remolacha, caña de azúcar, girasol, maíz dulce, dulce, batata, pasto varilla, té, tabaco, tomate, triticale, césped, sandía y planta o célula de la planta de trigo. En determinadas representaciones, se proporcionan las plantas transgénicas y las partes de plantas transgénicas regeneradas a partir de una célula de la planta transgénica. En determinadas representaciones, las plantas transgénicas se pueden obtener a partir de una semilla transgénica mediante corte, quiebre, arranque o cualquier otro tipo de separación de la parte de la planta. En determinadas representaciones, la planta puede ser una semilla, una baya, una flor, un tallo, una raíz o cualquier parte de esta o una parte no regenerativa de una parte de una planta transgénica. Tal como se utiliza en este contexto, una parte “no regenerativa” de una parte de una planta transgénica es una parte que no se puede inducir para formar una planta entera o que no se puede inducir para formar una planta entera capaz de reproducción sexual y/o asexual. En determinadas representaciones, una porción no regenerable de una parte de una planta es una porción de semilla, una baya, una flor, un tallo o una raíz.

[0165] Se proporcionan los métodos para fabricar plantas transgénicas que incluyen cantidades inhibitorias de insectos, Coleoptera-, Lepidoptera-, Hemiptera- o Tisanoptera de una proteína a partir de la clase de proteína de la toxina TIC6280 o TIC7016. Para crear dichas plantas, se introduce un polinucleótido recombinante que codifica cualquiera de las proteínas proporcionadas en esta aplicación a una célula de la planta y se selecciona una planta derivada de dicha célula de la planta que expresa una cantidad inhibitoria de proteínas de un insecto Coleoptera-, Lepidoptera-, Hemiptera-, o Tisanoptera. Las plantas pueden derivar de las células de las plantas por regeneración, semilla, polen o técnicas de transformación de meristemo. Los métodos de transformación de plantas son conocidos en la técnica.

[0166] En esta aplicación también se revelan los productos de plantas procesadas, donde el producto procesado incluye una cantidad detectable de una proteína de las clases de toxinas de proteínas TIC6280 o TIC7016, un segmento inhibitorio de insectos o una parte de estos o cualquier otra porción que se pueda distinguir. En determinadas representaciones, el producto procesado se selecciona de un grupo que comprende partes de plantas, biomasa de plantas, aceite, alimentos, azúcar, alimento de animales, harina, cereales, salvado, fibras de algodón, cáscaras, semillas procesadas y semillas. En determinadas

representaciones, el producto procesado no se puede regenerar. El producto de la planta puede contener materia prima u otros productos comerciales derivados de una planta transgénica o parte de planta transgénica, donde el producto básico u otros productos se pueden rastrear en el comercio mediante la detección de segmentos de nucleótidos o la expresión de ARN o proteínas que pueden codificar o comprender porciones diferentes de una proteína a partir de las clases de toxinas de proteínas TIC6280 o TIC7016.

[0167] Las plantas que expresan una proteína a partir de las clases de proteínas TIC6280 o TIC7016 se pueden cruzar mediante cultivo con eventos transgénicos que expresan otras proteínas y/o expresan otros atributos transgénicos tales como genes de tolerancia a herbicidas, genes que otorgan atributos de resistencia o tolerancia al estrés y similares o dichos atributos se pueden combinar en un único vector para enlazar todos los atributos.

[0168] Tal como se describe en detalle en los ejemplos, las secuencias que codifican una proteína a partir de las clases de toxinas de proteínas TIC6280 o TIC7016 y secuencias con una identidad porcentual sustancial con una proteína a partir de las clases de proteínas TIC6280 o TIC7016 se pueden identificar mediante métodos conocidos regularmente por todos en la técnica tales como reacción en cadena de la polimerasa (PCR), amplificación térmica e hibridación. Por ejemplo, una proteína de las clases de toxinas de las proteínas TIC6280 o TIC7016 se puede utilizar para producir anticuerpos que se ligan específicamente a proteínas relacionadas y se pueden utilizar para controlar y encontrar otros miembros de proteínas estrechamente relacionados.

[0169] Asimismo, las secuencias de nucleótidos que codifican una proteína a partir de las clases de toxinas de las proteínas TIC6280 o TIC7016 se pueden utilizar como sondas e imprimadores para análisis a fin de identificar a otros miembros de la clase mediante métodos de amplificación isotérmica o de ciclo térmico e hibridación. Por ejemplo, los oligonucleótidos derivados de las secuencias tal como se determina en los SEQ ID NO: 43, 44, 45, 46, 48, 50, o 52 se pueden utilizar para determinar la presencia o ausencia de un transgén TIC6280, TIC6282, TIC6283, TIC7016, TIC7017, TIC7108, o TIC7110 en una muestra de ácido desoxirribonucleico derivado del producto básico. Dada la sensibilidad de determinados métodos de detección de ácido nucleico que utilizan oligonucleótidos, se anticipa que los oligonucleótidos derivados de las secuencias tal como se establece en cualquiera de los SEQ ID NO:43, 44, 45, 46, 48, 50 y 52 se pueden utilizar para detectar un transgén TIC6280, TIC6282, TIC6283, TIC7016, TIC7017, TIC7108, o TIC7110 en los productos producto básico derivados de fuentes agrupadas donde solo una fracción del producto básico deriva de una planta transgénica que

contiene cualquier SEQ ID NO:43, 44, 45, 46, 48, 50 y 52. Además se reconoce que dichos oligonucleótidos se pueden utilizar para introducir la variación de la secuencia de nucleótidos: 43, 44, 45, 46, 48, 50 y 52. Dichos oligonucleótidos de “mutagénesis” son útiles para identificar las variantes de las secuencias de aminoácidos de una proteína a partir de las clases de toxinas de proteínas TIC6280 o TIC7016 que exhiben un rango de actividad inhibitoria de insectos o una expresión variada en células huésped de plantas transgénicas.

[0170] Los homólogos de secuencias de nucleótidos, por ejemplo, proteínas de insecticidas codificadas por secuencias de nucleótidos que se hibridan en cada una o cualquiera de las secuencias reveladas en esta aplicación bajo condiciones de hibridación, también constituyen una representación de esta invención. La invención además ofrece un método para detectar una primera secuencia de nucleótidos que se hibrida a una segunda secuencia de nucleótidos, donde la primera secuencia de nucleótidos (o su secuencia complementaria inversa) codifica una proteína pesticida o un fragmento pesticida y se hibrida en condiciones de hibridación exigentes para la segunda secuencia de nucleótidos. En ese caso, la segunda secuencia de nucleótidos puede ser la secuencia de nucleótidos seleccionada a partir del grupo que consta de: SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 14, 16, 17, 19, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 35, 37, 38, 40, 41, 43, 44, 45, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, y 98 en condiciones de hibridación exigentes. Las secuencias de codificación de nucleótidos se hibridan entre sí en condiciones de hibridación apropiadas y las proteínas codificadas por estas secuencias de nucleótidos presentan una reacción cruzada con el antisuero obtenido de cualquiera de las otras proteínas. Las condiciones de hibridación exigentes, tal como se describen en el presente, constan de hibridación a al menos 42 °C seguido por dos lavados de cinco minutos cada uno a temperatura ambiente con 2X SSC, 0,1 % SDS, seguido por dos lavados durante treinta minutos cada uno a 65 °C en 0,5X SSC, 0,1 % SDS. Los lavados a temperaturas aún más altas constituyen condiciones aún más exigentes, por ejemplo, condiciones de hibridación de 68°C, seguido por lavado a 68°C en 2xSSC con contenido de 0,1 % SDS.

[0171] Una persona con experiencia en la técnica reconocerá que, debido a la redundancia del código genético, muchas otras secuencias son capaces de codificar proteínas relacionadas con TIC6280 o TIC7016, y dichas secuencias, en la medida que funcionan para expresar las proteínas pesticidas en cepas de *Bacillus* o células de las plantas, son representaciones de la variación actual, obviamente reconociendo que muchas secuencias de codificación redundante no se hibridarán bajo estas condiciones de las secuencias nativas de *Bacillus* que codifican a TIC6280 o TIC7016. Esta aplicación contempla el

uso de este y otros métodos de identificación conocidos para aquellos con aptitudes ordinarias en la técnica y para identificar las secuencias codificadoras de proteínas TIC6280 y TIC7016 y secuencias con una identidad porcentual sustancial para las secuencias codificadoras de proteínas TIC6280 y TIC7016.

[0172] Este documento además contempla el uso de métodos moleculares conocidos en la técnica para diseñar y clonar proteínas comercialmente útiles que constan de quimeras de proteínas a partir de proteínas pesticidas; por ejemplo, las quimeras se podrán armar a partir de segmentos de una proteína de las clases de toxinas de proteínas TIC6280 o TIC7016 para derivar representaciones adicionales útiles, incluso el armado de segmentos de una proteína a partir de las clases de toxinas de proteínas TIC6280 o TIC7016 con segmentos de diversas proteínas diferentes de las proteínas a partir de las clases de toxinas de proteínas TIC6280 o TIC7016. Una proteína de las clases de toxinas de proteínas TIC6280 o TIC7016 puede estar sujeta a alineación con otras proteínas con pesticidas (independientemente de que estén relacionadas filogenéticamente de manera estrecha o distante), y se podrán identificar segmentos en cada proteína que resulten útiles para la sustitución entre las proteínas alineadas, lo cual derivará en la creación de proteínas quiméricas. Dichas proteínas quiméricas podrán estar sujetas a análisis de bioneso de pestes y caracterizados por la presencia o ausencia de mayor bioactividad y/o espectro de pestes objetivo ampliado en comparación con las proteínas principales desde donde se deriva cada segmento de la quimera. Se podrá diseñar la actividad pesticida de los polipéptidos para una peste en particular o un espectro de pestes más amplios; para ello, se intercambiarán dominios o segmentos con otras proteínas o mediante el uso de métodos de evolución dirigida conocidos en la técnica.

