TÍTULO DE LA INVENCIÓN

PROTEÍNAS INHIBIDORAS DE INSECTOS NOVEDOSAS

REFERENCIAS A SOLICITUDES RELACIONADAS

[001] La presente solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional estadounidense n.° 62/736,236, presentada el 25 de setiembre de 2018, que se incorpora a la presente como referencia en su totalidad.

INCORPORACIÓN DEL LISTADO DE SECUENCIAS

[002] El archivo denominado “MONS465wo-sequence_listing.txt” que contiene una forma legible por computadora del Listado de Secuencias se creó el 24 de setiembre de 2019. Este archivo tiene 456 kilobytes (medidos en MS-Windows®) se presenta simultáneamente mediante presentación electrónica (usando el sistema de presentación EFS-Web de la Oficina de Patentes de los Estados Unidos), y se incorpora en su totalidad mediante esta referencia.

CAMPO DE LA INVENCIÓN

[003] La invención hace referencia, en términos generales, al campo de las proteínas inhibidoras de insectos. Se describe una clase novedosa de proteínas que presenta actividad inhibidora de insectos contra plagas relevantes en la agricultura de plantas de cultivo y semillas. En particular, las proteínas son activas de manera insecticida contra plagas relevantes en la agricultura de plantas de cultivo y semillas, particularmente las especies de coleópteros y lepidópteros de plagas de insectos. Se proporcionan plantas, partes de plantas, y semillas que contienen una construcción de polinucleótidos recombinantes que codifican una o más de las proteínas de toxinas descritas.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

[004] Mejorar el rendimiento de cultivos de plantas significativas en la agricultura que incluyen, entre otros, maíz, soja, caña de azúcar, arroz, trigo, vegetales, y algodón, se ha vuelto cada vez más importante. Además de la necesidad creciente de productos agrícolas para alimentar, vestir y proporcionar energía para una población humana en aumento, se predice que los efectos relacionados con el clima y la presión de la población creciente para usar tierras en prácticas que no sean prácticas agrícolas reducirán la cantidad de tierra cultivable disponible para la agricultura. Esos factores han conducido a pronósticos desalentadores de seguridad alimenticia, particularmente en ausencia de grandes mejoras en biotecnología vegetal y prácticas agronómicas. En vista de estas presiones, las mejoras ambientalmente sustentables en la tecnología, las técnicas agrícolas, y el manejo de plagas son herramientas vitales para expandir la producción de cultivos en la cantidad limitada de tierras cultivables y disponibles para la agricultura.

[005] Se considera que los insectos, particularmente insectos dentro de los órdenes de lepidópteros, coleópteros, y hemípteros, son una causa importante de daño a los cultivos de campo, lo que disminuye los rendimientos de cultivos en áreas infestadas. Históricamente, se ha confiado en la aplicación intensiva de insecticidas químicos sintéticos como agente de control de plagas en la agricultura. Las preocupaciones por el medio ambiente y la salud humana, además de problemas de resistencia emergentes, estimularon la investigación y desarrollo de pesticidas biológicos. Este esfuerzo de investigación dio lugar al descubrimiento y uso progresivo de varias especies microbianas entomopatogénicas, que incluyen bacterias.

[006] El paradigma de control biológico cambió cuando se descubrieron y se desarrollaron las bacterias entomopatogénicas potenciales, especialmente las bacterias que pertenecen al género *Bacillus*, como un agente de control de plagas biológico. Las cepas de la bacteria *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) se han utilizado como fuente de proteínas pesticidas ya que se descubrió que las cepas de *Bt* muestran toxicidad alta contra insectos específicos. Se sabe que las cepas de *Bt* producen endotoxinas delta que se localizan dentro de los cuerpos de inclusión cristalina paraesporal en el comienzo de la esporulación y durante la fase de crecimiento estacionaria (por ejemplo, proteínas Cry), y también se sabe que producen proteína insecticida secretada. Tras la ingestión por parte de un insecto susceptible, las

endotoxinas delta así como también las toxinas secretadas ejercen sus efectos en la superficie del epitelio del intestino medio, afectando la membrana celular, lo que provoca la ruptura y muerte celular. También se han identificados genes que codifican proteínas insecticidas en especies bacterianas diferentes a *Bt*, que incluyen otros *Bacillus* y una diversidad de especies bacterianas adicionales, tales como *Brevibacillus laterosporus*, *Lysinibacillus sphaericus* ("*Ls*" conocidas anteriormente como *Bacillus sphaericus*), *Paenibacillus popilliae*, *Photorabdus* y *Xenorabdus*.

[007] Las toxinas insecticidas solubles cristalinas y secretadas son altamente específicas para sus hospedadores y han ganado aceptación a nivel mundial como alternativas a los insecticidas químicos. Por ejemplo, las proteínas de toxinas insecticidas se han empleado en varias aplicaciones agrícolas para proteger plantas importantes en la agricultura de infestaciones de insectos, reducir la necesidad de aplicaciones de pesticidas químicos, y aumentar los rendimientos. Las proteínas de toxinas insecticidas se usan para controlar plagas relevantes en la agricultura de plantas de cultivo mediante métodos mecánicos, tales como pulverización para dispersar formulaciones microbianas que contienen varias cepas de bacterias en las 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.

[008] Se ha adaptado globalmente el uso de plantas transgénicas que expresan las proteínas de toxinas insecticidas. Por ejemplo, en 2012, se plantaron 26,1 millones de hectáreas con cultivos transgénicos que expresan las toxinas de *Bt* (James, C., Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2012. ISAAA Resumen n.° 44). El uso global de cultivos transgénicos protegidos contra insectos y la cantidad limitada de proteínas de toxinas insecticidas usadas en estos cultivos ha creado una presión de selección de alelos de insectos existentes que impartan resistencia a las proteínas insecticidas utilizadas actualmente.

[009] El desarrollo de resistencia en plagas objetivo a proteínas de toxinas insecticidas crea la necesidad continua del descubrimiento y desarrollo de nuevas formas de proteínas de

toxinas insecticidas que son útiles para manejar el aumento de la resistencia a insectos en cultivos transgénicos que expresan las proteínas de toxinas insecticidas. Las toxinas de proteínas nuevas con eficacia mejorada y que exhiben control en un espectro más amplio de especies de insectos susceptibles reducirá la cantidad de insectos sobrevivientes que pueden desarrollar alelos de resistencia. Además, el uso en una planta de dos o más proteínas de toxinas insecticidas transgénicas tóxicas para la misma plaga de insectos y que presenta diferentes modos de acción reduce la probabilidad de resistencia en cualquier especie de insecto objetivo individual.

[0010] Por lo tanto, los inventores en la presente describen una familia de toxinas de proteínas de *Xenorhabdus* y *Photorhabdus* junto con proteínas de toxinas similares, variantes de proteínas, y proteínas recombinantes de ejemplo que exhiben actividad insecticida contra especies de plagas de lepidópteros, coleópteros, y hemípteros objetivo.

COMPENDIO DE LA INVENCIÓN

[0011] En la presente se describe un grupo de proteínas pesticidas con actividad inhibidora de insectos (proteínas de toxinas), denominadas en la presente toxinas de proteínas PirAB (relacionadas con el insecto *Photorhabdus*), que se demostró que exhibieron actividad inhibidora contra uno o más plagas de plantas de cultivo. Las proteínas en la clase de toxinas de proteínas PirAB se pueden usar solas, o como fusiones de una proteína PirA y una proteína PirB, o en combinación con otras proteínas insecticidas y agentes tóxicos en formulaciones e *in planta*, lo que proporciona alternativas a las proteínas insecticidas y químicas de insecticidas actualmente en uso en sistemas agrícolas.

[0012] En una modalidad, en la presente solicitud se describe una molécula de ácido nucleico recombinante que comprende un promotor heterólogo unido de manera operativa a un segmento de polinucleótido que codifica una proteína pesticida o fragmento de esta, donde: (a) dicha proteína pesticida comprende la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO:2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 105, 107, 109,

111, 113, 115, 117, 119, 121, 123, 125, 127, 129, 131, 133, 135, 137, 139, 141, 143, 145, 147, 149, 151, 153, 155, o 157; o (b) dicha proteína pesticida comprende una secuencia de aminoácidos que tiene: (i) al menos 65 % de identidad con las SEQ ID NO:44, 46, 48, 123, 127, 129, 131, 133, y 145; o (ii) al menos 70 % de identidad con las SEQ ID NO:109, 121, y 125; o (iii) al menos 80 % de identidad con las SEQ ID NO: 12, 18, 24, 36, 42, 62, 68, 74, 80, 86, 98, 113, 117, 119, 147, 149, 153, 155, y 157; o (iv) al menos 82 % de identidad con las SEQ ID NO:30, 92, 111, 115, y 151; o (v) al menos 86 % de identidad con las SEQ ID NO:6 y 50; o (vi) al menos 94 % de identidad con las SEQ ID NO:137 y 141; o (vii) al menos 97 % de identidad con las SEQ ID NO:4, 26, y 32; o (viii) al menos 98 % de identidad con las SEQ ID NO:2, 28, 34, 102, y 102; o (ix) al menos 99 % de identidad con la SEQ ID NO:135; o (x) 100 % de identidad con las SEQ ID NO:8, 10, 14, 16, 20, 22, 38, 40, 58, 60, 64, 66, 70, 72, 76, 78, 82, 84, 88, 90, 94, 96, 100, 105, 107, 139, y 143; o (c) dicho segmento de polinucleótido se hibrida con un polinucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos de las SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 104, 106, 108, 110, 112, 114, 116, 118, 120, 122, 124, 126, 128, 130, 132, 134, 136, 138, 140, 142, 144, 146, 148, 150, 152, 154, 156, o 158; o (d) dicha molécula de ácido nucleico recombinante se encuentra en enlace operativo con un vector, y dicho vector se selecciona del grupo que consiste en un plásmido, fagémido, bácmido, cósmido, y un cromosoma artificial bacteriano o de levadura. La molécula de ácido nucleico recombinante puede comprender una secuencia que funciona para expresar la proteína pesticida en una planta; o se expresa en una célula vegetal para producir una cantidad eficaz de manera pesticida de la proteína pesticida.

[0013] En otra modalidad de la presente solicitud son células hospedadoras que comprenden una molécula de ácido nucleico recombinante de la solicitud, donde la célula hospedadora se selecciona del grupo que consiste en una célula bacteriana y una célula vegetal. Las células hospedadoras contempladas incluyen *Agrobacterium, Rhizobium*, *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Pantoea,* y *Erwinia*. En determinadas modalidades, dicha especie *Bacillus* es *Bacillus cereus* o *Bacillus thuringiensis*, dicha *Brevibacillus* es *Brevibacillus laterosperus*, o dicha *Escherichia* es *Escherichia coli*. Las células hospedadoras

contempladas incluyen una célula dicotiledónea y una célula monocotiledónea. Las células hospedadoras de plantas contempladas adicionalmente incluyen una célula vegetal de alfalfa, banana, cebada, judía, brócoli, repollo, Brassica, zanahoria, mandioca, ricino, coliflor, apio, garbanzo, col de China, planta cítrica, coco, café, maíz, trébol, algodón (*Gossypium sp.*), una cucurbitácea, pepino, abeto de Douglas, berenjena, eucaliptus, lino, ajo, uva, lúpulo, puerro, lechuga, pino bronco, mijo, melones, nuez, avena, oliva, cebolla, plantas ornamentales, palmera, pasto de pastura, guisante, cacahuate, pimiento, guandú, pino, patata, álamo, calabaza, pino insigne, rabanito, colza, arroz, rizomas, centeno, cártamo, arbusto, sorgo, pino sureño, soja, espinaca, zapallo, fresa, remolacha azucarera, caña de azúcar, girasol, maíz dulce, liquidámbar, boniato, pasto varilla, té, tabaco, tomate, triticale, césped, sandia y trigo.

[0014] En aun otra modalidad, la proteína pesticida exhibe actividad contra un insecto coleóptero, que incluye gusano de la raíz del maíz occidental, gusano de la raíz del maíz del sur, gusano de la raíz del maíz del norte, gusano de la raíz del maíz mexicano, gusano de la raíz del maíz brasileño, escarabajo de la patata, complejo del gusano de la raíz del maíz brasileño que consiste en *Diabrotica viridula* y *Diabrotica speciosa*, pulguilla de las crucíferas, pulguilla rayada, y pulguilla negra.

[0015] En otra modalidad, la proteína pesticida exhibe actividad contra un insecto lepidóptero, que incluye gusano cortador negro, gusano del maíz, palomilla dorso de diamante, barrenador europeo del maíz, cogollero del maíz, oruga militar del sur, gusano falso medidor, barrenador del maíz del suroeste, oruga del tabaco, oruga de las leguminosas, barrenador de la caña de azúcar, barrenador menor del maíz, gusano soldado, gardama, oruga del Viejo Mundo, gusano del algodón, o gusano rosado.

[0016] En aun otra modalidad, la proteína pesticida exhibe actividad contra una especie de insectos de orden de hemípteros, que incluye chinche verde, chinche marrón, chinche verde, chinche marrón, chinche de la alfalfa, especies de chinches de abdomen verde y dorso negro, chinche marrón con alas, chinche marrón, chinche verde, chinche marrón marmoleada, chinche del triángulo, o chinche ligus.