[0173] Este documento también contempla el uso de métodos moleculares conocidos en el arte del diseño y la clonación de proteínas comercialmente útiles que comprenden fusiones de proteínas a partir de proteínas de pesticidas; por ejemplo, las fusiones se podrán armar mediante combinación de una proteína de toxina relacionada con TIC7016 con una proteína de toxina relacionada con TIC6280. La proteína fusionada puede incrementar el espectro de actividad y/o brindar múltiples modos de acción contra las especies de insectos plaga. Las proteínas fusionadas podrían ser fusiones directas en las cuales la primera y segunda secuencias de codificación de proteínas de toxinas se encuentran operablemente enlazadas y dentro del marco como una secuencia contigua. La traducción de la secuencia que codifica dicha proteína fusionada produce una secuencia de aminoácidos de la proteína de toxina fusionada sin aminoácidos adicionales entre la primera y segunda proteína de toxina. Dicha secuencias de codificación de proteínas fusionadas de manera ejemplar son representadas por los SEQ ID NO 54, 60 y 66, y codifican las proteínas de toxinas de quimera presentadas como SEQ ID NO 55,

61 y 67 respectivamente. Las proteínas de fusión también pueden contener una secuencia de molécula de unión operablemente enlazada y enmarcada entre dos proteínas de toxinas. La molécula de unión se podrá dividir, por ejemplo, mediante enzimas endógenas presentes en el intestino del insecto para liberar las dos toxinas de insectos en la proteína de fusión entre sí al momento de ser ingeridas por las especies de pestes de insectos. Dicha molécula de unión se presenta como SEQ ID NO 72 y codifica la secuencia de aminoácidos presentada como SEQ ID NO 73. Los ejemplos de secuencias de codificación de proteínas de toxinas fusionadas se proporcionan como SEQ ID NO 56, 62 y 68 y codifican las proteínas presentadas como SEQ ID NO 57, 63 y 69. Una molécula de unión dentro de una proteína de fusión podría ser un fragmento de péptido flexible que permite la expresión y el pliegue adecuado de la primera y segunda proteína de toxina y brinda suficiente espacio para cada proteína de toxina para que la proteína de fusión se una a sus receptores respectivos. Dicha molécula de unión se presenta como número de SEQ ID 74 y codifica la secuencia de aminoácidos presentada como número de SEQ ID 75. Los ejemplos de secuencias de codificación de proteínas de toxinas fusionadas se proporcionan como SEQ ID NO 58, 64 y 70 y codifican las proteínas de toxinas de fusión presentadas como SEQ ID NO 59, 65 y 71.

[0174] El documento además contempla dos o más proteínas de toxinas codificadas mediante un operón artificial que permitiría la expresión conjunta de dos o más proteínas de toxinas en una célula huésped bacteriana. Una secuencia representativa que se puede utilizar para enlazar ambas secuencias de codificación de toxinas se presenta en el SEQ ID NO 79, donde los primeros 3 nucleótidos en el extremo 5' de la molécula de unión codifican un codón de parada para finalizar la transcripción de la primera proteína de toxinas en el operón. Los SEQ ID NO 76, 77 y 78 contienen los ejemplos de secuencias de operones que comprenden dos secuencias de codificación de proteínas de toxinas.

[0175] Esta solicitud además contiene métodos de control de insectos, en particular infestaciones de plantas de cultivos por Lepidoptera, Coleoptera, Hemiptera o Thysanoptera, con una proteína de las clases de toxinas de proteínas TIC6280 o TIC7016. Dichos métodos pueden implicar el crecimiento de una planta compuesto por una cantidad inhibitoria de un insecto, Coleoptera, Lepidoptera o Hemiptera o Thysanoptera de una proteína a partir de las clases de toxinas de proteínas TIC6280 o TIC7016. En determinadas representaciones, dichos métodos pueden además comprender uno o más de los siguientes métodos: (i) aplicación de cualquier composición que incluye o codifica una proteína a partir de las clases de toxinas de proteínas TIC6280 o TIC7016 a una planta o semilla que se transforma en planta y (ii) mediante la transformación de una planta o célula de una planta que se transforma en una planta con

un polinucleótido, una proteína de las clases de toxinas de las proteínas TIC6280 o TIC7016. En general, está contemplado que una proteína de las clases de toxinas de proteínas TIC6280 o TIC7016 se pueden proporcionar en una composición, microorganismo o planta transgénica para conferir una actividad inhibitoria de insectos contra insectos Lepidoptera, Coleoptera o Hemiptera.

- 5 [0176] En determinadas representaciones, una molécula de ácido nucleico recombinante de una proteína a partir de las clases de toxinas de las proteínas TIC6280 o TIC7016 es el ingrediente activo de insecticida de una composición inhibitoria de insectos preparada mediante el *Bacillus* o cualquier otra célula bacteriana recombinante transformada para expresar una proteína a partir de las clases de toxinas de proteínas TIC6280 o TIC7016 en condiciones adecuadas para expresar una proteína a partir de las
- 10 clases de toxinas de proteínas TIC6280 o TIC7016. Dicha composición se puede preparar mediante disecación, liofilización, homogeneización, extracción, filtrado, centrifugado, sedimentación o concentración de un cultivo de dichas células recombinantes que expresan/producen dicho polipéptido recombinante. Dicho proceso puede derivar en *Bacillus* o cualquier otra extracción celular bacteriana entomopatógena, suspensión celular, homogenado celular, lisado celular, supernadante celular, filtrado
- 15 celular o comprimido celular. Al obtener los polipéptidos recombinantes producido de esa manera, una composición que comprende los polipéptidos recombinantes puede incluir células bacterianas, esporas bacterianas y cuerpos de inclusión parasporal y se pueden formular para diversos usos, incluso como productos rociadores inhibidores de insectos agrícolas o formulaciones inhibitorias de insectos en bioensayos de dietas.
- 20 [0177] En una realización, para reducir la probabilidad de desarrollo de resistencia, una composición inhibitoria de insectos que comprende una proteína de la clase de toxina de proteína TIC6280 o TIC7016 además puede comprender al menos un polipéptido adicional que presenta acción inhibitoria de insectos contra la misma especie de insectos lepidópteros, coleópteros o hemípteros, la cual difiere de la proteína de la clase de toxina de proteína TIC6280 o TIC7016. Los polipéptidos adicionales posibles para dicha
- 25 composición incluyen una proteína inhibitoria de insectos y una molécula inhibitoria de insectos siRNA. Un ejemplo para el uso de dichas secuencias de ribonucleótidos para controlar las plagas de insectos se describe en Baum, *et al.* (Publicación de patente de EE. UU. 2006/0021087 A1). Este polipéptido adicional para el control de plagas de lepidópteros puede seleccionarse del grupo que consta de una proteína inhibitoria de insectos, que incluye, entre otros, Cry1A (Patente de EE. UU. N°. 5.880.275),
- 30 Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1A.105, Cry1Ae, Cry1B (Publicación de patente de EE. UU. N°. 10/525.318), Cry1C (Patente de EE. UU. N°. 6.033.874), Cry1D, Cry1Da y sus variantes, Cry1E, Cry1F, y quimera

Cry1A/F (Números de patente de EE. UU. 7.070.982; 6.962.705; y 6.713.063), quimeras tipo Cry1G, Cry1H, Cry1I, Cry1J, Cry1K, Cry1L, Cry1 que incluye, entre otros, TIC836, TIC860, TIC867, TIC869 y TIC1100, Cry2A, Cry2Ab (Patente de EE. UU. N.º 7.064.249), Cry2Ae, Cry4B, Cry6, Cry7, Cry8, Cry9, Cry15, Cry43A, Cry43B, Cry51Aa1, ET66, TIC400, TIC800, TIC834, TIC1415, Vip3A, VIP3Ab, VIP3B, AXMI-001, AXMI-002, AXMI-030, AXMI-035, Y AXMI-045 (Publicación de patente de EE. UU. 2013-0117884 A1), AXMI-52, AXMI-58, AXMI-88, AXMI-97, AXMI-102, AXMI-112, AXMI-117, AXMI-100 (Publicación de patente de EE. UU. 2013-0310543 A1), AXMI-115, AXMI-113, AXMI-005 (Publicación de patente de EE. UU. 2013-0104259 A1), AXMI-134 (Publicación de patente de EE. UU. 2013-0167264 A1), AXMI-150 (Publicación de patente de EE. UU. 2010-0160231 A1), AXMI-184 (Publicación de patente de EE. UU. 2010-0004176 A1), AXMI-196, AXMI-204, AXMI-207, axmi209 (Publicación de patente de EE. UU. 2011-0030096 A1), AXMI-218, AXMI-220 (Publicación de patente de EE. UU. 2014-0245491 A1), AXMI-221z, AXMI-222z, AXMI-223z, AXMI-224z, AXMI-225z (Publicación de patente de EE. UU. 2014-0196175 A1), AXMI-238 (Publicación de patente de EE. UU. 2014-0033363 A1), AXMI-270 (Publicación de patente de EE. UU. 2014-0223598 A1), AXMI-345 (Publicación de patente de EE. UU. 2014-0373195 A1), DIG-3 (Publicación de patente de EE. UU. 2013-0219570 A1), DIG-5 (Publicación de patente de EE. UU. 2010-0317569 A1), DIG-11 (Publicación de patente de EE. UU. 2010-0319093 A1), AfIP-1A y los derivados de los mismos (Publicación de patente de EE. UU. 2014-0033361 A1), AfIP-1B y los derivados de los mismos (Publicación de patente de EE. UU. 2014-0033361 A1), PIP-1APIP-1B (Publicación de patente de EE. UU. 2014-0007292 A1), PSEEN3174 (Publicación de patente de EE. UU. 2014-0007292 A1), AECFG-592740 (Publicación de patente de EE. UU. 2014-0007292 A1), Pput_1063 (Publicación de patente de EE. UU. 2014-0007292 A1), Pput_1064 (Publicación de patente de EE. UU. 2014-0007292 A1), GS-135 y los derivados de los mismos (Publicación de patente de EE. UU. 2012-0233726 A1), GS153 y los derivados de los mismos (Publicación de patente de EE. UU. 2012-0192310 A1), GS154 y los derivados de los mismos (Publicación de patente de EE. UU. 2012-0192310 A1), GS155 y los derivados de los mismos (Publicación de patente de EE. UU. 2012-0192310 A1), ID SEC. N.º:2 y los derivados de los mismos, como se describe en la Publicación de patente de EE. UU. 2012-0167259 A1, ID SEC. N.º:2 y los derivados de los mismos, como se describe en la Publicación de patente de EE. UU. 2012-0047606 A1, ID SEC. N.º:2 y los derivados de los mismos, como se describe en la Publicación de patente de EE. UU. 2011-0154536 A1, ID SEC. N.º:2 y los derivados de los mismos, como se describe en la Publicación de patente de EE. UU. 2011-0112013 A1,

ID SEC. N°.:2 y 4 los derivados de los mismos, como se describe en la Publicación de patente EE. UU. 2010-0192256 A1, ID SEC. N°.:2 y los derivados de los mismos, como se describe en la Publicación de patente de EE. UU. 2010-0077507 A1, ID SEC. N°.:2 y los derivados de los mismos, como se describe en la Publicación de patente de EE. UU. 2010-0077508 A1, ID SEC. N°.:2 y los derivados de los mismos, como se describe en la Publicación de patente de EE. UU. 2009-0313721 A1, ID SEC. N°.:2 o 4 y los derivados de los mismos, como se describe en la Publicación de patente de EE. UU. 2010-0269221 A1, ID SEC. N°.:2 y los derivados de los mismos, como se describe en la Patente de EE. UU. N.º 7,772,465 (B2), CF161_0085 y los derivados de los mismos, como se describe en WO2014/008054 A2, proteínas tóxicas de lepidópteros y sus derivados como se describe en las Publicaciones de patente de EE. UU. US2008-0172762 A1, US2011-0055968 A1, y US2012-0117690 A1; ID SEC N°.:2 y los derivados de los mismos como se describe en US7510878(B2), ID SEC N°.:2 y los derivados de los mismos como se describe en la Patente de EE. UU. N°. 7812129(B1); y lo similar.