[0017] En la presente solicitud también se contemplan plantas que comprenden una molécula de ácido nucleico recombinante que comprende un promotor heterólogo unido de manera operativa a un segmento de polinucleótido que codifica una proteína pesticida o fragmento de esta, donde: (a) dicha proteína pesticida comprende la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO:2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 105, 107, 109, 111, 113, 115, 117, 119, 121, 123, 125, 127, 129, 131, 133, 135, 137, 139, 141, 143, 145, 147, 149, 151, 153, 155, o 157; o (b) dicha proteína pesticida comprende una secuencia de aminoácidos que tiene: (i) al menos 65 % de identidad con las SEQ ID NO:44, 46, 48, 123, 127, 129, 131, 133, y 145; o (ii) al menos 70 % de identidad con las SEQ ID NO:109, 121, y 125; o (iii) al menos 80 % de identidad con las SEQ ID NO: 12, 18, 24, 36, 42, 62, 68, 74, 80, 86, 98, 113, 117, 119, 147, 149, 153, 155, y 157; o (iv) al menos 82 % de identidad con las SEQ ID NO:30, 92, 111, 115, y 151; o (v) al menos 86 % de identidad con las SEQ ID NO:6 y 50; o (vi) al menos 94 % de identidad con las SEQ ID NO:137 y 141; o (vii) al menos 97 % de identidad con las SEQ ID NO:4, 26, y 32; o (viii) al menos 98 % de identidad con las SEQ ID NO:2, 28, 34, 102, y 102; o (ix) al menos 99 % de identidad con la SEQ ID NO:135; o (x) 100 % de identidad con las SEQ ID NO:8, 10, 14, 16, 20, 22, 38, 40, 58, 60, 64, 66, 70, 72, 76, 78, 82, 84, 88, 90, 94, 96, 100, 105, 107, 139, y 143; o (c) dicho segmento de polinucleótido se hibrida en condiciones rigurosas de hibridación con el complemento de la secuencia de nucleótidos de las SEQ ID NO: 49, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 146, 148, 150, 152, 154, 156, o 158; o (d) dicha planta exhibe una cantidad detectable de dicha proteína pesticida. En determinadas modalidades, la proteína pesticida comprende las SEQ ID NO:2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 105, 107, 109, 111, 113, 115, 117, 119, 121, 123, 125, 127, 129, 131, 133, 135, 137, 139, 141, 143, 145, 147, 149, 151, 153, 155, o 157. En una modalidad, la planta es una monocotiledónea o una dicotiledónea. En otra modalidad, la planta se selecciona del grupo que consiste en una alfalfa, banana, cebada, judía, brócoli, repollo, Brassica, zanahoria, mandioca, ricino, coliflor, apio, garbanzo, col de China, planta cítrica, coco, café, maíz, trébol, algodón, una cucurbitácea, pepino, abeto de Douglas, berenjena, eucaliptus, lino, ajo, uva, lúpulo, puerro, lechuga, pino bronco, mijo, melones, nuez, avena, oliva, cebolla, plantas

ornamentales, palmera, pasto de pastura, guisante, cacahuate, pimiento, guandú, pino, patata, álamo, calabaza, pino insigne, rabanito, colza, arroz, rizomas, centeno, cártamo, arbusto, sorgo, pino sureño, semilla de soja, espinaca, zapallo, fresa, remolacha azucarera, caña de azúcar, girasol, maíz dulce, liquidámbar, boniato, pasto varilla, té, tabaco, tomate, triticale, césped, sandía y trigo.

[0018] En modalidades adicionales, se describen semillas que comprenden las moléculas de ácido nucleico.

[0019] En otra modalidad, se contempla una composición inhibidora de insectos que comprende las moléculas de ácido nucleico recombinante descritas en la presente solicitud. La composición inhibidora de insectos puede comprender además una secuencia de nucleótidos que codifica al menos otro agente pesticida que sea diferente de dicha proteína pesticida. El al menos otro agente pesticida se selecciona del grupo que consiste en una proteína inhibidora de insectos, una molécula de ARNcd inhibidora de insectos, y una proteína auxiliar. El al menos otro agente pesticida en la composición inhibidora de insectos exhibe actividad contra una o más especies de plagas de los órdenes de lepidópteros, coleópteros, y hemípteros. El al menos un agente pesticida diferente en la composición inhibidora de insectos en una modalidad se selecciona del grupo que consiste en: Cry1A, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1A.105, Cry1Ae, Cry1B, Cry1C, variantes de Cry1C, Cry1D, Cry1E, Cry1F, quimeras de Cry1A/F, Cry1G, Cry1H, Cry1I, Cry1J, Cry1K, Cry1L, Cry2A, Cry2Ab, Cry2Ae, Cry3, variantes de Cry3A, Cry3B, Cry4B, Cry6, Cry7, Cry8, Cry9, Cry15, Cry34, Cry35, Cry43A, Cry43B, Cry51Aa1, ET29, ET33, ET34, ET35, ET66, ET70, TIC400, TIC407, TIC417, TIC431, TIC800, TIC807, TIC834, TIC853, TIC900, TIC901, TIC1201, TIC1415, TIC2160, TIC3131, TIC836, TIC860, TIC867, TIC869, TIC1100, VIP3A, VIP3B, VIP3Ab, AXMI-AXMI-, 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-207, 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-335,AXMI-R1 y variantes de estos, IP3 y variantes de estos, DIG-3, DIG-5, DIG-10, DIG-657 DIG-11, Cry71Aa1, Cry72Aa1, variantes de PHI-4, variantes de PIP-72, variantes de PIP-45, variantes de PIP-64, variantes de PIP-74,

variantes de PIP-75, variantes de PIP-77, Axmi422, Dig-305, Axmi440, variantes de PIP-47, Axmi281, BT-009, BT-0012, BT-0013, BT-0023, BT0067, BT-0044, BT-0051, BT-0068, BT-0128, DIG-17, DIG-90, DIG-79, Cry1JP578V, Cry1JPS1, y Cry1 JPS1P578V.

[0020] Se contemplan los productos básicos que comprenden una cantidad detectable de las moléculas de ácido nucleico recombinante descritas en la presente solicitud. Dichos productos básicos incluyen maíz básico embolsado por un gestor de granos, copos de maíz, tortas de maíz, maicena, harina de maíz, jarabe de maíz, aceite de maíz, ensilado de maíz, almidón de maíz, cereal de maíz, y similares, y productos básicos de algodón correspondientes tales como semilla de algodón entera o procesada, aceite de algodón, hebra, semillas y partes de plantas procesadas para pienso o alimento, fibra, papel, biomasas, y productos de combustible tal como combustible derivado de aceite de algodón o sedimentos derivados de desechos de la desmotadora de algodón, y productos básicos de soja correspondientes tales como semilla de soja entera o procesada, aceite de soja, proteína de soja, harina de soja, copos de soja, salvado de soja, leche de soja, queso de soja, vino de soja, pienso de animales que comprende soja, papel que comprende soja, crema que comprende soja, biomasa de soja, y productos de combustible producidos usando plantas de soja y partes de plantas de soja, y productos básicos de arroz, trigo, sorgo, guandú, cacahuate, fruta, melón, y vegetal correspondientes que incluyen, cuando corresponda, jugos, concentrados, mermeladas, jaleas, y otras formas comestibles de dichos productos básicos que contienen una cantidad detectable de dichos polinucleótidos o polipéptidos de la presente solicitud.

[0021] También se contempla en la presente solicitud un método para producir semilla que comprende las moléculas de ácido nucleico recombinante descritas en la presente solicitud. El método comprende plantar al menos una de la semilla que comprende las moléculas de ácido nucleico recombinante descritas en la presente solicitud; cultivar la planta a partir de la semilla; y cosechar la semilla de las plantas, donde la semilla cosechada comprende las moléculas de ácido nucleico recombinante en la presente solicitud.

[0022] En otra modalidad ilustrativa, se proporciona una planta resistente a infestación de insectos, donde las células de dicha planta comprenden: (a) una molécula de ácido nucleico

recombinante que codifica una cantidad eficaz de manera insecticida de una proteína pesticida tal como se establece en las SEQ ID NO:2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 105, 107, 109, 111, 113, 115, 117, 119, 121, 123, 125, 127, 129, 131, 133, 135, 137, 139, 141, 143, 145, 147, 149, 151, 153, 155, o 157; o (b) dicha proteína pesticida comprende una secuencia de aminoácidos que tiene: (i) al menos 65 % de identidad con las SEQ ID NO:44, 46, 48, 123, 127, 129, 131, 133, y 145; o (ii) al menos 70 % de identidad con las SEQ ID NO:109, 121, y 125; o (iii) al menos 80 % de identidad con las SEQ ID NO: 12, 18, 24, 36, 42, 62, 68, 74, 80, 86, 98, 113, 117, 119, 147, 149, 153, 155, y 157; o (iv) al menos 82 % de identidad con las SEQ ID NO:30, 92, 111, 115, y 151; o (v) al menos 86 % de identidad con las SEQ ID NO:6 y 50; o (vi) al menos 94 % de identidad con las SEQ ID NO:137 y 141; o (vii) al menos 97 % de identidad con las SEQ ID NO:4, 26, y 32; o (viii) al menos 98 % de identidad con las SEQ ID NO:2, 28, 34, 102, y 102; o (ix) al menos 99 % de identidad con la SEQ ID NO:135; o (x) 100 % de identidad con las SEQ ID NO:8, 10, 14, 16, 20, 22, 38, 40, 58, 60, 64, 66, 70, 72, 76, 78, 82, 84, 88, 90, 94, 96, 100, 105, 107, 139, y 143.

[0023] En la presente solicitud también se describen métodos para controlar una plaga de especies de coleópteros o lepidópteros, y controlar una infestación por plaga de especies de coleópteros o lepidópteros de una planta, particularmente una planta de cultivo. El método comprende, en una modalidad, (a) poner en contacto la plaga con una cantidad eficaz de manera insecticida de una o más proteínas pesticidas tal como se establece en las SEQ ID NO:2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 105, 107, 109, 111, 113, 115, 117, 119, 121, 123, 125, 127, 129, 131, 133, 135, 137, 139, 141, 143, 145, 147, 149, 151, 153, 155, o 157; o (b) dicha proteína pesticida comprende una secuencia de aminoácidos que tiene: (i) al menos 65 % de identidad con las SEQ ID NO:44, 46, 48, 123, 127, 129, 131, 133, y 145; o (ii) al menos 70 % de identidad con las SEQ ID NO:109, 121, y 125; o (iii) al menos 80 % de identidad con las SEQ ID NO: 12, 18, 24, 36, 42, 62, 68, 74, 80, 86, 98, 113, 117, 119, 147, 149, 153, 155, y 157; o (iv) al menos 82 % de identidad con las SEQ ID NO:30, 92, 111, 115, y 151; o (v) al menos 86 % de identidad con las SEQ ID NO:6 y

50; o (vi) al menos 94 % de identidad con las SEQ ID NO:137 y 141; o (vii) al menos 97 % de identidad con las SEQ ID NO:4, 26, y 32; o (viii) al menos 98 % de identidad con las SEQ ID NO:2, 28, 34, 102, y 102; o (ix) al menos 99 % de identidad con la SEQ ID NO:135; o (x) 100 % de identidad con las SEQ ID NO:8, 10, 14, 16, 20, 22, 38, 40, 58, 60, 64, 66, 70, 72, 76, 78, 82, 84, 88, 90, 94, 96, 100, 105, 107, 139, y 143.

[0024] En la presente se proporciona adicionalmente un método para detectar la presencia de una molécula de ácido nucleico recombinante que comprende un segmento de polinucleótidos que codifica una proteína pesticida o fragmento de este, donde: (a) dicha proteína pesticida comprende la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO:2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 105, 107, 109, 111, 113, 115, 117, 119, 121, 123, 125, 127, 129, 131, 133, 135, 137, 139, 141, 143, 145, 147, 149, 151, 153, 155, o 157; o (b) dicha proteína pesticida comprende una secuencia de aminoácidos que tiene: (i) al menos 65 % de identidad con las SEQ ID NO:44, 46, 48, 123, 127, 129, 131, 133, y 145; o (ii) al menos 70 % de identidad con las SEQ ID NO:109, 121, y 125; o (iii) al menos 80 % de identidad con las SEQ ID NO: 12, 18, 24, 36, 42, 62, 68, 74, 80, 86, 98, 113, 117, 119, 147, 149, 153, 155, y 157; o (iv) al menos 82 % de identidad con las SEQ ID NO:30, 92, 111, 115, y 151; o (v) al menos 86 % de identidad con las SEQ ID NO:6 y 50; o (vi) al menos 94 % de identidad con las SEQ ID NO:137 y 141; o (vii) al menos 97 % de identidad con las SEQ ID NO:4, 26, y 32; o (viii) al menos 98 % de identidad con las SEQ ID NO:2, 28, 34, 102, y 102; o (ix) al menos 99 % de identidad con la SEQ ID NO:135; o (x) 100 % de identidad con las SEQ ID NO:8, 10, 14, 16, 20, 22, 38, 40, 58, 60, 64, 66, 70, 72, 76, 78, 82, 84, 88, 90, 94, 96, 100, 105, 107, 139, y 143; o (c) dicho segmento de polinucleótido se hibrida con un polinucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos de las SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 104, 106, 108, 110, 112, 114, 116, 118, 120, 122, 124, 126, 128, 130, 132, 134, 136, 138, 140, 142, 144, 146, 148, 150, 152, 154, 156, o 158. En una modalidad de la invención, el método comprende poner en contacto una muestra de ácidos nucleicos con una sonda de ácido nucleico que se hibrida en condiciones de hibridación rigurosas con ADN genómico de una planta que comprende un

segmento de polinucleótidos que codifica una proteína pesticida o fragmento de esta proporcionado en la presente, y no se hibrida en dichas condiciones de hibridación con ADN genómico de una planta de otro modo isogénica que no comprende el segmento, donde la sonda es homóloga o complementaria con las SEQ ID NO: 49, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 146, 148, 150, 152, 154, 156, o 158, o una secuencia que codifica una proteína pesticida que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene: (i) al menos 65 % de identidad con las SEQ ID NO:44, 46, 48, 123, 127, 129, 131, 133, y 145; o (ii) al menos 70 % de identidad con las SEQ ID NO:109, 121, y 125; o (iii) al menos 80 % de identidad con las SEQ ID NO: 12, 18, 24, 36, 42, 62, 68, 74, 80, 86, 98, 113, 117, 119, 147, 149, 153, 155, y 157; o (iv) al menos 82 % de identidad con las SEQ ID NO:30, 92, 111, 115, y 151; o (v) al menos 86 % de identidad con las SEQ ID NO:6 y 50; o (vi) al menos 94 % de identidad con las SEQ ID NO:137 y 141; o (vii) al menos 97 % de identidad con las SEQ ID NO:4, 26, y 32; o (viii) al menos 98 % de identidad con las SEQ ID NO:2, 28, 34, 102, y 102; o (ix) al menos 99 % de identidad con la SEQ ID NO:135; o (x) 100 % de identidad con las SEQ ID NO:8, 10, 14, 16, 20, 22, 38, 40, 58, 60, 64, 66, 70, 72, 76, 78, 82, 84, 88, 90, 94, 96, 100, 105, 107, 139, y 143. El método puede comprender además (a) someter la muestra y sonda a condiciones de hibridación rigurosas; y (b) detectar la hibridación de la sonda con ADN de la muestra.