[0178] Este polipéptido adicional para el control de plagas de coleópteros puede seleccionarse del grupo que consta de una proteína inhibidora de insectos, que incluye, entre otros, Cry3Bb (Patente de EE. UU. 6,501,009), variantes Cry1C, variantes Cry3A, Cry3, Cry3B, Cry34/35, 5307, AXMI134 (Publicación de patente de EE. UU. 2013-0167264 A1), AXMI-184 (Publicación de patente de EE. UU. 2010-0004176 A1), AXMI-205 (Publicación de patente de EE. UU. 2014-0298538 A1), axmi207 (Publicación de patente de EE. UU. 2013-0303440 A1), AXMI-218, AXMI-220 (Publicación de patente de EE. UU. 20140245491A1), AXMI-221z, AXMI-223z (Publicación de patente de EE. UU. 2014-0196175 A1), AXMI-279 (Publicación de patente de EE. UU. 2014-0223599 A1), AXMI-R1 y las variantes de los mismos (Publicación de patente de EE. UU. 2010-0197592 A1, TIC407, TIC417, TIC431, TIC807, TIC853, TIC901, TIC1201, TIC3131, DIG-10 (Publicación de patente de EE. UU. 2010-0319092 A1), eHIPs (Publicación de patente de EE. UU. N°. 2010/0017914), IP3 y las variantes de los mismos (Publicación de patente de EE. UU. 2012-0210462 A1), y π -Hexatoxin-Hv1a (Publicación de solicitud de patente de EE. UU. US2014-0366227 A1)

[0179] Dichos polipéptidos adicionales para el control de plagas de hemípteros pueden seleccionarse del grupo que consta de proteínas con hemípteros activos que incluye, entre otros, TIC1415 (Publicación de patente de EE. UU. 2013-0097735 A1), TIC807 (Patente de EE. UU. N°. 8609936), TIC834 (Publicación de patente de EE. UU. 2013-0269060 A1), AXMI-036 (Publicación de patente de EE. UU. 2010-0137216 A1), y AXMI-171 (Publicación de patente de EE. UU. 2013-0055469 A1).

[0180] En otras realizaciones, dicha composición/formulación además puede comprender al menos un polipéptido adicional con acción inhibidora de insectos contra un insecto que no es inhibido por una proteína inhibidora de insectos de la presente invención para ampliar el espectro de la inhibición de insectos obtenida. En el sitio web de terminología de la toxina *Bacillus thuringiensis* de Neil Crickmore (en el sitio web mundial btnomenclature.info), pueden encontrarse polipéptidos adicionales para el control de plagas de insectos coleópteros, lepidópteros, hemípteros y tisanópteros.

[0181] La posibilidad de que los insectos desarrollen resistencia a ciertos insecticidas se ha documentado en la técnica. Una estrategia de administración de resistencia de insectos emplea cultivos transgénicos que expresan dos agentes inhibidores de insectos diferentes que operan a través de distintos modos de acción. Por lo tanto, cualquier insecto con resistencia a cualquiera de los agentes inhibidores de insectos puede controlarse a través de otro agente inhibitorio de insectos. Otra estrategia de administración de resistencia de insectos emplea el uso de plantas no protegidas contra las especies de plagas de coleópteros, lepidópteros, hemípteros o tisanópteros específicas para proporcionar un refugio para dichas plantas sin protección. La Patente de EE. UU. N°. 6,551,962 incluye otro ejemplo particular, el cual se incorpora a modo de referencia en su totalidad.

[0182] Otras realizaciones como químicos pesticidas aplicados de forma local diseñados para el control de plagas que también se controlan mediante las proteínas divulgadas en este documento a usar con proteínas en tratamientos de semillas, fórmulas en rociador, goteo o de aplicación pueden aplicarse directamente en el suelo (humedecedor de suelo), aplicado a plantas en crecimiento que expresen las proteínas divulgadas en este documento, o formuladas para aplicarse a la semilla que contiene un transgén o más y que codifica una proteína divulgada o más. Dichas formulaciones para el uso en tratamientos de semilla pueden aplicarse con distintos adhesivos y agentes adherentes conocidos en la técnica. Dichas formulaciones pueden contener pesticidas sinérgicos en modo de acción con las proteínas divulgadas, de manera que los pesticidas de la formulación actúen a través de un modo de acción distinto para controlar las mismas plagas, u otras, que pueden controlarse a través de las proteínas divulgadas, o que dichos pesticidas actúen para controlar plagas dentro de un rango más amplio o de especies de plagas de plantas que no puedan controlarse eficazmente a través de la proteína de toxina TIC6280 o aquellas relacionadas con TIC6280, o la proteína de toxina TIC7016, o aquellas relacionadas con TIC7016.

[0183] La composición/formulación anterior además puede comprender un portador ruralmente aceptable como un cebo, un polvo, un polvillo, un comprimido, un gránulo, *spray*, emulsión, una

suspensión coloidal, una solución acuosa, una preparación transparente/de espora de *Bacillus*, un tratamiento para semilla, una célula de planta recombinante/tejido vegetal/semilla/planta transformada para expresar una o más de las proteínas, o bacteria transformada para expresar una o más de las proteínas. Según el nivel de inhibidor de insecto o inhibición insecticida inherente al polipéptido recombinante y el nivel de formulación a aplicar a una planta o ensayo de dieta, la composición/formulación puede incluir varios por valor de peso del polipéptido recombinante, por ejemplo, 0,0001 % a 0,001 % a 0,01 % a 1 % a 99 % por peso del polipéptido recombinante.

[0184] Por esta razón, aquellos capacitados en la técnica deben apreciar que pueden realizarse modificaciones en los aspectos específicos, los cuales se divulgan y pueden proporcionar resultados similares sin alejarse del espíritu y del alcance de la invención. Por lo tanto, los detalles estructurales y funcionales específicos divulgados en este documento no deben interpretarse como límite. Se debe comprender que la divulgación total de cada referencia citada en este documento está comprendida dentro de la divulgación de esta aplicación.

EJEMPLOS

[0185] Por esta razón, aquellos capacitados en la técnica deben apreciar que pueden realizarse modificaciones en los aspectos específicos, los cuales se divulgan y pueden proporcionar resultados similares sin alejarse del espíritu y del alcance de la invención. Por lo tanto, los detalles estructurales y funcionales específicos divulgados en este documento no deben interpretarse como límite. Se debe comprender que la divulgación total de cada referencia citada en este documento está comprendida dentro de la divulgación de esta aplicación.

Ejemplo 1

Descubrimiento de nuevos *Lysinibacillus sphaericus* y genes metagenómicos

[0186] Este ejemplo describe el descubrimiento de las proteínas pesticidas TIC6280, TIC6281, TIC6282, TIC6283, TIC8808, TIC9480, TIC9257, TIC7106, TIC7017, TIC7107, TIC7108, TIC7109, TIC7110, TIC7111, TIC7589, TIC9258, y TIC9259.

[0187] Las secuencias que codifican las nuevas proteínas pesticidas *Lysinibacillus sphaericus* (*Ls*) se identificaron, clonaron, confirmaron y probaron en bioensayo con insectos. La proteína pesticida

TIC6280, presentada en este documento como ID SEC N°.:22 (secuencia de codificación *Ls*) y (proteína) ID SEC N°.:23, se aisló de las especies *Lysinibacillus sphaericus* AG0067H07. Se utilizó secuenciado y bioinformática de alto rendimiento para detectar genomas y metagenomas *Ls* derivados de raspador de placas para genes (marco abierto de lectura) que codifican proteínas y que presentan una similitud con TIC6280. Se identificaron seis proteínas con toxina relacionada en esta pantalla y se presenta en la Tabla 7, junto con la designación de cepa o metagenoma *Ls* (MTG) y la identidad porcentual de la proteína TIC6280.

Tabla 7. TIC6280 y proteínas con toxina relacionadas.

Toxina	Número de SEQ ID de codificación:	Número de SEQ ID de la proteína:	Especies <i>Ls</i>	Identidad porcentual de TIC6280
TIC6280	22	23	AG0067H07	-
TIC6281	24	25	AG0067H03	99,3
TIC6282	26	27	AG0069H08	99,3
TIC6283	28	29	AG0025E04	99,3
TIC8808	90	91	MTG000070	92,7
TIC9480	92	93	MTG000415	83,2
TIC9257	94	95	MTG000199	83,2

10

[0188] La proteína pesticida TIC7016, presentada en este documento como ID SEC N°.:30 (secuencia de codificación *Ls*) y (proteína) ID SEC N°.:31, se aisló de las especies *Lysinibacillus sphaericus* EGBS0420. Se utilizó secuenciado y bioinformática de alto rendimiento para detectar genomas y metagenomas *Ls* derivados de raspador de placas para genes (marco abierto de lectura) que codifican proteínas y que presentan una similitud con TIC7016. Se identificaron nueve proteínas con toxina relacionada en esta pantalla y se presenta en la Tabla 8, junto con la designación de cepa o metagenoma *Ls* (MTG) y la identidad porcentual de la proteína TIC7016. Las secuencias de codificación TIC7107, TIC7109, TIC7110, y TIC7111 codifican una secuencia de aminoácido idéntica, referida en este documento como TIC7110 (N°. de ID de SEC:39). Cada una de las secuencias de codificación de la

15

proteína TIC7110 difiere entre sí en uno de los seis nucleótidos y representa secuencias de codificación de variantes que codifican la misma secuencia de aminoácidos de proteína, referida en este documento como TIC7110.

Tabla 8. TIC7016 y proteínas con toxina relacionadas.

5

Toxina	Número de SEQ ID de codificación:	Número de SEQ ID de la proteína:	Especies <i>Ls</i>	Identidad porcentual de TIC7016
TIC7016	30	31	EGBS0420	-
TIC7017	32	33	EGBS1094	98,9
TIC7107	34	39	AG0025E04	96,7
TIC7108	35	36	AG0067H01	96,4
TIC7109	37	39	AG0067H03	96,7
TIC7110	38	39	AG0067H07	96,7
TIC7111	40	39	AG0069H08	96,7
TIC7589	41	42	AG0122F12	62,8
TIC9258	96	97	MTG000120	99,3
TIC9259	98	99	MTG000184	99,6

[0189] Los segmentos de nucleótidos que codifican clases de toxina de proteína TIC6280 o TIC7016 se realizaron mediante amplificación PCR con ADN genómico de las cepas correspondientes o se sintetizaron y clonaron químicamente para convertirse en vectores de expresión para la expresión en un huésped bacteriano.

10

Ejemplo 2

Bioensayo de integrantes de proteínas de la clase de toxina de las proteínas TIC6280 y TIC7016 contra plagas de insectos

[0190] Este ejemplo describe los bioensayos de actividades contra plagas de insectos coleópteros, lepidópteros y hemípteros con preparaciones bacterianas de proteínas a partir de la clase de toxina de las proteínas TIC6280 y TIC7016.

[0191] Las proteínas de las clases de toxina de proteína TIC6280 y TIC7016 se expresaron en *E. coli* como proteínas con histidina y se realizó el ensayo para analizar la toxicidad de distintas especies de lepidópteros, coleópteros y hemípteros. Las secuencias de codificación que codifican las proteínas de las clases de toxina de las proteínas TIC6280 y TIC7016 se clonaron con métodos conocidos en la técnica que comprenden una secuencia corta en el extremo 3' y que codifican una etiqueta de histidina usada para la purificación de cada proteína con toxina. Las secuencias que codifican cada toxina identificada con histadina y la proteína identificada con histadina resultante se presenta en la Tabla 9 a continuación.

[0192] Las preparaciones de cada toxina de *E. coli* se sometieron a ensayos frente a las especies de coleópteros gusano de la raíz del maíz del Oeste (WCR, *Diabrotica virgifera virgifera*), gusano de la raíz del maíz del Norte (NCR, *Diabrotica barberi*), gusano de la raíz del maíz del Sur (SCR, *Diabrotica undecimpunctata howardii*), y escarabajo de la patata (CPB, *Leptinotarsa decemlineata*); las especies de hemípteros chinche opaca de las plantas (TPB, *Lygus lineolaris*), chinche opaca de las plantas del Oeste (WTP, *Lygus hesperus*), chinche verde del Sur (SGSB, *Nezara viridula*), y chinche marrón (NBSB, *Euschistus heros*); y las especies de lepidópteros soja looper (SBL, *Chrysodeixis includens*), taladro de maíz (ECB, *Ostrinia nubilalis*), oruga del tabaco (TBW, *Heliothis virescens*), gusano de la mazorca (CEW, *Helicoverpa zea*), oruga militar tardía (FAW, *Spodoptera frugiperda*), oruga militar del Sur (SAW, *Spodoptera eridania*), taladro de maíz del Sudoeste (SWC, *Diatraea grandiosella*), palomilla dorso de diamante (DBM, *Plutella xylostella*), gusano cortador negro (BCW, *Agrotis ipsilon*) y oruga de las leguminosas (VBC, (*Anticarsia gemmatilis*)).

Tabla 9. Codificación identificada con histadina y secuencias de proteína de las clases de toxina de proteína TIC6280 y TIC7016 e insectos analizados.

Toxina	Número de código de la secuencia SEQ ID:	Número de ID de SEQ de la secuencia de la proteína:	Insectos analizados
TIC6280-His	1	2	WCR; CPB; TBP; WTP; SGSB; NBSB; SBL; ECB; CEW; FAW; ECB; SWC
TIC6281-His	3	4	CPB; TPB; WTP; SGSB; NBSB; SBL; CEW; FAW; SAW; SWC
TIC6282-His	5	6	WCR; CPB; TBP; WTP; SGSB; NBSB; SBL; ECB; CEW; FAW; ECB; SAW; SWC
TIC6283-His	7	8	WCR; CPB; TBP; WTP; SGSB; NBSB; SBL; ECB; CEW; FAW; ECB; SWC
TIC8808-His	80	81	BCW; WTP; SGSB; SAW; SBL; SWC
TIC7016-His	9	10	WCR; CPB; TPB; WTP; SGSB; NBSB; SBL; ECB; TBW; CEW; FAW; DBM
TIC7017-His	11	12	WCR; NCR; SCR; CPB; TPB; WTP; SGSB; NBSB; SBL; ECB; TBW; CEW; FAW; SWC; NBSB; DBM
TIC7107-His	13	18	CPB; TPB; WTP; SBL; ECB; TBW; CEW; FAW; SWC; VBC
TIC7108-His	14	15	WCR; CPB; SGSB; SWC; DBM

TIC7109-His	16	18	WCR; CPB; TPB; WTP; SGSB; DBM; VBC
TIC7110-His	17	18	WCR; CPB; TPB; WTP; SGSB; NBSB; SBL; ECB; CEW; FAW; TBW; DBM; VBC
TIC7111-His	19	18	WCR; CPB; TPB; WTP; SGSB; NBSB; SBL; ECB; CEW; FAW; TBW; DBM; VBC
TIC7589-His	20	21	CPB; VBC
TIC9258-His	86	87	WTP; BCW; SAW; SBL; SWC
TIC9259-His	88	89	WCR; BCW; SWC

[0193] La acción pesticida de las proteínas de las clases de toxina de las proteínas TIC6280 o TIC7016 se presenta en las Tablas 10 y 11 donde “+” se refiere a la acción.

Tabla 10. Acción pesticida de las proteínas de las clases de toxina de las proteínas TIC6280 y TIC7016 contra especies de plagas de insectos coleópteros y hemípteros.

Toxina	WCR	NCR	SCR	CPB	TPB	WTP	SGSB	NBSB
TIC6280	+			+				
TIC6281							+	
TIC6282	+			+	+		+	
TIC6283	+			+	+		+	
TIC8808								
TIC7016	+			+	+	+	+	+
TIC7017	+	+	+	+	+	+	+	+
TIC7107				+	+	+		
TIC7108	+			+			+	
TIC7109	+			+	+	+	+	
TIC7110	+			+	+	+	+	+

TIC7111	+			+	+	+	+	+
TIC7589				+				
TIC9258								
TIC9259	+							

Tabla 11. Acción pesticida de las proteínas de las clases de toxina de las proteínas TIC6280 y TIC7016 contra especies de plagas de insectos lepidópteros.

Toxina	SBL	ECB	TBW	CEW	FAW	SAW	SWC	DBM	BCW	VBC
TIC6280										
TIC6281										
TIC6282										
TIC6283										
TIC8808										
TIC7016	+	+						+		+
TIC7017	+							+		+
TIC7107	+			+			+			
TIC7108							+	+		
TIC7109								+		+
TIC7110	+		+					+		+
TIC7111								+		+
TIC7589										
TIC9258										
TIC9259										

5

[0194] Como se observa en las Tablas 10 y 11, las proteínas de las clases de toxina de las proteínas TIC6280 y TIC7016 demostraron acción contra un amplio espectro de especies, y algunas toxinas demostraron acción contra plagas de insectos de las tres familias representadas: coleópteros, hemípteros y lepidópteros. Se observó una variación con respecto a la actividad de las proteínas derivadas de las

secuencias de codificación TIC7109, TIC7110, y TIC7111, aunque las tres secuencias codificaban la misma proteína. Esta variación puede deberse a las diferencias en la preparación de la proteína como resultado de la expresión en el huésped *E. coli*, o purificación subsecuente. Además, no todas las preparaciones se analizaron respecto de todas las plagas de insectos. Por lo tanto, la actividad observada para TIC7110 se usa como representación de la actividad de la proteína con toxina codificada por las cuatro secuencias de codificación.

Ejemplo 3

Diseño de proteínas codificadas por secuencias de codificación sintéticas de las clases de toxina de las proteínas TIC6280 y TIC7016 para expresión en células de las plantas

[0195] Este ejemplo describe el diseño de las secuencias de ADN sintético que codifican las proteínas de las clases de toxina de las proteínas TIC6280 y TIC7016 usadas para la expresión de la proteína en células de plantas transformadas.

[0196] Las secuencias de codificación sintéticas se construyen para su uso en la expresión de proteínas codificadas en las plantas, y pueden clonarse y convertirse en vectores de transformación de plantas, u se usan para transformar las células de las plantas. Las secuencias sintéticas se sintetizan según los métodos generalmente descritos en la patente de EE.UU. 5,500,365, para evitar ciertas secuencias de problemas adversos como secuencias de poliadenilación de plantas ricas ATTTA y A/T mientras se preserva la secuencia de aminoácidos de la proteína original. Las secuencias de codificación sintética presentadas en la Tabla 12 codifican las proteínas de versión de planta de ciertas proteínas de las clases de toxina de las proteínas TIC6280 y TIC7016.

Tabla 12. Secuencias de codificación sintética diseñadas para la expresión en una célula de planta.

Toxina	Número de ID de SEQ de la secuencia de codificación sintética:	Número de SEQ ID de la proteína:
TIC6280	43	23

TIC6282	44	27
TIC6283	45	29
TIC7016PL	46	47
TIC7017PL	48	49
TIC7108PL	50	51
TIC7110PL	52	53

[0197] Las secuencias de codificación sintética se clonaron para convertirse en vectores de transformación binaria de planta con métodos conocidos en la técnica. Los vectores binarios resultantes comprenden un primer casete transgén que comprende un promotor expresable de planta, opcionalmente operable unido 5' a un intrón, operable unido 5' a una secuencia de codificación sintética que codifica TIC6280, o TIC6282, TIC6283, TIC7016, TIC7017, TIC7108, o TIC7110 operable unido 5' a 3' UTR; y un segundo casete transgén usado para la selección de células de plantas transformadas con selección de glifosato o selección antibiótica mediante antibióticos como espectinomicina.