[0025] La invención también proporciona métodos para detectar la presencia de una proteína pesticida o fragmento de esta en una muestra que comprende la proteína, donde dicha proteína pesticida comprende la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO:2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 105, 107, 109, 111, 113, 115, 117, 119, 121, 123, 125, 127, 129, 131, 133, 135, 137, 139, 141, 143, 145, 147, 149, 151, 153, 155, o 157; o dicha proteína pesticida comprende una secuencia de aminoácidos que tiene: (i) al menos 65 % de identidad con las SEQ ID NO:44, 46, 48, 123, 127, 129, 131, 133, y 145; o (ii) al menos 70 % de identidad con las SEQ ID NO:109, 121, y 125; o (iii) al menos 80 % de identidad con las SEQ ID NO: 12, 18, 24, 36, 42, 62, 68, 74, 80, 86, 98, 113, 117, 119, 147, 149, 153, 155, y 157; o (iv) al menos 82 % de identidad con las SEQ ID NO:30, 92, 111, 115, y 151; o (v) al menos 86 % de identidad con las SEQ ID NO:6 y 50; o (vi) al menos 94 % de identidad con las SEQ ID NO:137 y 141; o (vii) al menos 97 % de identidad con las

SEQ ID NO:4, 26, y 32; o (viii) al menos 98 % de identidad con las SEQ ID NO:2, 28, 34, 102, y 102; o (ix) al menos 99 % de identidad con la SEQ ID NO:135; o (x) 100 % de identidad con las SEQ ID NO:8, 10, 14, 16, 20, 22, 38, 40, 58, 60, 64, 66, 70, 72, 76, 78, 82, 84, 88, 90, 94, 96, 100, 105, 107, 139, y 143. En una modalidad, el método comprende: (a) poner en contacto una muestra con un anticuerpo inmunorreactivo; y (b) detectar la unión del anticuerpo a la proteína pesticida o fragmento de esta, donde la unión indica la presencia de la proteína. En algunas modalidades, la etapa de detección comprende un ELISA o análisis de transferencia Western.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS SECUENCIAS

[0026] La SEQ ID NO:1 es una secuencia de ácido nucleico obtenida de *Xenorhabdus nematophila* cepa ISB000002 que codifica una secuencia de proteína pesticida PirA TIC4771.

[0027] La SEQ ID NO:2 es la secuencia de aminoácidos de la proteína PirA TIC4771.

[0028] La SEQ ID NO:3 es una secuencia de ácido nucleico obtenida de *Xenorhabdus nematophila* cepa ISB000002 que codifica una secuencia de proteína pesticida PirB TIC4772.

[0029] La SEQ ID NO:4 es la secuencia de aminoácidos de la proteína PirB TIC4472.

[0030] La SEQ ID NO:5 es una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión PirAB, TIC6880 compuesta por las secuencias de codificación TIC4771 y TIC4772 en enlace operativo y en marco.

[0031] La SEQ ID NO:6 es la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión PirAB TIC6880.

[0032] La SEQ ID NO:7 es una secuencia de ácido nucleico obtenida de *Xenorhabdus ehlersii* cepa 85823 que codifica una secuencia de proteína pesticida PirA TIC7575.

[0033] La SEQ ID NO:8 es la secuencia de aminoácidos de la proteína PirA TIC7575.

[0034] La SEQ ID NO:9 es una secuencia de ácido nucleico obtenida de *Xenorhabdus ehlersii* cepa 85823 que codifica una secuencia de proteína pesticida PirB TIC7576.

[0035] La SEQ ID NO:10 es la secuencia de aminoácidos de la proteína PirB TIC7576.

[0036] La SEQ ID NO:11 es una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión PirAB, TIC9316 compuesta por las secuencias de codificación TIC7575 y TIC7576 en enlace operativo y en marco.

[0037] La SEQ ID NO:12 es la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión PirAB TIC9316.

[0038] La SEQ ID NO:13 es una secuencia de ácido nucleico obtenida de *Xenorhabdus cabanillasii* cepa 85908 que codifica una secuencia de proteína pesticida PirA TIC7660.

[0039] La SEQ ID NO:14 es la secuencia de aminoácidos de la proteína PirA TIC7660.

[0040] La SEQ ID NO:15 es una secuencia de ácido nucleico obtenida de *Xenorhabdus cabanillasii* cepa 85908 que codifica una secuencia de proteína pesticida PirB TIC7661.

[0041] La SEQ ID NO:16 es la secuencia de aminoácidos de la proteína PirB TIC7661.

[0042] La SEQ ID NO:17 es una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión PirAB, TIC9317 compuesta por las secuencias de codificación TIC7660 y TIC7661 en enlace operativo y en marco.

[0043] La SEQ ID NO:18 es la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión PirAB TIC9317.

[0044] La SEQ ID NO:19 es una secuencia de ácido nucleico obtenida de *Xenorhabdus ehlersii* cepa 85887 que codifica una secuencia de proteína pesticida PirA TIC7662.

[0045] La SEQ ID NO:20 es la secuencia de aminoácidos de la proteína PirA TIC7662.

[0046] La SEQ ID NO:21 es una secuencia de ácido nucleico obtenida de *Xenorhabdus ehlersii* cepa 85887 que codifica una secuencia de proteína pesticida PirB TIC7663.

[0047] La SEQ ID NO:22 es la secuencia de aminoácidos de la proteína PirB TIC7663.

[0048] La SEQ ID NO:23 es una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión PirAB, TIC9318 compuesta por las secuencias de codificación TIC7662 y TIC7663 en enlace operativo y en marco.

[0049] La SEQ ID NO:24 es la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión PirAB TIC9318.

[0050] La SEQ ID NO:25 es una secuencia de ácido nucleico obtenida de *Xenorhabdus poinarii* cepa 86198 que codifica una secuencia de proteína pesticida PirA TIC7664.

[0051] La SEQ ID NO:26 es la secuencia de aminoácidos de la proteína PirA TIC7664.

[0052] La SEQ ID NO:27 es una secuencia de ácido nucleico obtenida de *Xenorhabdus poinarii* cepa 86198 que codifica una secuencia de proteína pesticida PirB TIC7665.

[0053] La SEQ ID NO:28 es la secuencia de aminoácidos de la proteína PirB TIC7665.

[0054] La SEQ ID NO:29 es una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión PirAB, TIC9319 compuesta por las secuencias de codificación TIC7664 y TIC7665 en enlace operativo y en marco.

[0055] La SEQ ID NO:30 es la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión PirAB TIC9319.

[0056] La SEQ ID NO:31 es una secuencia de ácido nucleico obtenida de *Photorhabdus luminescens* cepa 86197 que codifica una secuencia de proteína pesticida PirA TIC7666.

[0057] La SEQ ID NO:32 es la secuencia de aminoácidos de la proteína PirA TIC7666.

[0058] La SEQ ID NO:33 es una secuencia de ácido nucleico obtenida de *Photorhabdus luminescens* cepa 86197 que codifica una secuencia de proteína PirB pesticida TIC7667.

[0059] La SEQ ID NO:34 es la secuencia de aminoácidos de la proteína PirB TIC7667.

[0060] La SEQ ID NO:35 es una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión PirAB, TIC9322 compuesta por las secuencias de codificación TIC7666 y TIC7667 en enlace operativo y en marco.

[0061] La SEQ ID NO:36 es la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión PirAB TIC9322.

[0062] La SEQ ID NO:37 es una secuencia de ácido nucleico obtenida de *Photorhabdus luminescens* cepa 86194 que codifica una secuencia de proteína pesticida PirA TIC7668.

[0063] La SEQ ID NO:38 es la secuencia de aminoácidos de la proteína PirA TIC7668.

[0064] La SEQ ID NO:39 es una secuencia de ácido nucleico obtenida de *Photorhabdus luminescens* cepa 86194 que codifica una secuencia de proteína pesticida PirB TIC7669.

[0065] La SEQ ID NO:40 es la secuencia de aminoácidos de la proteína PirB TIC7669.

[0066] La SEQ ID NO:41 es una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión PirAB, TIC9320 compuesta por las secuencias de codificación TIC7668 y TIC7669 en enlace operativo y en marco.

[0067] La SEQ ID NO:42 es la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión PirAB TIC9320.

[0068] La SEQ ID NO:43 es una secuencia de ácido nucleico obtenida de una cepa bacteriana desconocida comprendida dentro de un microbioma que codifica una secuencia de proteína PirA pesticida TIC7939.

[0069] La SEQ ID NO: 44 es la secuencia de aminoácidos de la proteína PirA TIC7939.

[0070] La SEQ ID NO:45 es una secuencia de ácido nucleico obtenida de una cepa bacteriana desconocida comprendida dentro de un microbioma que codifica una secuencia de proteína pesticida PirB TIC7940.

[0071] La SEQ ID NO:46 es la secuencia de aminoácidos de la proteína PirB TIC7940.

[0072] La SEQ ID NO:47 es una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión PirAB, TIC9321 compuesta por las secuencias de codificación TIC7939 y TIC7940 en enlace operativo y en marco.

[0073] La SEQ ID NO:48 es la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión PirAB TIC9321.

[0074] La SEQ ID NO:49 es una secuencia de codificación sintética usada para la expresión en células vegetales que codifica una proteína de fusión PirAB TIC6880PL donde un codón de alanina adicional está insertado inmediatamente después del codón de metionina inicial del fragmento que codifica la proteína TIC4771.

[0075] La SEQ ID NO:50 es la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión PirAB TIC6880PL.

[0076] La SEQ ID NO:51 es una secuencia de codificación sintética usada para la expresión en células vegetales que codifica una proteína de fusión PirAB TIC9316.

[0077] La SEQ ID NO:52 es una secuencia de codificación sintética usada para la expresión en células vegetales que codifica una proteína de fusión PirAB TIC9317.

[0078] La SEQ ID NO:53 es una secuencia de codificación sintética usada para la expresión en células vegetales que codifica una proteína de fusión PirAB TIC9318.

[0079] La SEQ ID NO:54 es una secuencia de codificación sintética usada para la expresión en células vegetales que codifica una proteína de fusión PirAB TIC9319.

[0080] La SEQ ID NO:55 es una secuencia de codificación sintética usada para la expresión en células vegetales que codifica una proteína de fusión PirAB TIC9320.

[0081] La SEQ ID NO:56 es una secuencia de codificación sintética usada para la expresión en células vegetales que codifica una proteína de fusión PirAB TIC9322.

[0082] La SEQ ID NO:57 es una secuencia de ácido nucleico obtenida de *Shewanella violacea* cepa DSS12 que codifica una secuencia de proteína PirA pesticida TIC10357.

[0083] La SEQ ID NO:58 es la secuencia de aminoácidos de la proteína PirA TIC10357.

[0084] La SEQ ID NO:59 es una secuencia de ácido nucleico obtenida de *Shewanella violacea* cepa DSS12 que codifica una secuencia de proteína PirB pesticida TIC10366.

[0085] La SEQ ID NO:60 es la secuencia de aminoácidos de la proteína PirB TIC10366.

[0086] La SEQ ID NO:61 es una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión PirAB, TIC10375 compuesta por las secuencias de codificación TIC10357 y TIC10366 en enlace operativo y en marco.

[0087] La SEQ ID NO:62 es la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión PirAB TIC10375.

[0088] La SEQ ID NO:63 es una secuencia de ácido nucleico obtenida de *Photorhabdus luminescens* cepa laumondii TTO1 que codifica una secuencia de proteína PirA pesticida TIC10358.

[0089] La SEQ ID NO:64 es la secuencia de aminoácidos de la proteína PirA TIC10358.

[0090] La SEQ ID NO:65 es una secuencia de ácido nucleico obtenida de *Photorhabdus luminescens* cepa laumondii TTO1 que codifica una secuencia de proteína PirB pesticida TIC10367.

[0091] La SEQ ID NO:66 es la secuencia de aminoácidos de la proteína PirB TIC10367.

[0092] La SEQ ID NO:67 es una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión PirAB, TIC10376 compuesta por las secuencias de codificación TIC10358 y TIC10367 en enlace operativo y en marco.

[0093] La SEQ ID NO:68 es la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión PirAB TIC10376.

[0094] La SEQ ID NO:69 es una secuencia de ácido nucleico obtenida de *Photorhabdus asymbiotica* que codifica una secuencia de proteína PirA pesticida TIC10360.

[0095] La SEQ ID NO:70 es la secuencia de aminoácidos de la proteína PirA TIC10360.