10

Ejemplo 4

Ensayo de actividad contra plagas de coleópteros con proteínas que expresan plantas de maíz transformadas de forma estable de las clases de proteínas con toxina TIC6280 y TIC7016.

[0198] Este ejemplo describe el ensayo de actividad contra plagas de insectos coleópteros en plantas de maíz transformadas de forma estable en proteínas expresadas de la clase de toxina de las proteínas TIC6280 y TIC7016.

15

[0199] Los vectores binarios de transformación de planta que comprenden casetes transgén diseñados para expresar proteínas de las clases de toxina de las proteínas TIC6280 y TIC7016 se clonan con métodos conocidos en la técnica. Los vectores resultantes se usan para transformar de forma estable las plantas de maíz. La actividad pesticida se analiza respecto de las plagas de coleópteros que se alimentan de las raíces de las plantas de maíz transformado de forma estable.

20

[0200] Los vectores binarios descritos en el Ejemplo 3 se usan para transformar plantas de maíz de forma estable. Los eventos de inserción de ADN-T simple se seleccionan y desarrollan. Las plantas R₀ transformadas de forma estable se usan para analizar resistencia de coleópteros y generar progenie F₁. Los eventos de copia simple múltiple se seleccionan de cada transformación de vector binario. Una

porción de esos eventos que surge de cada transformación de vector binario se usa en el análisis de coleópteros, mientras que otra porción de eventos se usa para generar progenie F_1 para pruebas adicionales.

[0201] Las plantas de ensayo R_0 se trasplantan en macetas de ocho pulgadas. Las plantas se inoculan con huevos de gusanos de maíz del Oeste (*Diabrotica virgifera virgifera*, WCR). Los huevos se incuban durante aproximadamente diez días antes de su inoculación para permitir que la incubación ocurra cuatro días después de la inoculación, de manera que se pueda asegurar una cantidad suficiente de larvas sobrevivientes para que puedan atacar las raíces del maíz. Las plantas transformadas se inoculan aproximadamente en la etapa V2 a V3. Las plantas se cultivan después de la infección durante aproximadamente veinte días. Las plantas se extraen de las macetas y se lavan exhaustivamente las raíces para quitar toda la tierra. El daño a las raíces se analiza a través de una escala de clasificación de daños de 1 a 5, como se presenta en la Tabla 13. Además, se compara con un control negativo para garantizar que el ensayo se haya realizado correctamente. Los puntajes bajos de daño en la raíz indican la resistencia a la plaga de coleópteros conferida por la proteína de las clases TIC6280 y TIC7016. Los eventos múltiples R_0 para cada transformación de vector binario se usan en el ensayo de WCR. Esos eventos R_0 que demuestran un puntaje de daño en la raíz más bajo que los controles se interpretan como una resistencia al CRW.

Tabla 13. Puntajes de clasificación de daños en la raíz R_0 .

Puntaje de daño en la raíz	Descripción
1	Sin alimentación visible
2	Alimentación leve; sin recortes
3	Recorte de al menos una raíz
4	Todo el nodo cortado
5	Más de un nodo cortado

[0202] Una porción de los eventos R_0 transformados de forma estable que surgen de la transformación de cada vector binario se usa para producir progenitora F_1 . Las plantas R_0 transformadas de forma

estable pueden autofertilizarse, y producir progenia F₁. Se planta la semilla F₁. Las plantas heterocigotas se identifican a través de métodos moleculares conocidos en la técnica y se usan para el ensayo de WCR, así como la medición de expresión ELISA de la proteína de las clases de proteína TIC6280 y TIC7016. Una porción de la progenia F₁ heterocigota de cada evento se usa para el ensayo de insectos, mientras otra porción se usa para medir la expresión de la proteína con toxina.

[0203] Los huevos del gusano de maíz del Oeste (*Diabrotica virgifera virgifera*, WCR) se incuban durante aproximadamente diez días para permitir la incubación dentro de los cuatro días posteriores a la inoculación. Las plantas se inoculan aproximadamente en la etapa V2 a V3. Para WCR, cada maceta se inocula aproximadamente con dos mil huevos. Las plantas se cultivan después de la infección durante aproximadamente veinte días. Las plantas se extraen de las macetas y se lavan exhaustivamente las raíces para quitar toda la tierra. El daño a las raíces se analiza a través de una escala de clasificación de daños de 0 a 3, como se presenta en la Tabla 14. Se compara con un control negativo para garantizar que el ensayo se haya realizado correctamente. Los puntajes bajos de daño en la raíz indican la resistencia a la plaga de coleópteros conferida por la proteína de las clases TIC6280 y TIC7016.

Tabla 14. Puntajes de clasificación de daños en la raíz F₁.

Puntaje de daño en la raíz	Descripción
0	Sin alimentación visible
0,01-0,09	Grietas y marcas de alimentación
0,1-0,9	Recorte de raíz, pero menos de un nodo completo
1,0-1,9	Al menos un nodo completo (o su equivalente) destruido dentro de 1,5 pulgadas de la planta
2,0-2,9	Dos o más nodos dañados
3	Tres o más nodos dañados

[0204] La actividad contra otras especies de gusano de maíz puede analizarse de una forma similar como se describe a continuación, para WCR. Por ejemplo, los puntajes de daño a la raíz pueden derivarse mediante colonias de *Diabrotica barberi* (gusano de maíz del Norte, NCR), *Diabrotica virgifera zea* (gusano de maíz de México, MCR), *Diabrotica balteata* (Gusano de maíz de Brasil (BZR), *Diabrotica undecimpunctata howardii* (Gusano de maíz del Sur, SCR) y un complejo de gusano

de maíz de Brasil (BCR) que consta de *Diabrotica viridula* y *Diabrotica speciosa*). La cantidad de inoculación, las condiciones de incubación del huevo y la duración de la alimentación puede variar según las características biológicas de las especies de gusano de maíz determinadas.

Ejemplo 5

Ensayo de actividad contra plagas de lepidópteros con proteínas que expresan plantas de maíz, soja y algodón transformadas de forma estable de las clases de proteínas con toxina TIC6280 y TIC7016.

[0205] Este ejemplo describe el ensayo de actividad contra plagas de insectos lepidópteros en plantas de maíz, soja y algodón transformadas de forma estable en proteínas expresadas de la clase de toxina de las proteínas TIC6280 y TIC7016.

[0206] Los vectores binarios de transformación de planta que comprenden casetes transgén diseñados para expresar proteínas de las clases de toxina de las proteínas TIC6280 y TIC7016 se clonan con métodos conocidos en la técnica. Los vectores resultantes se usan para transformar de forma estable las plantas de maíz. La actividad pesticida se analiza respecto de la alimentación de plagas de lepidópteros en el tejido de la hoja derivado de las plantas de maíz, soja y algodón transformadas de forma estable.

[0207] Los vectores binarios descritos en el Ejemplo 3 se usan para transformar plantas de maíz, soja y algodón de forma estable. Los eventos de inserción de ADN-T simple se seleccionan y desarrollan. Las plantas R₀ transformadas de forma estable pueden cultivarse a una etapa de desarrollo vegetativa seleccionada. Los bioensayos que usan discos de hoja de planta se llevan a cabo de forma análoga respecto de aquellos descritos en la Patente de EE.UU. número 8.344.207. Una planta no transformada se usa para obtener tejido a usarse como control negativo. Los eventos de transformación múltiples de cada vector binario se analizan respecto de las especies de plaga de insectos lepidópteros que incluye, entre otros, soja looper (SBL, *Chrysodeixis includens*), taladro de maíz (ECB, *Ostrinia nubilalis*), gusano de tabaco (TBW, *Heliothis virescens*), gusano de maíz (CEW, *Helicoverpa zea*), gusano soldado tardío (FAW, *Spodoptera frugiperda*), gusano soldado del Sur (SAW, *Spodoptera eridania*), taladro de maíz del Sudoeste (SWC, *Diatraea grandiosella*), polilla espalda diamantada (*Plutella xylostella*), y oruga de las leguminosas (*Anticarsia gemmatilis*).

[0208] Las plagas de insectos se observan respecto de mortalidad y retraso en el crecimiento causados por la ingestión de los discos de hojas presentados que expresan proteínas de las clases de toxinas de

proteínas TIC6280 y TIC7016 y en comparación con discos de hojas derivados de plantas de maíz, soja o algodón no transformadas.

Ejemplo 6

Ensayo de la actividad de proteínas de las clases de toxina de las proteínas TIC6280 y TIC7016 5 contra plagas de hemípteros en plantas de soja transformadas de forma estable

[0209] Este ejemplo describe el ensayo de actividad contra plagas de insectos hemípteros en plantas de soja transformadas de forma estable en proteínas expresadas de la clase de toxina de las proteínas TIC6280 y TIC7016.

[0210] Las plantas de soja se transforman usando vectores binarios de transformación de plantas
10 similares a los descritos en el Ejemplo 3. Las células de plantas de soja transformadas se inducen para formar plantas enteras. El ensayo de actividad contra las plagas de Hemípteros se realiza con una variedad de técnicas que dependerán de la especie de plagas de Hemípteros y el tejido preferido de esa plaga. Por ejemplo: las especies de plagas de hemípteros de chinches típicamente se alimentan de semillas y vainas en desarrollo de la planta de soja. Para evaluar la actividad contra chinches, las vainas
15 R5 se recolectan de plantas de soja transgénicas que expresan proteínas de las clases de toxinas proteínicas TIC6280 y TIC7016 y se colocan en una placa de Petri cubierta o en una placa grande de múltiples pocillos que contiene una capa de agar o papel mojado para proporcionar humedad al ambiente de alimentación. Las ninfas de chinches de segundo instar se colocan en la placa de Petri o en una placa grande de múltiples pocillos. Una cubierta que proporciona el intercambio de oxígeno
20 mientras se previene la desecación se coloca sobre el entorno de alimentación. Se permite que las ninfas de chinches se alimenten durante días. Las mediciones de restricción y mortalidad son tomadas y comparadas con aquellas de las ninfas de chinches que se han alimentado de discos de hojas de plantas de soja sin transformaciones.

[0211] Alternativamente, el ensayo de actividad también se puede realizar en plantas transformadas de
25 forma estable completa. Las plantas transformadas que expresan proteína de las clases de toxinas de las proteínas TIC6280 y TIC7016 se cultivan en una cámara de cultivo o en el invernadero. En la etapa R5, las plantas individuales se colocan en una jaula de hojas de plástico respirable «pollination» (Vilutis and Company Inc, Frankfort, IL). Las hojas se aseguran a la raíz principal justo sobre la superficie del suelo mediante un amarre de Velcro®. Cada planta se infecta con una cantidad específica de ninfas de

chinchas de segundo instar. Las ninfas se liberan en cada jaula individual a través de una pequeña ranura en el lado de la jaula y luego se cierra de forma segura para evitar que los insectos se escapen y las ninfas pueden alimentarse de las vainas de soja durante varios días a una semana o más. Las observaciones se llevan a cabo todos los días para determinar las medidas de restricción y mortalidad.

5 Al final del período de alimentación, se recogen las ninfas vivas y muertas. Se cortan las plantas de las jaulas y se las envía al laboratorio, en el que los insectos de cada planta se recogen y cuentan. Antes de abrir la jaula, se sacude vigorosamente a las plantas para asegurar que todos los insectos se caigan de sus sitios de alimentación hacia la base de la jaula. Luego, la base de la jaula se abre y todo el material de la planta se quita y se coloca en una hoja negra. Los insectos se pueden recolectar con un aspirador u otros
10 medios. El número de insectos y su etapa de desarrollo se registran para cada planta. Además, se registra el número y la etapa de desarrollo de las ninfas muertas. Estas mediciones se comparan con las mediciones obtenidas a partir de plantas no transformadas de control negativo.

[0212] Los retrasos en el desarrollo de las ninfas chinchas (restricción) o la mortalidad se interpretan como una indicación de toxicidad si, en comparación con los controles no transformados, hay una
15 diferencia significativa.

Ejemplo 7

Ensayo de la actividad de proteínas de las clases de toxina de las proteínas TIC6280 y TIC7016 contra plagas de hemípteros en plantas de maíz transformadas de forma estable

[0213] Este ejemplo describe el ensayo de actividad contra plagas de insectos hemípteros en plantas de
20 maíz transformadas de forma estable en proteínas expresadas de la clase de toxina de las proteínas TIC6280 y TIC7016.

[0214] Las plantas de maíz se transforman mediante vectores binarios de transformación de plantas similares a los descritos en el Ejemplo 3. Las células de plantas de maíz transformadas se inducen para formar plantas enteras. El ensayo de actividad contra las plagas de hemípteros se realiza con una
25 variedad de técnicas que dependerán de la especie de plagas de hemípteros y el tejido preferido de esa plaga. Por ejemplo: las especies de plagas de hemípteros de chinchas normalmente se alimentan de las plantas jóvenes de maíz a fines de la primavera o al comienzo del verano, dando como resultado agujeros en la hoja, y si son severas, deforman las plantas. A finales del verano, las chinchas típicamente se alimentan de la propia oreja, lo cual destruye directamente los granos.

[0215] Un método para evaluar la actividad de la chinche hedionda es exponer las larvas a discos de hojas derivados de plantas de maíz establemente transformadas que contengan proteínas de las clases de toxinas de proteínas TIC6280 y TIC7016 en placas de cultivo multi-well. Las larvas de esta chinche en estadio de segunda etapa se colocan en placas de cultivo multi-well con discos de hojas derivados de plantas de maíz establemente transformadas, y se las deja alimentarse durante varios días. Las mediciones de restricción y mortalidad son tomadas y comparadas con aquellas de las larvas que se han alimentado de discos de hojas de plantas de maíz sin transformaciones.

[0216] Como una alternativa, las plantas completamente transformadas pueden ser utilizadas para evaluar la actividad de las chinches hediondas. Las plantas de maíz transformadas establemente que contengan proteínas de las clases de toxinas de proteínas TIC6280 y TIC7016 se guardan en jaulas de forma similar a la que se describe para plantas de soja en el Ejemplo 4. Se introduce a las larvas de segundo estadio en plantas de maíz de etapa V3 y se los deja alimentarse durante varios días, hasta una semana. Luego del período de alimentación previsto, se recogen las larvas como se describe en el Ejemplo 4. Las mediciones de restricción y mortalidad se comparan con las plantas de control sin transformaciones.

[0217] Para evaluar la actividad de la chinche por medio de espigas de maíz establemente transformadas, se puede utilizar un enfoque similar al que se usa para evaluar plantas en etapa V3. Las espigas de trigo en desarrollo de plantas de maíz transformadas establemente que contengan proteínas de clase de toxina de proteínas TIC6280 y TIC7016 se encapsulan en hojas de material que permitan el intercambio libre de aire y no permitan el escape de larvas de chinche hedionda. Las espigas encapsuladas son infestadas con larvas de chinche hedionda de segundo estadio y se las deja alimentarse de los granos de espigas en desarrollo durante varios días, hasta una semana. Las mediciones de restricción y mortalidad se comparan con las plantas de espigas de control sin transformaciones.

Ejemplo 8

Proteínas de función y operadores derivados de proteínas de clase de toxinas de proteínas TIC6280 y TIC7016.

[0218] Este ejemplo describe el diseño de secuencias sintéticas de ADN que contengan proteínas de fusión con proteínas de clase de toxina de proteína desde TIC7016 hasta TIC6280, así como los

operadores que contengan secuencias que contengan una toxina de la clase de toxina de proteína desde TIC7016 y una TIC6280.

[0219] Las secuencias que contengan proteínas de clase de toxinas de proteínas TIC6280 y TIC7016 pueden ser utilizadas para crear proteínas fusionadas que contengan dos proteínas de toxinas; la primera de ellas una proteína de clase de toxina de proteína TIC7016 y la segunda de clase de toxina de proteína TIC6280. La proteína fusionada puede incrementar el espectro de actividad y/o brindar múltiples modos de acción contra las especies de insectos plaga. La primera y segunda proteínas de toxinas pueden ser seleccionadas entre las mismas especies bacterianas de las que fueron inicialmente aisladas, o pueden ser seleccionadas de especies bacterianas diferentes de las respectivas toxinas de las que fueron aisladas en primer lugar.

[0220] Pueden crearse diversos tipos de fusiones por medio de métodos de clonación conocidos. Se presentan las secuencias ejemplares de los tres tipos de proteínas fusionadas (fusión directa, fusión con molécula de unión divisible, y fusión con molécula de unión flexible) en la Tabla 15. Las proteínas fusionadas presentadas en la Tabla 15 muestran proteínas fusionadas derivadas de una proteína de clase de toxina de proteína TIC7016 fusionada con una proteína de clase de toxina de proteína TIC6280; las cuales han sido aisladas de la misma especie *Lysinibacillus sphaericus*.

Tabla 15. Unión de proteínas de toxinas fusionadas y secuencias de proteínas.

Secuencia de proteínas fusionadas	Tipo de fusión	Número de código de la secuencia SEQ ID:	Número de SEQ ID de la proteína:	Primera proteína	Molécula de unión	Segunda proteína	Especies <i>Ls</i>
TIC7110-TIC6280F1	Directa	54	55	TIC7110	Ninguna	TIC6280	AG0067H07
TIC7110-TIC6280F2	Molécula de unión divisible	56	57	TIC7110	Enlazador 1	TIC6280	AG0067H07
TIC7110-TIC6280F3	Molécula de unión flexible	58	59	TIC7110	Enlazador 2	TIC6280	AG0067H07
TIC7111-TIC6280F4	Directa	60	61	TIC7111	Ninguna	TIC6282	AG0069H08

Secuencia de proteínas fusionadas	Tipo de fusión	Número de código de la secuencia SEQ ID:	Número de SEQ ID de la proteína:	Primera proteína	Molécula de unión	Segunda proteína	Especies <i>Ls</i>
TIC6282F1							
TIC7111-TIC6282F2	Molécula de unión divisible	62	63	TIC7111	Enlazador 1	TIC6282	AG0069H08
TIC7111-TIC6282F3	Molécula de unión flexible	64	65	TIC7111	Enlazador 2	TIC6282	AG0069H08
TIC7109-TIC6281F1	Directa	66	67	TIC7109	Ninguna	TIC6281	AG0067H03
TIC7109-TIC6281F2	Molécula de unión divisible	68	69	TIC7109	Enlazador 1	TIC6281	AG0067H03
TIC7109-TIC6281F3	Molécula de unión flexible	70	71	TIC7109	Enlazador 2	TIC6281	AG0067H03

[0221] Las secuencias de fusión directa contienen dos secuencias de proteínas de toxinas unidas de forma operable, en línea y contigua que resulte en una secuencia que contenga una proteína fusionada en la que ambas proteínas de toxinas se fusionan directamente para crear una proteína de toxina grande.

- 5 Las secuencias de proteínas directamente fusionadas son representadas por los SEQ ID NO 54, 60 y 66, y contienen las proteínas fusionadas presentadas como SEQ ID no. 55, 61 y 67.

[0222] Una proteína fusionada que contiene una molécula de unión divisible, aquí presentada como Enlazador 1 con el número SEQ ID 72, y con el código de secuencia de aminoácidos presentado como SEQ ID no. 73, opera unido a la primera y la segunda secuencias de proteínas de toxinas, y en línea entre ellas. Cuando el insecto las consume, las enzimas presentes en el estómago del insecto dividen el enlazador, y así liberan las dos proteínas de toxinas y permiten que cada una se una a su receptor

10

respectivo. Las secuencias de proteínas fusionadas con una molécula de unión divisible son representadas por los SEQ ID NO 56, 62 y 68, y contienen las proteínas fusionadas presentadas como SEQ ID no. 57, 63 y 69.

[0223] Una proteína fusionada que contiene una molécula de unión flexible, aquí presentada como Enlazador 2 con el número SEQ ID 74, y con el código de secuencia de aminoácidos presentado como SEQ ID no. 75, opera unido a la primera y la segunda secuencias de proteínas de toxinas, y en línea entre ellas. La molécula de unión flexible permite que se pliegue apropiadamente cada proteína de toxina en la fusión y brinda una región de aminoácidos flexibles que permiten que cada proteína de toxina se una a su receptor respectivo. Las secuencias de proteínas fusionadas con una molécula de unión flexible son representadas por los SEQ ID NO 58, 64 y 70, y contienen las proteínas fusionadas presentadas como SEQ ID no. 59, 65 y 71.