[0096] La SEQ ID NO:71 es una secuencia de ácido nucleico obtenida de *Photorhabdus asymbiotica* que codifica una secuencia de proteína PirB pesticida TIC10369.

[0097] La SEQ ID NO:72 es la secuencia de aminoácidos de la proteína PirB TIC10369.

[0098] La SEQ ID NO:73 es una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión PirAB, TIC10377 compuesta por las secuencias de codificación TIC10360 y TIC10369 en enlace operativo y en marco.

[0099] La SEQ ID NO:74 es la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión PirAB TIC10377.

[00100] La SEQ ID NO:75 es una secuencia de ácido nucleico obtenida de *Xenorhabdus sp.* cepa NBAII XenSa04 que codifica una secuencia de proteína PirA pesticida TIC10361.

[00101] La SEQ ID NO:76 es la secuencia de aminoácidos de la proteína PirA TIC10361.

[00102] La SEQ ID NO:77 es una secuencia de ácido nucleico obtenida de *Xenorhabdus sp.* cepa NBAII XenSa04 que codifica una secuencia de proteína PirB pesticida TIC10370.

[00103] La SEQ ID NO:78 es la secuencia de aminoácidos de la proteína PirB TIC10370.

[00104] La SEQ ID NO:79 es una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión PirAB, TIC10378 compuesta por las secuencias de codificación TIC10361 y TIC10370 en enlace operativo y en marco.

[00105] La SEQ ID NO:80 es la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión PirAB TIC10378.

[00106] La SEQ ID NO:81 es una secuencia de ácido nucleico obtenida de *Yersinia aldovae* cepa 670-83 que codifica una secuencia de proteína PirA pesticida TIC10362.

[00107] La SEQ ID NO:82 es la secuencia de aminoácidos de la proteína PirA TIC10362.

[00108] La SEQ ID NO:83 es una secuencia de ácido nucleico obtenida de *Yersinia aldovae* cepa 670-83 que codifica una secuencia de proteína PirB pesticida TIC10371.

[00109] La SEQ ID NO:84 es la secuencia de aminoácidos de la proteína PirB TIC10371.

[00110] La SEQ ID NO:85 es una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión PirAB, TIC10379 compuesta por las secuencias de codificación TIC10362 y TIC10371 en enlace operativo y en marco.

[00111] La SEQ ID NO:86 es la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión PirAB TIC10379.

[00112] La SEQ ID NO:87 es una secuencia de ácido nucleico obtenida de *Xenorhabdus doucetiae* cepa FRM16 que codifica una secuencia de proteína PirA pesticida TIC10363.

[00113] La SEQ ID NO:88 es la secuencia de aminoácidos de la proteína PirA TIC10363.

[00114] La SEQ ID NO:89 es una secuencia de ácido nucleico obtenida de *Xenorhabdus doucetiae* cepa FRM16 que codifica una secuencia de proteína PirB pesticida TIC10372.

[00115] La SEQ ID NO:90 es la secuencia de aminoácidos de la proteína PirB TIC10372.

[00116] La SEQ ID NO:91 es una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión PirAB, TIC10380 compuesta por las secuencias de codificación TIC10363 y TIC10372 en enlace operativo y en marco.

[00117] La SEQ ID NO:92 es la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión PirAB TIC10380.

[00118] La SEQ ID NO:93 es una secuencia de ácido nucleico obtenida de *Xenorhabdus griffiniae* cepa BMMCB que codifica una secuencia de proteína PirA pesticida TIC10364.

[00119] La SEQ ID NO:94 es la secuencia de aminoácidos de la proteína PirA TIC10364.

[00120] La SEQ ID NO:95 es una secuencia de ácido nucleico obtenida de *Xenorhabdus griffiniae* cepa BMMCB que codifica una secuencia de proteína PirB pesticida TIC10373.

[00121] La SEQ ID NO:96 es la secuencia de aminoácidos de la proteína PirB TIC10373.

[00122] La SEQ ID NO:97 es una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión PirAB, TIC10381 compuesta por las secuencias de codificación TIC10364 y TIC10364 en enlace operativo y en marco.

[00123] La SEQ ID NO:98 es la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión PirAB TIC10381.

[00124] La SEQ ID NO:99 es una secuencia de ácido nucleico obtenida de *Xenorhabdus nematophila* que codifica una secuencia de proteína PirA pesticida TIC10359.

[00125] La SEQ ID NO:100 es la secuencia de aminoácidos de la proteína PirA TIC10359.

[00126] La SEQ ID NO:101 es una secuencia de ácido nucleico obtenida de *Xenorhabdus nematophila* que codifica una secuencia de proteína PirB pesticida TIC10368.

[00127] La SEQ ID NO:102 es la secuencia de aminoácidos de la proteína PirB TIC10368.

[00128] La SEQ ID NO:103 es una secuencia de ácido nucleico que codifica un operón compuesto por las secuencia de codificación TIC10359 y TIC10368.

[00129] La SEQ ID NO:104 es una secuencia de ácido nucleico obtenida de *Photorhabdus luminescens* cepa Hm que codifica una secuencia de proteína PirA pesticida PirA_ABE68878.

[00130] La SEQ ID NO:105 es la secuencia de aminoácidos de la proteína PirA PirA_ABE68878.

[00131] La SEQ ID NO:106 es una secuencia de ácido nucleico obtenida de *Photorhabdus luminescens* cepa Hm que codifica una secuencia de proteína PirB pesticida PirB_ABE68879.

[00132] La SEQ ID NO:107 es la secuencia de aminoácidos de la proteína PirB PirB_ABE68879.

[00133] La SEQ ID NO:108 es una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión PirAB, TIC10434 compuesta por las secuencias de codificación PirA_ABE68878 y PirB_ABE68879 en enlace operativo y en marco.

[00134] La SEQ ID NO:109 es la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión PirAB TIC10434.

[00135] La SEQ ID NO:110 es una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión PirAB, TIC11210 compuesta por las secuencias de codificación TIC7575 y TIC7665 en enlace operativo y en marco.

[00136] La SEQ ID NO:111 es la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión PirAB TIC11210.

[00137] La SEQ ID NO:112 es una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión PirAB, TIC11211 compuesta por las secuencias de codificación TIC7575 y TIC7667 en enlace operativo y en marco.

[00138] La SEQ ID NO:113 es la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión PirAB TIC11211.

[00139] La SEQ ID NO:114 es una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión PirAB, TIC11212 compuesta por las secuencias de codificación TIC7662 y TIC7665 en enlace operativo y en marco.

[00140] La SEQ ID NO:115 es la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión PirAB TIC11212.

[00141] La SEQ ID NO:116 es una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión PirAB, TIC11301 compuesta por las secuencias de codificación TIC7575 y TIC7661 en enlace operativo y en marco.

[00142] La SEQ ID NO:117 es la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión PirAB TIC11301.

[00143] La SEQ ID NO:118 es una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión f PirAB, TIC11302 compuesta por las secuencias de codificación TIC7660 y TIC7576 en enlace operativo y en marco.

[00144] La SEQ ID NO:119 es la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión f PirAB TIC11302.

[00145] La SEQ ID NO:120 es una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión PirAB, TIC11440 compuesta por las secuencias de codificación TIC4771, TIC4771 y TIC4472 en enlace operativo y en marco.

[00146] La SEQ ID NO:121 es la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión PirAB TIC11440.

[00147] La SEQ ID NO:122 es una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión PirAB, TIC11441 compuesta por las secuencias de codificación TIC7575, TIC7575 y TIC7576 en enlace operativo y en marco.

[00148] La SEQ ID NO:123 es la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión f PirAB TIC11441.

[00149] La SEQ ID NO:124 es una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión PirAB, TIC11442 compuesta por las secuencias de codificación TIC7575, TIC4771 y TIC4472 en enlace operativo y en marco.

[00150] La SEQ ID NO:125 es la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión PirAB TIC11442.

[00151] La SEQ ID NO:126 es una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión PirAB, TIC11443 compuesta por las secuencias de codificación TIC7660, TIC7575 y TIC7576 en enlace operativo y en marco.

[00152] La SEQ ID NO:127 es la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión PirAB TIC11443.

[00153] La SEQ ID NO:128 es una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión PirAB, TIC11444 compuesta por las secuencias de codificación TIC7660 y TIC7576 en enlace operativo y en marco.

[00154] La SEQ ID NO:129 es la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión PirAB TIC11444.

[00155] La SEQ ID NO:130 es una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión PirAB, TIC11445 compuesta por las secuencias de codificación TIC7660, TIC7662 y TIC7663 en enlace operativo y en marco.

[00156] La SEQ ID NO:131 es la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión PirAB TIC11445.

[00157] La SEQ ID NO:132 es una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión, TIC11446 compuesta por las secuencias de codificación TIC7662, TIC7660 y TIC7661 en enlace operativo y en marco.

[00158] La SEQ ID NO:133 es la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión PirAB TIC11446.

[00159] La SEQ ID NO:134 es una secuencia de ácido nucleico obtenida de *Xenorhabdus nematophila* cepa MDI-0035777 que codifica una secuencia de proteína PirB pesticida TIC11505.

[00160] La SEQ ID NO:135 es la secuencia de aminoácidos de la proteína PirB TIC11505.

[00161] La SEQ ID NO:136 es una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión PirAB, TIC11506 compuesta por las secuencias de codificación TIC10364 y TIC11505 en enlace operativo y en marco.

[00162] La SEQ ID NO:137 es la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión PirAB TIC11506.

[00163] La SEQ ID NO:138 es una secuencia de ácido nucleico obtenida de *Xenorhabdus bovienii* cepa MDI-0035808 que codifica una secuencia de proteína PirB pesticida TIC11510.

[00164] La SEQ ID NO:139 es la secuencia de aminoácidos de la proteína PirB TIC11510.

[00165] La SEQ ID NO:140 es una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión PirAB, TIC11512 compuesta por las secuencias de codificación TIC10364 y TIC11510 en enlace operativo y en marco.

[00166] La SEQ ID NO:141 es la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión PirAB TIC11512.

[00167] La SEQ ID NO:142 es una secuencia de ácido nucleico obtenida de *Xenorhabdus nematophila* cepa AN6/1 que codifica una secuencia de proteína PirB pesticida TIC11511.

[00168] La SEQ ID NO:143 es la secuencia de aminoácidos de la proteína PirB TIC11511.

[00169] La SEQ ID NO:144 es una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión PirAB, TIC11513 compuesta por las secuencias de codificación TIC10364 y TIC11511 en enlace operativo y en marco.

[00170] La SEQ ID NO:145 es la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión PirAB TIC11513.

[00171] La SEQ ID NO:146 es una secuencia de codificación sintética usada para la expresión en células vegetales que codifica una proteína de fusión PirAB TIC10376PL donde

un codón de alanina adicional está insertado inmediatamente después del codón de metionina inicial del fragmento que codifica la proteína TIC10358.

[00172] La SEQ ID NO:147 es la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión PirAB TIC10376PL.

[00173] La SEQ ID NO:148 es una secuencia de codificación sintética usada para la expresión en células vegetales que codifica una proteína de fusión PirAB TIC10378PL donde un codón de alanina adicional está insertado inmediatamente después del codón de metionina inicial del fragmento que codifica la proteína TIC10361.

[00174] La SEQ ID NO:149 es la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión PirAB TIC10378PL.

[00175] La SEQ ID NO:150 es una secuencia de codificación sintética usada para la expresión en células vegetales que codifica una proteína de fusión PirAB TIC10380PL donde un codón de alanina adicional está insertado inmediatamente después del codón de metionina inicial del fragmento que codifica la proteína TIC10363.

[00176] La SEQ ID NO:151 es la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión PirAB TIC10380PL.

[00177] La SEQ ID NO:152 es una secuencia de codificación sintética usada para la expresión en células vegetales que codifica una proteína de fusión PirAB TIC10381PL donde un codón de alanina adicional está insertado inmediatamente después del codón de metionina inicial del fragmento que codifica la proteína TIC10364.

[00178] La SEQ ID NO:153 es la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión PirAB TIC10381PL.

[00179] La SEQ ID NO:154 es una secuencia de codificación sintética usada para la expresión en células vegetales que codifica una proteína de fusión PirAB TIC11103 compuesta por las secuencias de codificación TIC7661 y TIC7660 unidas de manera operativa.

[00180] La SEQ ID NO:155 es la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión PirAB TIC11103.

[00181] La SEQ ID NO:156 es una secuencia de codificación sintética usada para la expresión en células vegetales que codifica una proteína de fusión PirAB TIC11104 compuesta por las secuencias de codificación TIC7663 y TIC7662 unidas de manera operativa.

[00182] La SEQ ID NO:157 es la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión PirAB TIC11104.

[00183] La SEQ ID NO:158 es una secuencia de codificación sintética usada para la expresión en células vegetales que codifica una proteína de fusión PirAB TIC11302.

[00184] La SEQ ID NO:159 es una secuencia de codificación sintética que codifica una etiqueta de Histidina que está unida de manera operativa a secuencias de codificación expresadas en Escherichia coli y usadas para la purificación de proteínas.

[00185] La SEQ ID NO:160 es la secuencia de aminoácidos de la etiqueta de Histidina.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

[00186] Un problema en la técnica del control de plagas agrícolas puede caracterizarse como una necesidad de nuevas proteínas de toxinas que sean eficaces contra plagas objetivo, exhiban toxicidad de amplio espectro contra especie de plagas objetivo, puedan expresarse en plantas sin provocar problemas agronómicos no deseados, y plantean un modo

de acción alternativo en comparación con toxinas actuales que se usan comercialmente en plantas.