[0224] Las proteínas fusionadas también pueden ser sintetizadas de cualquier proteína de clase proteína de toxina TIC7016 y TIC6280 para incrementar el espectro de actividad y brindar más modos de actividad contra un insecto plaga. La Tabla 16 muestra una colección de potenciales proteínas fusionadas que pueden derivarse de una secuencia de código TIC7016, TIC7017, TIC7108, TIC7110 o TIC7589 fusionadas con una secuencia de código TIC6280, TIC6281, TIC6282 o TIC6283.

Tabla 16. Proteínas de Fusión y Operadores Derivados de Proteínas de clase de Toxinas de Proteínas TIC6280 y TIC7016.

Proteínas fusionadas	Primera proteína	Molécula de unión	Segunda proteína	Proteínas fusionadas	Primera proteína	Molécula de unión	Segunda proteína
TIC7016-TIC6280F1	TIC7016	Ninguna	TIC6280	TIC7108-TIC6282F1	TIC7108	Ninguna	TIC6282
TIC7016-TIC6280F2	TIC7016	Enlazador 1	TIC6280	TIC7108-TIC6282F2	TIC7108	Enlazador 1	TIC6282
TIC7016-TIC6280F3	TIC7016	Enlazador 2	TIC6280	TIC7108-TIC6282F3	TIC7108	Enlazador 2	TIC6282
TIC7016-TIC6281F1	TIC7016	Ninguna	TIC6281	TIC7108-TIC6283F1	TIC7108	Ninguna	TIC6283
TIC7016-TIC6281F2	TIC7016	Enlazador	TIC6281	TIC7108-TIC6283F2	TIC7108	Enlazador	TIC6283

Proteínas fusionadas	Primera proteína	Molécula de unión	Segunda proteína	Proteínas fusionadas	Primera proteína	Molécula de unión	Segunda proteína
TIC6281F2		1		TIC6283F2		1	
TIC7016- TIC6281F3	TIC7016	Enlazador 2	TIC6281	TIC7108- TIC6283F3	TIC7108	Enlazador 2	TIC6283
TIC7016- TIC6282F1	TIC7016	Ninguna	TIC6282	TIC7110- TIC6280F1	TIC7110	Ninguna	TIC6280
TIC7016- TIC6282F2	TIC7016	Enlazador 1	TIC6282	TIC7110- TIC6280F2	TIC7110	Enlazador 1	TIC6280
TIC7016- TIC6282F3	TIC7016	Enlazador 2	TIC6282	TIC7110- TIC6280F3	TIC7110	Enlazador 2	TIC6280
TIC7016- TIC6283F1	TIC7016	Ninguna	TIC6283	TIC7110- TIC6281F1	TIC7110	Ninguna	TIC6281
TIC7016- TIC6283F2	TIC7016	Enlazador 1	TIC6283	TIC7110- TIC6281F2	TIC7110	Enlazador 1	TIC6281
TIC7016- TIC6283F3	TIC7016	Enlazador 2	TIC6283	TIC7110- TIC6281F3	TIC7110	Enlazador 2	TIC6281
TIC7017- TIC6280F1	TIC7017	Ninguna	TIC6280	TIC7110- TIC6282F1	TIC7110	Ninguna	TIC6282
TIC7017- TIC6280F2	TIC7017	Enlazador 1	TIC6280	TIC7110- TIC6282F2	TIC7110	Enlazador 1	TIC6282
TIC7017- TIC6280F3	TIC7017	Enlazador 2	TIC6280	TIC7110- TIC6282F3	TIC7110	Enlazador 2	TIC6282
TIC7017- TIC6281F1	TIC7017	Ninguna	TIC6281	TIC7110- TIC6283F1	TIC7110	Ninguna	TIC6283
TIC7017- TIC6281F2	TIC7017	Enlazador 1	TIC6281	TIC7110- TIC6283F2	TIC7110	Enlazador 1	TIC6283
TIC7017- TIC6281F3	TIC7017	Enlazador 2	TIC6281	TIC7110- TIC6283F3	TIC7110	Enlazador 2	TIC6283
TIC7017-	TIC7017	Ninguna	TIC6282	TIC7589-	TIC7589	Ninguna	TIC6280

Proteínas fusionadas	Primera proteína	Molécula de unión	Segunda proteína	Proteínas fusionadas	Primera proteína	Molécula de unión	Segunda proteína
TIC6282F1				TIC6280F1			
TIC7017-TIC6282F2	TIC7017	Enlazador 1	TIC6282	TIC7589-TIC6280F2	TIC7589	Enlazador 1	TIC6280
TIC7017-TIC6282F3	TIC7017	Enlazador 2	TIC6282	TIC7589-TIC6280F3	TIC7589	Enlazador 2	TIC6280
TIC7017-TIC6283F1	TIC7017	Ninguna	TIC6283	TIC7589-TIC6281F1	TIC7589	Ninguna	TIC6281
TIC7017-TIC6283F2	TIC7017	Enlazador 1	TIC6283	TIC7589-TIC6281F2	TIC7589	Enlazador 1	TIC6281
TIC7017-TIC6283F3	TIC7017	Enlazador 2	TIC6283	TIC7589-TIC6281F3	TIC7589	Enlazador 2	TIC6281
TIC7108-TIC6280F1	TIC7108	Ninguna	TIC6280	TIC7589-TIC6282F1	TIC7589	Ninguna	TIC6282
TIC7108-TIC6280F2	TIC7108	Enlazador 1	TIC6280	TIC7589-TIC6282F2	TIC7589	Enlazador 1	TIC6282
TIC7108-TIC6280F3	TIC7108	Enlazador 2	TIC6280	TIC7589-TIC6282F3	TIC7589	Enlazador 2	TIC6282
TIC7108-TIC6281F1	TIC7108	Ninguna	TIC6281	TIC7589-TIC6283F1	TIC7589	Ninguna	TIC6283
TIC7108-TIC6281F2	TIC7108	Enlazador 1	TIC6281	TIC7589-TIC6283F2	TIC7589	Enlazador 1	TIC6283
TIC7108-TIC6281F3	TIC7108	Enlazador 2	TIC6281	TIC7589-TIC6283F3	TIC7589	Enlazador 2	TIC6283

[0225] Las secuencias que contengan proteínas de clase de toxinas de proteínas TIC6280 y TIC7016 pueden ser utilizadas para crear operadores artificiales usados para expresión bacteriana que contenga dos proteínas de toxinas; la primera de ellas seleccionada de la clase de proteína de toxina TIC7016 y la

5 segunda seleccionada de clase de toxina de proteína TIC6280. La primera y segunda proteínas de

toxinas pueden ser seleccionadas entre las mismas especies bacterianas de las que fueron inicialmente aisladas, o pueden ser seleccionadas de especies bacterianas diferentes de las respectivas toxinas de las que fueron aisladas en primer lugar. Las dos secuencias pueden ser unidas por medio de un enlazador, por ejemplo, el enlazador operón presentado con el número SEQ ID 79. El enlazador operón contiene un codón de parada en el extremo 5' de la secuencia que permite que se termine la transcripción de la primera secuencia codificada de proteínas de toxinas. Los ejemplos de operadores derivados de proteínas de clase de proteínas de toxinas TIC7016 y TIC680 aislados de las mismas especies *Lysinibacillus sphaericus* son presentados en la Tabla 17.

Tabla 17. Secuencias de operadores representativas.

Secuencia de operador	Número de SEQ ID de nucleótido:	Primera proteína	Molécula de unión	Segunda proteína	Especies <i>Ls</i>
TIC7110-TIC6280operón	76	TIC7110	Enlazador operón	TIC6280	AG0067H07
TIC7111-TIC6282operón	77	TIC7111	Enlazador operón	TIC6282	AG0069H08
TIC7109-TIC6281operón	78	TIC7110	Enlazador operón	TIC6280	AG0067H03

[0226] Las secuencias de operadores artificiales también pueden derivar de secuencias codificadas de proteínas de toxinas derivadas de cualquier proteína de clase de toxinas de proteínas TIC6280 y TIC7016. La Tabla 18 muestra una colección de potenciales operadores artificiales que pueden derivarse de una secuencia de código TIC7016 o TIC7016, TIC7108, TIC7110 o TIC7589 fusionadas con una secuencia de código TIC6280, TIC6281, TIC6282 o TIC6283.

Tabla 18. Potenciales secuencias de operadores derivadas de una proteína de clase proteína de toxina TIC7016 y una proteína de clase proteína de toxina TIC6280.

Secuencia de operador	Primera proteína	Molécula de unión	Segunda proteína
-----------------------	------------------	-------------------	------------------

Secuencia de operador	Primera proteína	Molécula de unión	Segunda proteína
TIC7016- TIC6280operón	TIC7016	Enlazador operón	TIC6280
TIC7016- TIC6281operón	TIC7016	Enlazador operón	TIC6281
TIC7016- TIC6282operón	TIC7016	Enlazador operón	TIC6282
TIC7016- TIC6283operón	TIC7016	Enlazador operón	TIC6283
TIC7017- TIC6280operón	TIC7017	Enlazador operón	TIC6280
TIC7017- TIC6281operón	TIC7017	Enlazador operón	TIC6281
TIC7017- TIC6282operón	TIC7017	Enlazador operón	TIC6282
TIC7017- TIC6283operón	TIC7017	Enlazador operón	TIC6283
TIC7108- TIC6280operón	TIC7108	Enlazador operón	TIC6280
TIC7108- TIC6281operón	TIC7108	Enlazador operón	TIC6281
TIC7108- TIC6282operón	TIC7108	Enlazador operón	TIC6282
TIC7108- TIC6283operón	TIC7108	Enlazador operón	TIC6283
TIC7110- TIC6281operón	TIC7110	Enlazador operón	TIC6281
TIC7110- TIC6282operón	TIC7110	Enlazador operón	TIC6282

Secuencia de operador	Primera proteína	Molécula de unión	Segunda proteína
TIC7110- TIC6283operón	TIC7110	Enlazador operón	TIC6283
TIC7589- TIC6280operón	TIC7589	Enlazador operón	TIC6280
TIC7589- TIC6281operón	TIC7589	Enlazador operón	TIC6281
TIC7589- TIC6282operón	TIC7589	Enlazador operón	TIC6282
TIC7589- TIC6283operón	TIC7589	Enlazador operón	TIC6283

Ejemplo 9

TIC7016 es un activo contra Tisanópteros.

[0227] Este Ejemplo describe la evaluación biológica de la actividad de TIC7016 contra insectos plaga Thysanopteran por medio de preparaciones bacterianas de proteína TIC7016.

- 5 [0228] Las preparaciones de proteínas con histidina de proteína TIC7016, TIC7016-His (número SEQ ID 10) se brindan en una dieta de insectos y son utilizados para evaluar la actividad de TIC7016 contra las especies plaga Thysanopteran de tisanópteros Western Flower (*Frankliniella occidentalis*) y tisanópteros de tabaco (*Frankliniella fusca*). Dieciséis tisanópteros Western Flower y veintiún tisanópteros de tabaco se alimentan de la dieta de insectos durante diez días. El número de tisanópteros
- 10 vivos fue registrado en el primer, quinto, séptimo y décimo día luego de ser infestados, y se comparó a los controles en los que los tisanópteros se alimentaron con una dieta idéntica, pero sin toxinas. El porcentaje de mortalidad observado se presenta en la Tabla 19.

15 **Tabla 19. Porcentaje de mortalidad de tisanópteros luego de diez días de alimentación con dieta de TIC7016-His.**

	Tisanópteros Western Flower		Tisanópteros de tabaco	
Día	Defensa	TIC7016-His	Defensa	TIC7016- His
1	9,50 %	4,76 %	0,00 %	12,50 %
5	19,04 %	23,81 %	4,76 %	43,75 %
7	28,57 %	57,14 %	19,05 %	50,00 %
10	38,10 %	85,71 %	33,33 %	75,00 %

[0229] Como se puede ver en la Tabla 19, con respecto a los tisanópteros Western Flower, la actividad fue aparente a partir del séptimo y décimo día de alimentación. Para los tisanópteros de tabaco, la actividad fue aparente a partir del quinto, séptimo y décimo día de alimentación. La toxina de insectos

5 TIC7016 es un activo contra los insectos plaga Thysanopteran.

Ejemplo 10

TIC7016PL es un activo contra TPB (*Lygus lineolaris*) en plantas de algodón transformadas establemente.

[0230] Este Ejemplo describe la evaluación biológica de actividad de TIC7016PL contra el insecto plaga Hemiptera, TPB (*Lygus lineolaris*) por medio de plantas de algodón transformadas con proteína

10 TIC7016PL.

[0231] Las plantas de algodón fueron transformadas con dos vectores de transformación de plantas binarios (Creación 1 y Creación 2) utilizados para la expresión de la proteína TIC7016PL. Los eventos transformados del algodón R₁ fueron utilizados para evaluar la actividad contra el insecto plaga

15 Hemiptera, TPB (*Lygus lineolaris*). Los vectores de transformación binarios contenían un primer casete transgén utilizado para el promotor de plantas de proteína de toxina TIC7016PL, unido operablemente a 5' de un líder, a 5' de un intrón, a 5' de una secuencia codificada sintética utilizada para la proteína TIC7016PL en células de plantas (número SEQ ID 46), operablemente unidas de 5' a 3' UTR; y un

20 selección de espectinomicina.

[0232] Para evaluar la eficacia contra TPB (*Lygus lineolaris*), se unieron cinco semillas R₁ en recipientes de 10 pulgadas para cada evento de algodón transgénico. Se utilizó una variedad de algodón DP393 sin transformaciones como control negativo. Se mantuvo a las plantas en una cámara de ambiente con un foto-período de dieciséis (16) horas de luz a treinta y dos (32) grados Celsius y ocho (8) horas de oscuridad a veintitrés (23) grados Celsius, y una intensidad lumínica entre ochocientos (800) y novecientos (900) micro-Einsteins. A los cuarenta (40) a cuarenta y cinco (45) días de la plantación, las plantas individuales fueron colocadas en una jaula de hojas de plástico respirable «pollination» (Vilutis and Company Inc, Frankfort, IL). Las hojas fueron aseguradas a la raíz principal justo sobre la superficie del suelo mediante un amarre de Velcro®. Dos pares de *Lygus lineolaris* adultos (de seis días) sexualmente maduros de un cultivo de laboratorio fueron recogidos en un tubo plástico de fondo redondo de catorce milímetros (Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ) y utilizados para cada planta. Los adultos fueron colocados en cada jaula individual por medio de una hendidura pequeña en el costado de la jaula, y luego ésta fue cerrada firmemente para asegurar que los insectos no escapen. Se dejó a los insectos para aparearse; y las plantas fueron colocadas en la jaula durante veintiún (21) días.

[0233] Al día veintidós (22), se cortó a las plantas de las jaulas y se las movilizó al laboratorio, en el que los insectos de cada planta fueron recogidos y contados. Antes de abrir la jaula, se sacudió vigorosamente a las plantas para asegurar que todos los insectos se cayeran de sus sitios de alimentación hacia la base de la jaula. Luego, la base de la jaula fue abierta y todo el material de la planta se quitó y se colocó en una hoja negra. Se recolectó a los insectos por medio de un aspirador. Luego, se inspeccionó exhaustivamente la planta para recuperar cualquier insecto que pudiera continuar allí. El número de insectos recogidos y su etapa de desarrollo fueron registrados para cada planta. El conteo de insectos fue dividido en varios grupos en base al tamaño y la madurez del *Lygus*: larvas pequeñas, larvas grandes y adultos. La Tabla 20 y la Figura 1 muestran los resultados de la evaluación. En la Figura 1, las barras de error representan el error estándar del promedio (también presentadas como «SEM» en la Tabla 20).

Tabla 20. Promedio de *Lygus lineolaris* (TPB) recuperadas de plantas de algodón transformadas en jaulas con TIC7016PL.

Creación	Evento	Número de plantas	Promedio de larvas pequeñas	Promedio de larvas grandes	R ₁ Promedio de adultos	Total R ₁ Promedio	SEM
Creación 1	Evento 1	5	1,6	2	4,4	8	2,3022
	Evento 2	5	5,2	4,2	1,4	10,8	3,3377
Creación 2	Evento 3	5	2,6	3,2	0,8	6,6	2,358
Ninguna	Control negativo	10	11,3	8,9	5,1	25,3	2,9061

[0234] Como puede verse en la Tabla 20 y la Figura 1, la expresión de TIC7016PL en plantas de algodón transformadas establemente brinda resistencia a las TPB (*Lygus lineolaris*). Menos larvas y adultos TPB sobrevivieron en las plantas de algodón con TIC7016PL que en los controles.

[0235] La evaluación contra TPB Western (WTP, *Lygus hesperus*) también puede llevarse a cabo contra plantas de algodón transformadas establemente con proteína TIC7016PL como se describe más arriba.

Ejemplo 11

TIC7108PL, TIC7110PL, TIC7016PL y TIC7017PL son activos contra los gusanos de maíz Western en plantas de maíz transformadas establemente.

[0236] Este Ejemplo describe la evaluación biológica de actividad de TIC7017PL contra el insecto plaga Coleoptera, WCR (*Diabrotica virgifera virgifera*) en alimentación de raíces contra TIC7108PL, TIC7110PL, TIC7016PL y TIC7017PL con raíces de maíz.

[0237] Las plantas de maíz fueron transformadas con vectores de transformación de plantas binarios utilizados para TIC7108PL (Creación 3), TIC7110PL (Creación 4), TIC7016PL (Creación 5) y TIC7017PL (Creación 6 a 11). Los vectores de transformación binarios contenían un primer casete transgén utilizado para la expresión de TIC7108PL, TIC7110PL, TIC7016PL o TIC7017PL que

contenían un promotor de plantas, unido operablemente a 5' de una secuencia líder, a 5' de un intrón, a 5' de una secuencia codificada sintética TIC7108PL (número SEQ ID 50), TIC7110PL (número SEQ ID 52), TIC7016PL (número SEQ ID 46) o TIC7017PL (número SEQ ID 48), operablemente unidas de 5' a 3' UTR; y un segundo casete transgén utilizado para la selección de células de plantas transformadas por medio de selección de glifosato.

[0238] Las células de plantas de maíz fueron transformadas con el vector de transformación binario descrito anteriormente y se indujeron para formar eventos de planta R₀ transformadas totalmente. Los eventos transformados de simple y doble copia R₀ fueron seleccionados para la evaluación CRW. La evaluación de alimentación de raíz R₀ fue la descrita anteriormente en el Ejemplo 4, en el que los rangos de daño de raíces fueron evaluados por medio de una escala del 1 al 5, como se presenta en la Tabla 13 del Ejemplo 4. Las plantas de maíz no transformadas fueron utilizadas como control negativo. La Tabla 21 muestra el rango de daño de raíces promedio para cada vector binario de transformación en la creación y el control. Con respecto a los rangos de daños de raíces R₀ una puntuación de 1 a 3,5 indica actividad, mientras que una puntuación de 3,6 a 5 indica baja actividad o no actividad.

Tabla 21. Rango de daño de raíces para eventos transformados R₀ de TIC7108PL, TIC7110PL, TIC7016PL y TIC7017PL.

Creación	Toxina	RDR
Creación 3	TIC7108PL	3,4
Creación 4	TIC7110PL	3,5
Creación 5	TIC7016PL	3,3
Creación 6	TIC7017PL	2,6
Creación 7	TIC7017PL	3,4
Creación 8	TIC7017PL	3,4
Creación 9	TIC7017PL	3,3
Creación 10	TIC7017PL	3,4
Creación 11	TIC7017PL	3,4
Control negativo		3,8

[0239] Como puede verse en la Tabla 21, las plantas de maíz transformadas establemente TIC7108PL, TIC7110PL, TIC7016PL y TIC7017PL demostraron actividad contra el WCR (*Diabrotica virgifera virgifera*).

5 [0240] Todas las composiciones expuestas en este documento pueden ser creadas y ejecutadas sin experimentación indebida a la luz del presente descubrimiento. Mientras las composiciones de esta invención han sido descritas en términos de las representaciones ilustrativas anteriores, será aparente para los conocedores del tema que pueden aplicarse variaciones, cambios, modificaciones y alteraciones a las composiciones aquí descritas sin apartarse del verdadero concepto, espíritu y marco de la invención. Más específicamente, será aparente que ciertos agentes que estén tanto química como
10 fisiológicamente relacionados podrán ser sustituidos por los agentes aquí descritos mientras los mismos o similares resultados sean alcanzados. Todas estas sustituciones y modificaciones aparentes para los conocedores del tema se consideran dentro del espíritu, marco y concepto de la invención como se define en los puntos adjuntos.

15 [0241] Todas las publicaciones y documentos de patente publicados que sean citados en las especificaciones son incorporados a este documento con referencia al mismo alcance como si cada publicación o aplicación de patente individual fuera incorporada.