[00187] En la presente se describen clases de proteínas pesticidas PirAB novedosas, ejemplificadas por las proteína PirA TIC4771, TIC7575, TIC7660, TIC7662, TIC7664, TIC7666, TIC7668, TIC7939, TIC10357, TIC10358, TIC10360, TIC10361, TIC10362, TIC10363, TIC10364, TIC10359, y PirA_ABE68878 (colectivamente, “las proteínas PirA”); las proteínas PirB TIC4772, TIC7576, TIC7661, TIC7663, TIC7665, TIC7667, TIC7669, TIC7940, TIC10366, TIC10367, TIC10369, TIC10370, TIC10371, TIC10372, TIC10373, TIC10368, PirB_ABE68879, TIC11505, TIC11510, y TIC11511 (colectivamente, “las proteínas PirB”); y las proteínas de fusión PirAB, TIC6880, TIC9316, TIC9317, TIC9318, TIC9319, TIC9322, TIC9320, TIC9321, TIC6880PL, TIC10375, TIC10376, TIC10377, TIC10378, TIC10379, TIC10380, TIC10381, TIC10434, TIC11210, TIC11211, TIC11212, TIC11301, TIC11302, TIC11440, TIC11441, TIC11442, TIC11443, TIC11444, TIC11445, TIC11446, TIC11506, TIC11512, TIC11513, TIC10376PL, TIC10378PL, TIC10380PL, TIC10381PL, TIC11103, y TIC11104 (colectivamente, “las proteínas de fusión PirAB”) que proporcionan resistencia contra las plagas de insectos coleópteros, hemípteros, y lepidópteros.

[00188] También se describen secuencias de codificación sintéticas diseñadas para la expresión en una célula vegetal que codifica las proteínas de fusión PirAB, TIC6880PL, TIC9316, TIC9317, TIC9318, TIC9319, TIC9320, TIC9322, TIC10376PL, TIC10378PL, TIC10380PL, TIC10381PL, TIC11103, TIC11104, y TIC11302. Se describen adicionalmente moléculas de ácido nucleico recombinante que comprenden un promotor en enlace operativo con una secuencia de codificación que codifica una o más de las proteínas PirA, las proteínas PirB, o las proteínas de fusión PirAB.

[00189] La referencia en la presente solicitud a “proteínas PirA”, “toxina de proteína PirA”, “toxina de proteína PirA”, “proteína pesticida PirA”, “toxinas relacionadas con PirA”, o “proteína de toxina relacionada con PirA”, y similares, hace referencia a cualquier proteína pesticida o proteína inhibidora de insectos novedosa, que comprende, consiste en, que es sustancialmente homóloga a, que es similar a, o que deriva de cualquier secuencia de

proteína pesticida o proteína inhibidora de insectos de TIC4771 (SEQ ID NO:2), TIC7575 (SEQ ID NO:8), TIC7660 (SEQ ID NO:14), TIC7662 (SEQ ID NO:20), TIC7664 (SEQ ID NO:26), TIC7666 (SEQ ID NO:32), TIC7668 (SEQ ID NO:38), TIC7939 (SEQ ID NO:44), TIC10357 (SEQ ID NO:58), TIC10358 (SEQ ID NO:64), TIC10360 (SEQ ID NO:70), TIC10361 (SEQ ID NO:76), TIC10362 (SEQ ID NO:82), TIC10363 (SEQ ID NO:88), TIC10364 (SEQ ID NO:94), TIC10359 (SEQ ID NO:100), y PirA_ABE68878 (SEQ ID NO:105) y segmentos pesticidas o inhibidores de insectos de estas, o combinaciones de estas, que confieren actividad contra plagas de coleópteros, plagas de hemípteros, y plagas de lepidópteros, que incluyen cualquier proteína que exhiba actividad pesticida o inhibidora de insectos si la alineación de dicha proteína con cualquiera de las proteínas PirA da como resultado una identidad de secuencia de aminoácidos de cualquier fracción de porcentaje de alrededor de 20 a alrededor de 100 por ciento.

[00190] La referencia en la presente solicitud a “proteínas PirB”, “toxina de proteína PirB”, “toxina de proteína PirB”, “proteína pesticida PirB”, “toxinas relacionadas con PirB”, o “proteína de toxina relacionada con PirB”, y similares, hace referencia a cualquier proteína pesticida o proteína inhibidora de insectos novedosa, que comprende, consiste en, que es sustancialmente homóloga a, que es similar a, o que deriva de cualquier secuencia de proteína pesticida o proteína inhibidora de insectos de TIC4772 (SEQ ID NO:4), TIC7576 (SEQ ID NO:10), TIC7661 (SEQ ID NO:16), TIC7663 (SEQ ID NO:22), TIC7665 (SEQ ID NO:28), TIC7667 (SEQ ID NO:34), TIC7669 (SEQ ID NO:40), TIC7940 (SEQ ID NO:46), TIC10366 (SEQ ID NO:60), TIC10367 (SEQ ID NO:66), TIC10369 (SEQ ID NO:72), TIC10370 (SEQ ID NO:78), TIC10371 (SEQ ID NO:84), TIC10372 (SEQ ID NO:90), TIC10373 (SEQ ID NO:96), TIC10368 (SEQ ID NO:102), PirB_ABE68879 (SEQ ID NO:107), TIC11505 (SEQ ID NO:135), TIC11510 (SEQ ID NO:139), y TIC11511 (SEQ ID NO:143) y segmentos pesticidas o inhibidores de insectos de estas, o combinaciones de estas, que confieren actividad contra plagas de coleópteros, plagas de hemípteros, y plagas de lepidópteros, que incluyen cualquier proteína que exhiba actividad pesticida o inhibidora de insectos si la alineación de dicha proteína con cualquiera de las proteínas PirB da como resultado una identidad de secuencia de aminoácidos de cualquier fracción de porcentaje de alrededor de 24 a alrededor de 100 por ciento.

[00191] El término “proteína de fusión PirAB” se usa en la presente solicitud para describir una proteína que comprende ambas, una proteína PirA contigua a una proteína PirB. La secuencia de ADN que codifica la proteína de fusión PirAB puede comprender una secuencia de codificación que codifica una proteína PirA unida de manera operativa y en marco con una secuencia de codificación que codifica una proteína PirB de modo que cuando se expresa en una célula produce una proteína de fusión que comprende tanto una proteína PirA como una proteína PirB. La proteína PirA puede estar compuesta por una proteína PirA y una proteína PirB derivada del mismo operón bacteriano, o de manera alternativa, puede estar compuesta por una proteína PirA y una proteína PirB derivada de operones bacterianos diferentes. En la Tabla 1 se proporcionan proteínas de fusión PirAB de ejemplo donde la proteína PirA es contigua a una proteína PirB.

Tabla 1. Proteínas de fusión PirAB de ejemplo compuestas por una proteína PirA contigua a una proteína PirB y las proteínas PirA y PirB correspondientes comprendidas en su interior.

Proteína PirA		**Proteína PirB**		**Proteína de fusión PirAB**	
Toxina	**Proteína SEQ ID NO:**	**Toxina**	**Proteína SEQ ID NO:**	**Toxina**	**Proteína SEQ ID NO:**
TIC4771	2	TIC4772	4	TIC6880	6
TIC7575	8	TIC7576	10	TIC9316	12
TIC7660	14	TIC7661	16	TIC9317	18
TIC7662	20	TIC7663	22	TIC9318	24
TIC7664	26	TIC7665	28	TIC9319	30
TIC7666	32	TIC7667	34	TIC9322	36
TIC7668	38	TIC7669	40	TIC9320	42
TIC7939	44	TIC7940	46	TIC9321	48
TIC4771*	2	TIC4772	4	TIC6880PL*	6

Proteína PirA		Proteína PirB		Proteína de fusión PirAB	
Toxina	**Proteína SEQ ID NO:**	**Toxina**	**Proteína SEQ ID NO:**	**Toxina**	**Proteína SEQ ID NO:**
TIC10357	58	TIC10366	60	TIC10375	62
TIC10358	64	TIC10367	66	TIC10376	68
TIC10360	70	TIC10369	72	TIC10377	74
TIC10361	76	TIC10370	78	TIC10378	80
TIC10362	82	TIC10371	84	TIC10379	86
TIC10363	88	TIC10372	90	TIC10380	92
TIC10364	94	TIC10373	96	TIC10381	98
PirA_ABE68878	105	PirB_ABE68879	107	TIC10434	109
TIC10358*	64	TIC10367	66	TIC10376PL*	147
TIC10361*	76	TIC10370	78	TIC10378PL*	149
TIC10363*	88	TIC10372	90	TIC10380PL*	151
TIC10364*	94	TIC10373	96	TIC10381PL*	153
TIC7575	8	TIC7665	28	TIC11210	111
TIC7575	8	TIC7667	34	TIC11211	113
TIC7662	20	TIC7665	28	TIC11212	115
TIC7575	8	TIC7661	16	TIC11301	117
TIC7660	14	TIC7576	10	TIC11302	119
TIC10364	94	TIC11505	135	TIC11506	137
TIC10364	94	TIC11510	139	TIC11512	141
TIC10364	94	TIC11511	143	TIC11513	145

* comprende un residuo de alanina adicional inmediatamente después del residuo iniciador de metionina.

[00192] El término “proteína de fusión PirAB” también se usa en la presente solicitud para describir una proteína que comprende una proteína PirB contigua a una proteína PirA. La secuencia de ADN que codifica la proteína de fusión PirABde este tipo puede comprender una secuencia de codificación que codifica una proteína PirB unida de manera operativa y en marco con una secuencia de codificación que codifica una proteína PirA de modo que cuando se expresa en una célula produce una proteína de fusión que comprende tanto una proteína PriB como una proteína PirA. La proteína PirB puede estar compuesta por una proteína PirB y una proteína PirA derivada del mismo operón bacteriano, o de manera alternativa, puede estar compuesta por una proteína PirB y una proteína PirA derivada de operones diferentes. En la Tabla 2 se proporcionan proteínas de ejemplo donde la proteína PirB es contigua a una proteína PirA.

Tabla 2. Proteínas de fusión PirAB de ejemplo compuestas por una proteína PirB contigua a una proteína PirA y las proteínas PirB y PirA correspondientes comprendidas en su interior.

Proteína PirB		**Proteína PirA**		**Proteína de fusión PirAB**	
Toxina	**Proteína SEQ ID NO:**	**Toxina**	**Proteína SEQ ID NO:**	**Toxina**	**Proteína SEQ ID NO:**
TIC7661	16	TIC7660	14	TIC11103	155
TIC7663	22	TIC7662	20	TIC11104	157

[00193] El término “proteína de fusión PirAB” también se usa en la presente solicitud para describir una proteína que comprende dos proteínas PirA contiguas a una proteína PirB. La secuencia de ADN que codifica la proteína de fusión PirABde este tipo puede comprender una secuencia de codificación que codifica una proteína PirA unida de manera operativa a una secuencia de codificación que codifica la misma proteína PirA o una proteína PirA diferente, unida de manera operativa a una secuencia de codificación que codifica una proteína PirB de

modo que cuando se expresa en una célula produce una proteína de fusión que comprende una proteína PriA, otra una proteína PirA, y una proteína PirB. En la Tabla 3 se proporcionan proteínas de fusión PirAB de ejemplo que comprenden dos proteínas PirA contiguas a una proteína PirB.

Tabla 3. Proteínas de fusión PirAB de ejemplo compuestas por una proteína PirA contigua a otra proteína PirA, y contigua a una proteína PirB, y las proteínas PirA y PirB correspondientes comprendidas en su interior.

Proteína PirA		**Proteína PirA**		**Proteína PirB**		**Proteína de fusión PirAB**	
Toxina	**Proteína SEQ ID NO:**	**Toxina**	**Proteína SEQ ID NO:**	**Toxina**	**Proteína SEQ ID NO:**	**Toxina**	**Proteína SEQ ID NO:**
TIC4771	2	TIC4771	2	TIC4772	4	TIC11440	121
TIC7575	8	TIC7575	8	TIC7576	10	TIC11441	123
TIC7575	8	TIC4771	2	TIC4772	4	TIC11442	125
TIC7660	14	TIC7575	8	TIC7576	10	TIC11443	127
TIC7575	8	TIC7660	14	TIC7661	16	TIC11444	129
TIC7660	14	TIC7662	20	TIC7663	22	TIC11445	131
TIC7662	20	TIC7660	14	TIC7661	16	TIC11446	133

[00194] El término “proteína de fusión PirAB” también se usa en la presente solicitud para describir una proteína que comprende múltiples proteínas PirA y/o múltiples proteínas PirB contiguas una a la otra. Las múltiples proteínas PirA y/o PirB pueden ser proteínas PirA o PirB duplicadas, o pueden ser proteínas PirA o PirB diferentes. La combinación de múltiples proteínas PirA y/o PirB como una proteína de fusión puede aumentar la actividad contra una especie de plaga objetivo específica o puede aumentar la gama de especies de plagas en las cuales se presenta actividad.

[00195] El término “segmento” o “fragmento” se usa en la presente solicitud para describir secuencias de aminoácidos o ácidos nucleicos consecutivas que son más cortas que la secuencia de aminoácidos o ácidos nucleicos completa que describe una de las proteínas PirA, las proteínas PirB, o las proteína PirAB. Un segmento o fragmento que exhibe actividad inhibidora de insectos también se describe en la presente solicitud si la alineación de dicho segmento o fragmento, con la sección correspondiente de las proteínas PirA establecidas en las SEQ ID NO:2, 8, 14, 20, 26, 32, 38, 44, 58, 64, 70, 76, 82, 88, 94, 100, o 105; las proteínas PirB establecidas en las SEQ ID NO:4, 10, 16, 22, 28, 34, 40, 46, 60, 66, 72, 78, 84, 90, 96, 102, 107, 135, 139, or 143; o las proteínas de fusión PirAB establecidas en las SEQ ID NO:6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48, 50, 62, 68, 74, 80, 86, 92, 98, 109, 111, 113, 115, 117, 119, 121, 123, 125, 127, 129, 131, 133, 137, 141, 145, 147, 149, 151, 153, 155, o 157, o proteína insecticida de miembro de familia relacionado da como resultado una alineación de alrededor de 65 a alrededor de 100 de porcentaje de identidad entre el segmento o fragmento y la sección correspondiente de la proteína alineada. Un segmento o fragmentos de una de las proteínas PirA, las proteínas PirB, o las proteínas PirAB descritas en la presente puede comprender al menos alrededor de 50 aminoácidos contiguos, al menos alrededor de 75 aminoácidos contiguos, al menos alrededor de 100 aminoácidos contiguos, al menos alrededor de 125 aminoácidos contiguos, al menos alrededor de 150 aminoácidos contiguos, al menos alrededor de 200 aminoácidos contiguos, al menos alrededor de 250 aminoácidos contiguos, al menos alrededor de 300 aminoácidos contiguos, al menos alrededor de 350 aminoácidos contiguos, al menos alrededor de 400 aminoácidos contiguos, al menos alrededor de 450 aminoácidos contiguos, al menos alrededor de 500 aminoácidos contiguos, al menos alrededor de 550 aminoácidos contiguos, o al menos alrededor de 600 aminoácidos de una de las proteínas PirA, las proteínas PirB, o las proteínas PirAB. Un segmento o fragmento de una de las proteínas PirA, las proteínas PirB, o las proteínas PirAB descritas en la presente puede exhibir la actividad de la secuencia base.

[00196] La referencia en la presente solicitud a los términos “activo/a” o “actividad”, “actividad pesticida” o “pesticida” o “actividad insecticida”, “inhibidor de insectos” o “insecticida” se refiere a la eficacia de un agente tóxico, tal como una toxina de proteína, para inhibir (inhibir el crecimiento, alimentación, fecundidad, o viabilidad), suprimir (suprimir el

crecimiento, alimentación, fecundidad, o viabilidad), controlar (controlar la infestación de plagas, controlar las actividades alimenticias de la plaga en un cultivo particular que contiene una cantidad eficaz de una o más de las proteínas PirA, las proteínas PirB o las proteínas de fusión PirAB. Estos términos pretenden incluir el resultado de proporcionar una cantidad eficaz de manera pesticida de una proteína tóxica a una plaga donde la exposición de la plaga a la proteína tóxica da como resultado la morbilidad, mortalidad, fecundidad reducida, o retraso en el crecimiento. Estos términos también incluyen el rechazo de la plaga de la planta, un tejido de la planta, una parte de la planta, semilla, células vegetales, o de la ubicación geográfica particular donde puede crecer la planta, como resultado de proporcionar una cantidad eficaz de manera pesticida de la proteína tóxica en o sobre la planta. En general, actividad pesticida hace referencia a la capacidad de una proteína tóxica de ser eficaz para inhibir el crecimiento, desarrollo, viabilidad, comportamiento alimenticio, comportamiento de apareamiento, fecundidad, o cualquier disminución medible de los efectos adversos provocados cuando el insecto se alimente con esta proteína, fragmento de proteína, segmento de proteína o polinucleótido de una plaga objetivo particular, que incluye de modo no taxativo los insectos del orden de los lepidópteros, coleópteros o hemípteros. La proteína tóxica puede ser producida por la planta o puede aplicarse a la planta o al entorno dentro del lugar donde se ubica la planta. Los términos “bioactividad”, “efectivo”, “eficaz” o variaciones de estos también son términos utilizados de manera intercambiable en la presente solicitud para describir los efectos de proteínas de la presente invención en plagas de insectos objetivo.

[00197] Una cantidad eficaz de manera pesticida de un agente tóxico, cuando se proporciona en la dieta de una plaga objetivo, exhibe actividad pesticida cuando el agente tóxico entra en contacto con la plaga. Un agente tóxico puede ser una proteína pesticida o uno o más agentes químicos conocidos en la técnica. Los agentes químicos pesticidas o insecticidas y agentes de proteínas pesticidas o insecticidas se pueden usar solos o en combinaciones entre sí. Los agentes químicos incluyen, de modo no taxativo, moléculas de ARNcd dirigidas a genes específicos para la supresión en una plaga objetivo, organocloruros, organofosfatos, carbamatos, piretroides, neonicotinoides, y rianoides. Los agentes de proteínas pesticidas o insecticidas incluyen las toxinas de proteínas establecidas en la presente solicitud, así como también otros agentes tóxicos proteináceos que incluyen los que

se dirigen a las especies de plagas de coleópteros, lepidópteros, hemípteros, tisanópteros, o dípteros.

[00198] Las proteínas “relacionadas con insectos *Photorhabdus*”, o proteínas PirAB, son toxinas binarias con actividad pesticida contra algunos insectos. Se ha demostrado que algunas proteínas PirAB tienen actividad de lepidópteros cuando se inyectantan en el hemocoel del insecto. Sin embargo, cuando se presentan en la dieta del insecto, se demostró que la aplicación oral de las proteínas PirAB tienen poca actividad a actividad nuela (véase, por ejemplo, Yang et ál. (2017) PirAB protein from Xenorhabdus nematophila HB310 exhibits a binary toxin with insecticidal activity and cytotoxicity in Galleria mellonella. J. Invertebr Pathol, 148: 43-50; Li et ál. (2014) Photorhabdus luminescens PirAB-fusion protein exhibits both cytotoxicity and insecticidal activity. FEMS Microbial Lett, 356: 23-31; Wu y Yunhong (2016) Scientific Reports 6, Artículo número: 34996; doi:10.1038/srep34996; y Zhang et ál. (2013) XaxAB-like binary toxin from Photorhabdus luminescens exhibits both insecticidal activity and cytotoxicity. FEMS Microbiol Lett 350: 48-56). Se ha informado actividad oral de las proteínas PirAB contra los lepidópteros pero esos estudios se han basado en que el insecto ingiera una dieta que comprende bacterias *E. coli* que expresan las proteínas PirAB y no la toxina purificada proporcionada en la dieta del insecto (véase, por ejemplo, Waterfield et ál. (2005) The Photorhabdus Pir toxins are similar to a developmentally regulated insect protein but show no juvenile hormone esterase activity. FEMS Microbiol Lett, 245: 47-52 y Blackburn et ál. (2006) Remarkable susceptibility of the diamondback moth (Plutella xylostella) to ingestion of Pir toxins from Photorhabdus luminescens. Entomologia Experimentalis et Applicata, 121: 31-37). Por el contrario, en la presente, como se describe en los Ejemplos, las preparaciones de proteína de las proteínas PirA, las proteínas PirB, y las proteínas de fusión PirAB se proporcionaron en los bioensayos de dieta del insecto. Se observó actividad oral contra las plagas de insectos lepidópteros, coleópteros, y hemípteros y se presenta en los Ejemplos. Además, los discos de hoja derivados de plantas que expresan las proteínas de fusión PirAB, TIC9316, TIC9317, y TIC9318 se usaron en estudios de alimentación oral de insectos que demostraron actividad contra las especies de plagas de insectos lepidópteros barrenador europeo del maíz y barrenador del maíz del suroeste (SWCB). Además, los discos de hoja derivados de plantas que expresan TIC10376, TIC10378, TIC10380, y TIC10381 demostraron

actividad contra SWCB. También, tal como se describe en los Ejemplos, TIC9315 y TIC11302 demostraron actividad contra plagas de gusano de la raíz del maíz occidental en plantas transformadas de manera estable.

[00199] Se pretende que la referencia a una plaga, particularmente una plaga de una planta de cultivo, significa plagas de insectos de plantas de cultivo, particularmente aquellas que son controladas por al menos una de las proteínas PirA, la proteína PirB, y las proteínas PirAB, una proteína insecticida de miembro de familia relacionado, o un segmento o fragmento de esta.

[00200] Tal como se describe en los Ejemplos, una o más de las proteínas PirA, las proteínas PirB, y las proteínas PirAB exhibe actividad insecticida con respecto a plagas de insectos de las especies de plagas de insectos coleópteros, hemípteros, y lepidópteros, que incluyen adultos, pupas, larvas, y neonatos.

[00201] Los insectos del orden de lepidópteros incluyen, de modo no taxativo, gusanos soldado, gusanos cortadores, gusanos medidores falsos, y heliothins en la Familia Noctuidae, por ejemplo, cogollero del maíz (*Spodoptera frugiperda*), gardama (*Spodoptera exigua*), gusano soldado (*Spodoptera exempta*), gusano soldado Bertha (*Mamestra configurata*), gusano soldado del sur (*Spodoptera eridania*), gusano cortador negro (*Agrotis ipsilon*), oruga de la col (*Trichoplusia ni*), gusano falso medidor (*Pseudoplusia includens*), oruga de las leguminosas (*Anticarsia gemmatalis*), gusano del trébol (*Hypena scabra*), oruga del tabaco (*Heliothis virescens*), gusano cortador granuloso (*Agrotis subterranea*), gusano soldado verdadero (*Pseudaletia unipuncta*), guano cortador occidental (*Agrotis orthogonia*); barrenadores, gusanos de la bolsa, gusanos de telaraña, gusanos de pinos, gusanos de la col y descarnadores de la Familia Pyralidae, por ejemplo, barrenador europeo del maíz (*Ostrinia nubilalis*), polilla de la naranja Navel (*Amyelois transitella*), gusano de la raíz del maíz (*Crambus caliginosellus*), gusano de la hierba (*Herpetogramma licarsisalis*), polilla del girasol (*Homoeosoma electellum*), barrenador menor del maíz (*Elasmopalpus lignosellus*); enrolladores de hojas, gusanos de capullo, gusanos de semilla, y gusanos de fruta en la Familia Tortricidae, por ejemplo, polilla del manzano (*Cydia pomonella*), polilla de la uva

(*Endopiza viteana*), polilla de la fruta oriental (*Grapholita molesta*), polilla del capullo del girasol (*Suleima helianthana*); y muchos otros lepidópteros económicamente importantes, por ejemplo, palomilla dorso de diamante (*Plutella xylostella*), gusano rosado (*Pectinophora gossypiella*) y polilla gitana (*Lymantria dispar*). Otras plagas de insectos del orden de lepidópteros incluyen, por ejemplo, gusano de la hoja del algodón (*Alabama argillacea*), enrrollador de hojas frutales (*Archips argyrospila*), enrrollador de hojas europeo (*Archips rosana*) y otras especies de Archips, (*Chilo suppressalis,* barrenador asiático del arroz, o barrenador del tallo del arroz), enrrollador de hojas de arroz (*Cnaphalocrocis medinalis*), gusano de la raíz del maíz (*Crambus caliginosellus*), gusano de pasto azul (*Crambus teterrellus*), barrenador del maíz del suroeste (*Diatraea grandiosella*), barrenador de la caña de azúcar (*Diatraea saccharalis*), oruga espinosa del algodón (*Earias insulana*), oruga moteada del algodón (*Earias vittella*), oruga del Viejo Mundo (*Helicoverpa armigera*), gusano del maíz (*Helicoverpa zea,* también conocido como oruga de la soja y gusano del algodón), oruga del tabaco (*Heliothis virescens*), gusano de la hierba (*Herpetogramma licarsisalis*), gusano cortador del frijol (*Striacosta albicosta*), polilla de la vid europea (*Lobesia botrana*), minador de hojas de los cítricos (*Phyllocnistis citrella*), mariposa blanca de la col (*Pieris brassicae*), blanquita de la col (*Pieris rapae,* también conocida como oruga de la col importada), gusano cortador del tabaco (*Spodoptera litura*, también conocido como oruga de cluster), y gusano minador del tomate (*Tuta absoluta*).

[00202] Los insectos del orden de coleópteros incluyen, de modo no taxativo, Agriotes spp., Anthonomus spp., Atomaria linearis, Chaetocnema tibialis, Cosmopolites spp., Curculio spp., Dermestes spp., Diabrotica spp., Epilachna spp., Eremnus spp., Leptinotarsa decemlineata, Lissorhoptrus spp., Melolontha spp., Orycaephilus spp., Otiorhynchus spp., Phlyctinus spp., Popillia spp., Psylliodes spp., Rhizopertha spp., Scarabeidae, Sitophilus spp., Sitotroga spp., Tenebrio spp., Tribolium spp. y Trogoderma spp, particularmente cuando la plaga es gusano de la raíz del maíz occidental (Diabrotica virgifera, WCR), gusano de la raíz del maíz del norte (Diabrotica barberi, NCR), gusano de la raíz del maíz mexicano (Diabrotica virgifera zeae, MCR), gusano de la raíz del maíz brasileño (Diabrotica balteata, BZR), gusano de la raíz del maíz del sur (Diabrotica undecimpunctata howardii, SCR), escarabajo de la patata (Leptinotarsa decemlineata, CPB), un complejo del gusano de la raíz del maíz brasileño

(BCR, que consiste en Diabrotica viridula y Diabrotica speciosa), pulguilla de las crucíferas (Phyllotreta cruciferae), pulguilla rayada (Phyllotreta striolata), y pulguilla negra (Phyllotreta pusilla).

[00203] Los insectos del orden de hemípteros incluyen, de modo no taxativo, chinches de la familia Pentatomidae: chinches verdes del género *Chinavia* (*Chinavia hilaris, Chinavia marginata*, y *Chinavia pensylvanica*), chinches del género *Chlorochroa* (*Chlorochroa granulose, Chlorochroa kanei, Chlorochroa ligata, Chlorochroa lineate, Chlorochroa opuntiae, Chlorochroa persimilis, Chlorochroa rossiana, Chlorochroa sayi, Chlorochroa uhleri, Chlorochroa belfragii, Chlorochroa faceta, Chlorochroa osborni, Chlorochroa saucia*, y *Chlorochroa senilis*), chinche verde (*Nezara viridula*), chinches del género *Edessa* (*Edessa meditabunda, Edessa bifida*, y *Edessa florida*), la chinche marrón (*Euschistus heros)*, chinches del género *Euschistus* (*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, Euschistus tristigmus*, y *Euschistus variolarius*), chinche marrón marmoleada (*Halyomorpha halys)*, chinche (*Thyanta accerra*), chinches del género *Thyanta* (*Thyanta calceata, Thyanta custator, Thyanta pallidovirens, Thyanta perditor, Thyanta maculate*, y *Thyanta pseudocasta*), chinche de abdomen verde (*Dichelops melacanthus*) y otras chinches del género Dichelops (*Dichelops avilapiresi, Dichelops bicolor, Dichelops dimidatus, Dichelops furcatus, Dichelops furcifrons, Dichelops lobatus, Dichelops miriamae, Dichelops nigrum, Dichelops peruanus, Dichelops phoenix, y Dichelops saltensis*), chinche de la alfalfa (*Piezodorus guildinni*) así como también *Piezodorus lituratus*; e insectos de la familia de Plataspidae tal como chinche del Kudzu (*Megacopta cribraria*), chinche del triángulo (*Lygus hesperus*), y chinche ligus (*Lygus lineolaris*).

[00204] La referencia en la presente solicitud a una “molécula de ADN aislada”, o un término o frase equivalente, pretende indicar que la molécula de ADN es una que está presente sola o en combinación con otras composiciones, pero no dentro de su entorno natural. Por ejemplo, los elementos de ácido nucleico tal como una secuencia de codificación, secuencia de intrones, secuencia líder no traducida, secuencia promotora, secuencia de

terminación de transcripción, y similares, que se encuentran naturalmente dentro del ADN del genoma de un organismo no se consideran “aislados” siempre que el elemento se encuentre 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 subpartes de estos elementos, estaría “aislado” dentro del alcance de la presente descripción siempre 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 secuencia de nucleótidos que codifica una proteína insecticida o cualquier variante insecticida de origen natural de esa proteína sería una secuencia de nucleótidos aislada siempre que la secuencia de nucleótidos no se encuentre dentro del ADN de la bacteria de la cual se encuentra naturalmente la secuencia que codifica la proteína. Una secuencia de nucleótidos sintética que codifica La secuencia de aminoácidos de la proteína insecticida de origen natural se consideraría aislada para los fines de la presente descripción. Para los fines de la presente descripción, cualquier secuencia de nucleótidos transgénica, es decir, la secuencia de nucleótidos del ADN insertado en el genoma de las células de una planta o bacteria, o presente en un vector extracromosómico, se consideraría una secuencia de nucleótidos aislada si está presente dentro del plásmido o estructura similar usada para transformar las células, dentro del genoma de la planta o bacteria, o presente en cantidades detectables en tejidos, progenie, muestras biológicas o productos básicos derivados de la planta o bacteria.

[00205] Tal como se describe en la presente, un operón que contiene dos marcos de lectura abiertos (ORF, por sus siglas en inglés) que codifica la proteína PirA, TIC4771 (SEQ ID NO:1) y la proteína PirB, TIC4772 (SEQ ID NO:3) se descubrió en el ADN obtenido de *Xenorhabdus nematophila* cepa ISB000002 que codifica las toxinas de proteína presentadas como la SEQ ID NO:2 y SEQ ID NO:4, respectivamente. Los dos ORF se usaron para elaborar una secuencia de ADN que codifica la proteína de fusión PirAB, TIC6880 (SEQ ID NO:5) donde las dos secuencias de codificación estaban unidas de manera operativa y en marco para producir la proteína de fusión PirAB TIC6880 presentadas como la SEQ ID NO:6. El bioensayo usando TIC4771 derivado de célula hospedadora microbiana demostró actividad contra las especies de lepidópteros gusano del maíz (*Helicoverpa zea*, CEW), palomilla dorso de diamante (*Plutella xylostella*, DEM), barrenador europeo del maíz (*Ostrinia nubilalis*, ECB),

oruga de las leguminosas (*Anticarsia gemmatalis*, VBC), y oruga militar del sur (*Spodoptera eridania*, SAW); la especie de coleópteros escarabajo de la patata (*Leptinotarsa decemlineata*, CPB); y la especie de hemípteros chinche ligus (*Lygus lineolaris*, TPB). El bioensayo usando TIC4772 derivado de célula hospedadora microbiana demostró actividad contra las especies de lepidópteros CEW, DBM, y VBC y la especie de hemípteros TPB. El bioensayo usando la proteína de fusión PirAB derivada de célula hospedadora microbiana, TIC6880 compuesta por TIC4771 y TIC4772, demostró actividad contra las especies de lepidópteros cogollero del maíz (*Spodoptera frugiperda*, FAW), CEW, barrenador del maíz del suroeste (*Diatraea grandiosella*, SWCB), DBM, ECB, y VBC, las especies de coleópteros CPB y gusano de la raíz del maíz occidental (*Diabrotica virgifera*, WCR); las especies de hemípteros chinche ligus (*Lygus lineolaris*, TPB), chinche del triángulo (*Lygus Hesperus*, WTP), chinche verde (*Nezara viridula*, SGB), y chinche marrón (*Euschistus heros*, NBSB), y la especie de dípteros mosquito de la fiebre amarilla (*Aedes aegypti*, YFM).

[00206] Un operón que contiene dos ORF que codifica la proteína PirA, TIC7575 (SEQ ID NO:7) y la proteína PirB, TIC7576 (SEQ ID NO:9) se descubrió en el ADN obtenido de *Xenorhabdus ehlersii* cepa 85823 que codifica las toxinas de proteína presentadas como la SEQ ID NO:8 y SEQ ID NO:10, respectivamente. Los dos ORF se usaron para elaborar una secuencia de ADN que codifica la proteína de fusión PirAB, TIC9316 (SEQ ID NO:11) donde las dos secuencias de codificación estaban unidas de manera operativa y en marco para producir la proteína de fusión PirAB TIC9316 presentadas como la SEQ ID NO:12. El bioensayo usando TIC7575 y TIC7576 derivados de célula hospedadora microbiana no demostró actividad contra los insectos analizados en el ensayo. Sin embargo, el bioensayo usando la proteína de fusión PirAB TIC9316 - compuesta por TIC7575 y TIC7576 - demostró actividad contra las especies de lepidópteros SWCB, gusano cortador negro (*Agrotis ipsilon*, BCW), SAW, oruga del tabaco (*Heliothis virescens*, TBW), ECB, y VBC, la especie de coleópteros *CPB,* y las especies de hemípteros TPB, WTP, SGB, y NBSB.

[00207] Un operón que contiene dos ORF que codifica la proteína PirA, TIC7660 (SEQ ID NO:13) y la proteína PirB, TIC7661 (SEQ ID NO:15) se descubrió en el ADN obtenido de *Xenorhabdus cabanillasii* cepa 85908 que codifica las toxinas de proteína presentadas como

la SEQ ID NO:14 y SEQ ID NO:16, respectivamente. Los dos ORF se usaron para elaborar una secuencia de ADN que codifica la proteína de fusión PirAB, TIC9317 (SEQ ID NO:17) donde las dos secuencias de codificación estaban unidas de manera operativa y en marco para producir la proteína de fusión PirAB TIC9317 presentadas como la SEQ ID NO:18. El bioensayo usando TIC7660 y TIC7661 derivados de célula hospedadora microbiana no demostró actividad contra los insectos usados en el ensayo. Sin embargo, el bioensayo usando la proteína de fusión PirAB TIC9317 - compuesta por TIC7660 y TIC7661 - demostró actividad contra las especies de lepidópteros SWCB, ECB, y VBC, las especies de coleópteros CPB y WCR, y las especies de hemípteros TPB, WTP, y SGB.

[00208] Un operón que contiene dos ORF que codifica la proteína PirA, TIC7662 (SEQ ID NO:19) y la proteína PirB, TIC7663 (SEQ ID NO:21) se descubrió en el ADN obtenido de *Xenorhabdus ehlersii* cepa 85887 que codifica las toxinas de proteína presentadas como la SEQ ID NO:20 y SEQ ID NO:22, respectivamente. Los dos ORF se usaron para elaborar una secuencia de ADN que codifica la proteína de fusión PirAB, TIC9318 (SEQ ID NO:23) donde las dos secuencias de codificación estaban unidas de manera operativa y en marco para producir la proteína de fusión PirAB TIC9318 presentadas como la SEQ ID NO:24. El bioensayo usando TIC7662 y TIC7663 derivados de célula hospedadora microbiana no demostró actividad contra los insectos usados en el ensayo. Sin embargo, el bioensayo usando la proteína de fusión PirAB TIC9318 - compuesta por TIC7662 y TIC7663 - demostró actividad contra las especies de lepidópteros SWCB, BCW, TBW, ECB, y VBC, las especies de coleópteros CPB y WCR, y las especies de hemípteros TPB, WTP, SGB, y NBSB.

[00209] Un operón que contiene dos ORF que codifica la proteína PirA, TIC7664 (SEQ ID NO:25) y la proteína PirB, TIC7665 (SEQ ID NO:27) se descubrió en el ADN obtenido de *Xenorhabdus poinarii* cepa 86198 que codifica las toxinas de proteína presentadas como la SEQ ID NO:26 y SEQ ID NO:28, respectivamente. Los dos ORF se usaron para elaborar una secuencia de ADN que codifica la proteína de fusión PirAB, TIC9319 (SEQ ID NO:29) donde las dos secuencias de codificación estaban unidas de manera operativa y en marco para producir la proteína de fusión PirAB TIC9319 presentadas como la SEQ ID NO:30. El bioensayo usando TIC7664 derivado de célula hospedadora microbiana demostró actividad

contra la especie de coleópteros CPB. El bioensayo usando TIC7665 derivado de célula hospedadora microbiana demostró actividad contra la especie de lepidópteros TBW. El bioensayo usando la proteína de fusión PirAB TIC9319 - compuesta por TIC7664 y TIC76653 - demostró actividad contra las especies de lepidópteros SWCB, BCW, ECB, y VBC, la especie de coleópteros CPB, y las especies de hemípteros TPB, WTP, y SGB.

[00210] Un operón que contiene dos ORF que codifica la proteína PirA, TIC7666 (SEQ ID NO:31) y la proteína PirB, TIC7667 (SEQ ID NO:33) se descubrió en el ADN obtenido de *Photorhabdus luminescens* cepa 86197 que codifica las toxinas de proteína presentadas como la SEQ ID NO:32 y SEQ ID NO:34, respectivamente. Los dos ORF se usaron para elaborar una secuencia de ADN que codifica la proteína de fusión PirAB, TIC9322 (SEQ ID NO:35) donde las dos secuencias de codificación estaban unidas de manera operativa y en marco para producir la proteína de fusión PirAB TIC9322 presentadas como la SEQ ID NO:36. El bioensayo usando TIC7666 derivado de célula hospedadora microbiana no demostró actividad contra los insectos usados en el ensayo. El bioensayo usando TIC7667 derivado de célula hospedadora microbiana demostró actividad contra la especie de lepidópteros SWCB. El bioensayo usando la proteína de fusión PirAB TIC9322 - compuesta por TIC7666 y TIC7667 - demostró actividad contra las especies de lepidópteros SWCB, y VBC, la especie de coleópteros CPB, y la especie de hemípteros TPB.

[00211] Un operón que contiene dos ORF que codifica la proteína PirA, TIC7668 (SEQ ID NO:37) y la proteína PirB, TIC7669 (SEQ ID NO:39) se descubrió en el ADN obtenido de *Photorhabdus luminescens* cepa 86194 que codifica las toxinas de proteína presentadas como la SEQ ID NO:38 y SEQ ID NO:40, respectivamente. Los dos ORF se usaron para elaborar una secuencia de ADN que codifica la proteína de fusión PirAB, TIC9320 (SEQ ID NO:41) donde las dos secuencias de codificación estaban unidas de manera operativa y en marco para producir la proteína de fusión PirAB TIC9320 presentadas como la SEQ ID NO:42. El bioensayo usando TIC7668 y TIC7669 derivados de célula hospedadora microbiana no demostró actividad contra los insectos usados en el ensayo. Sin embargo, el bioensayo usando la proteína de fusión PirAB TIC9320 - compuesta por TIC7668 y TIC7669 - demostró

actividad contra las especies de lepidópteros SWCB, ECB, y VBC, las especies de coleópteros CPB y WCR, y las especies de hemípteros TPB, SGB, y NBSB.

[00212] Un operón que contiene dos ORF que codifica la proteína PirA, TIC7939 (SEQ ID NO:43) y la proteína PirB, TIC7940 (SEQ ID NO:45) se descubrió en el ADN obtenido de una especie bacteriana desconocida dentro de un microbioma que codifica las toxinas de proteína presentadas como la SEQ ID NO:44 y SEQ ID NO:46, respectivamente. Los dos ORF se usaron para elaborar una secuencia de ADN que codifica la proteína de fusión PirAB, TIC9321 (SEQ ID NO:47) donde las dos secuencias de codificación estaban unidas de manera operativa y en marco para producir la proteína de fusión PirAB TIC9321 presentadas como la SEQ ID NO:48.

[00213] Un operón que contiene dos ORF que codifica la proteína PirA, TIC10357 (SEQ ID NO:57) y la proteína PirB, TIC10366 (SEQ ID NO:59) se descubrió en el ADN obtenido de *Shewanella violacea* que codifica las toxinas de proteína presentadas como la SEQ ID NO:58 y SEQ ID NO:60, respectivamente. Los dos marcos de lectura abiertos se usaron para elaborar una secuencia de ADN que codifica la proteína de fusión PirAB, TIC10375 (SEQ ID NO:61) donde las dos secuencias de codificación estaban unidas de manera operativa y en marco para producir la proteína de fusión PirAB TIC10375 presentadas como la SEQ ID NO:62.

[00214] Un operón que contiene dos ORF que codifica la proteína PirA, TIC10358 (SEQ ID NO:63) y la proteína PirB, TIC10367 (SEQ ID NO:65) se descubrió en el ADN obtenido de *Photorhabdus luminescens* cepa laumondii TTO1 que codifica las toxinas de proteína presentadas como la SEQ ID NO:64 y SEQ ID NO:66, respectivamente. Los dos ORF se usaron para elaborar una secuencia de ADN que codifica la proteína de fusión PirAB, TIC10376 (SEQ ID NO:67) donde las dos secuencias de codificación estaban unidas de manera operativa y en marco para producir la proteína de fusión PirAB TIC10376 presentadas como la SEQ ID NO:68. El bioensayo usando TIC10358 y TIC10367 derivados de célula hospedadora microbiana no demostró actividad contra los insectos usados en el ensayo. Sin embargo, el bioensayo usando la proteína de fusión PirAB TIC10376 - compuesta por

TIC10358 y TIC10367 - demostró actividad contra la especie de lepidópteros SWCB y las especies de coleópteros gusano de la raíz del maíz del norte (*Diabrotica barberi*, NCR) y WCR.

[00215] Un operón que contiene dos ORF que codifica la proteína PirA, TIC10360 (SEQ ID NO:69) y la proteína PirB, TIC10369 (SEQ ID NO:71) se descubrió en el ADN obtenido de *Photorhabdus asymbiotica* que codifica las toxinas de proteína presentadas como la SEQ ID NO:70 y SEQ ID NO:72, respectivamente. Los dos ORF se usaron para elaborar una secuencia de ADN que codifica la proteína de fusión PirAB, TIC10377 (SEQ ID NO:73) donde las dos secuencias de codificación estaban unidas de manera operativa y en marco para producir la proteína de fusión PirAB TIC10377 presentadas como la SEQ ID NO:74.

[00216] Un operón que contiene dos ORF que codifica la proteína PirA, TIC10361 (SEQ ID NO:75) y la proteína PirB, TIC10370 (SEQ ID NO:77) se descubrió en el ADN obtenido de *Xenorhabdus sp*. cepa NBAII XenSa04 que codifica las toxinas de proteína presentadas como la SEQ ID NO:76 y SEQ ID NO:78, respectivamente. Los dos ORF se usaron para elaborar una secuencia de ADN que codifica la proteína de fusión PirAB, TIC10378 (SEQ ID NO:79) donde las dos secuencias de codificación estaban unidas de manera operativa y en marco para producir la proteína de fusión PirAB TIC10378 presentadas como la SEQ ID NO:80.

[00217] Un operón que contiene dos ORF que codifica la proteína PirA, TIC10362 (SEQ ID NO:81) y la proteína PirB, TIC10371 (SEQ ID NO:83) se descubrió en el ADN obtenido de *Yersinia aldovae* cepa 670-83 que codifica las toxinas de proteína presentadas como la SEQ ID NO:82 y SEQ ID NO:84, respectivamente. Los dos ORF se usaron para elaborar una secuencia de ADN que codifica la proteína de fusión PirAB, TIC10379 (SEQ ID NO:85) donde las dos secuencias de codificación estaban unidas de manera operativa y en marco para producir la proteína de fusión PirAB TIC10379 presentadas como la SEQ ID NO:86.

[00218] Un operón que contiene dos ORF que codifica la proteína PirA, TIC10363 (SEQ ID NO:87) y la proteína PirB, TIC10372 (SEQ ID NO:89) se descubrió en el ADN obtenido de *Xenorhabdus doucetiae* cepa FRM16 que codifica las toxinas de proteína presentadas como

la SEQ ID NO:88 y SEQ ID NO:90, respectivamente. Los dos ORF se usaron para elaborar una secuencia de ADN que codifica la proteína de fusión PirAB, TIC10380 (SEQ ID NO:91) donde las dos secuencias de codificación estaban unidas de manera operativa y en marco para producir la proteína de fusión PirAB TIC10380 presentadas como la SEQ ID NO:92. El bioensayo usando TIC10363 y TIC10372 derivados de célula hospedadora microbiana no demostró actividad contra los insectos usados en el ensayo. Sin embargo, el bioensayo usando la proteína de fusión PirAB TIC10380 - compuesta por TIC10363 y TIC10372 - demostró actividad contra la especie de lepidópteros FAW, las especies de coleópteros NCR y WCR, y la especie de hemípteros NBSB.

[00219] Un operón que contiene dos ORF que codifica la proteína PirA, TIC10364 (SEQ ID NO:93) y la proteína PirB, TIC10373 (SEQ ID NO:95) se descubrió en el ADN obtenido de *Xenorhabdus griffiniae* cepa BMMCB que codifica las toxinas de proteína presentadas como la SEQ ID NO:94 y SEQ ID NO:96, respectivamente. Los dos ORF se usaron para elaborar una secuencia de ADN que codifica la proteína de fusión PirAB, TIC10381 (SEQ ID NO:97) donde las dos secuencias de codificación estaban unidas de manera operativa y en marco para producir la proteína de fusión PirAB TIC10381 presentadas como la SEQ ID NO:98. El bioensayo usando TIC10364 y TIC10373 derivados de célula hospedadora microbiana no demostró actividad contra los insectos usados en el ensayo. Sin embargo, el bioensayo usando la proteína de fusión PirAB TIC10378 - compuesta por TIC10364 y TIC10373 - demostró actividad contra las especies de coleópteros NCR y WCR, y la especie de hemípteros NBSB.

[00220] Un operón que contiene dos ORF que codifica la proteína PirA, TIC10359 (SEQ ID NO:99) y la proteína PirB, TIC10368 (SEQ ID NO:101) se descubrió en el ADN obtenido de *Xenorhabdus nematophila* que codifica las toxinas de proteína presentadas como la SEQ ID NO:100 y SEQ ID NO:102, respectivamente. Una secuencia de operones que comprende tanto TIC10359 como TIC10368 se presenta como la SEQ ID NO:103.

[00221] Un operón que contiene dos ORF que codifica la proteína PirA, PirA_ABE68878 (SEQ ID NO:104) y la proteína PirB, PirB_ABE68879 (SEQ ID NO:106) se descubrió en el

ADN obtenido de *Photorhabdus luminescens* cepa Hm que codifica las toxinas de proteína presentadas como la SEQ ID NO:105 y SEQ ID NO:107, respectivamente. Los dos ORF se usaron para elaborar una secuencia de ADN que codifica la proteína de fusión PirAB, TIC10434 (SEQ ID NO:108) donde las dos secuencias de codificación estaban unidas de manera operativa y en marco para producir la proteína de fusión PirAB TIC10378 presentadas como la SEQ ID NO:109. El bioensayo usando la proteína de fusión PirAB derivada de célula hospedadora microbiana TIC10434 - compuesta por PirA_ABE68878 y PirB_ABE68879 - demostró actividad contra las especies de coleópteros NCR y WCR.

[00222] Un operón que contiene el ORF de proteína PirB que codifica TIC11505 (SEQ ID NO:134) se descubrió de *Xenorhabdus nematophila* cepa MDI-0035777 que codifica la toxina de proteína presentada como la SEQ ID NO:135. La secuencia que codifica la proteína de fusión PirAB TIC11056 (SEQ ID NO:136) comprendía la secuencia de codificación TIC10364 unida de manera operativa en marco con la secuencia de codificación TIC11505 para producir la proteína de fusión PirAB TIC11506 presentada como la SEQ ID NO:137.

[00223] Un operón que contiene el ORF de proteína PirB que codifica TIC11510 (SEQ ID NO:138) se descubrió de *Xenorhabdus nematophila* cepa MDI-0035777 que codifica la toxina de proteína presentada como la SEQ ID NO:139. La secuencia que codifica la proteína de fusión PirAB TIC11512 (SEQ ID NO:140) comprendía la secuencia de codificación TIC10364 unida de manera operativa en marco con la secuencia de codificación TIC11505 para producir la proteína de fusión PirAB TIC11056 presentada como la SEQ ID NO:141.

[00224] Un operón que contiene el ORF de proteína PirB que codifica TIC11511 (SEQ ID NO:142) se descubrió de *Xenorhabdus nematophila* cepa MDI-0035777 que codifica la toxina de proteína presentada como la SEQ ID NO:143. La secuencia que codifica la proteína de fusión PirAB TIC11513 (SEQ ID NO:144) comprendía la secuencia de codificación TIC10364 unida de manera operativa en marco con la secuencia de codificación TIC11513 para producir la proteína de fusión PirAB TIC11056 presentada como la SEQ ID NO:145.

[00225] Las proteínas de fusión PirAB, TIC11210, TIC11211, y TIC11301 comprendían la proteína PirA TIC7575 y las proteínas PirB, TIC7665, TIC7667, y TIC7661, respectivamente. La proteína de fusión PirAB TIC11212 comprende la proteína PirA TIC7662, y la proteína PirB TIC7665. La proteína de fusión PirAB TIC11302 comprende la proteína PirA, TIC7660, y la proteína PirB, TIC7576. Las proteínas de fusión PirAB TIC11210 y TIC11211 demostraron actividad contra las especies de lepidópteros SWCB, y la especie de hemípteros NBSB. Las proteínas de fusión PirAB TIC11301 y TIC11302 demostraron actividad contra las especies de lepidópteros SWCB, ECB, y VBC, la especie de coleópteros WCR, y las especies de hemípteros NBSB, y WTP.

[00226] Las proteínas de fusión PirAB, TIC11103 y TIC11104 comprendían una proteína PirB congruente con una proteína PirA. La proteína de fusión PirAB TIC11103 está compuesta por la proteína PirB TIC7661, y la proteína PirA, TIC7660. La proteína de fusión PirAB TIC11104 está compuesta por la proteína PirB TIC7663, y la proteína PirA, TIC7662.

[00227] La proteína de fusión PirAB TIC11140 está compuesta por una duplicación de la proteína PirA TIC4771, y la proteína PirB TIC4472. La proteína de fusión PirAB TIC11141 está compuesta por la proteína PirA TIC7575 y la proteína PirB, TIC7576. La proteína de fusión PirAB TIC11142 está compuesta por las proteínas PirA, TIC7575 y TIC4771, y la proteína PirB TIC4772. La proteína de fusión PirAB TIC11443 está compuesta por las proteínas PirA TIC7660 y TIC7575 y la proteína PirB, TIC7576. La proteína de fusión PirAB TIC11444 está compuesta por las proteínas PirA TIC7575 y TIC7660 y la proteína PirB TIC7661. La proteína de fusión PirAB TIC11445 está compuesta por las proteínas PirA TIC7660 y TIC7662 y la proteína PirB TIC7663. La proteína de fusión PirAB TIC11446 está compuesta por las proteínas PirA TIC7662 y TIC7660 y la proteína PirB TIC7661. TIC11442 derivada de célula hospedadora bacteriana demostró actividad contra la especie de plaga de hemípteros NBSB. TIC11444 derivado de célula hospedadora bacteriana demostró actividad contra las especies de lepidópteros SWCB, y la especie de hemípteros NBSB.

[00228] Tal como se describe en los Ejemplos, las secuencias de ADN sintético que codifican las proteínas de fusión PirAB TIC6880PL (SEQ ID NO:49), TIC9316 (SEQ ID

NO:51), TIC9317 (SEQ ID NO:53), TIC9318 (SEQ ID NO:55), TIC9320 (SEQ ID NO:57), TIC9322 (SEQ ID NO:59), TIC10376PL (SEQ ID NO:146), TIC10378PL (SEQ ID NO:148), TIC10380PL (SEQ ID NO:150), TIC10381PL (SEQ ID NO:152), TIC11103 (SEQ ID NO:154), TIC11104 (SEQ ID NO:156), y TIC11302 (SEQ ID NO:158) se diseñaron para la expresión en una célula vegetal. Las plantas de maíz transformadas con construcciones de plásmidos de transformación binaria que expresan TIC9316, TIC9317, y TIC9318 demostraron actividad contra las especies de plagas de insectos barrenador europeo del maíz y barrenador del maíz del suroeste.

[00229] Para la expresión en células vegetales, las proteínas de fusión PirAB pueden expresarse para residir en el citosol o dirigirse a varios orgánulos de la célula vegetal. Por ejemplo, dirigir una proteína al cloroplasto puede dar como resultado mayores niveles de la proteína expresada en una planta transgénica y al mismo tiempo evita que se produzcan fenotipos erróneos. El direccionamiento también puede dar como resultado un aumento en la eficacia de resistencia a plagas en un evento transgénico. Un péptido objetivo o péptido de tránsito es una cadena de péptidos corta (3-70 aminoácidos de longitud) que dirige el transporte de una proteína a una región específica en la célula, que incluye el núcleo, mitocondria, retículo endoplasmático (RE), cloroplasto, apoplasto, peroxisoma y membrana plasmática. Algunos péptidos objetivo se escinden mediante peptidasas de señal luego de que las proteínas se transportan. Para el direccionamiento al coloroplasto, las proteínas contienen péptidos de tránsito que tienen alrededor de 40-50 aminoácidos. Para descripciones del uso de los péptidos de tránsito de cloroplasto véanse las patentes estadounidenses 5,188,642 y 5,728,925. Muchas proteínas localizadas en el cloroplasto se expresan a partir de genes nucleares como precursores y se dirigen al cloroplasto mediante un péptido de tránsito de cloroplastos (CTP, por sus siglas en inglés). Los ejemplos de dichas proteínas de cloroplastos aislados incluyen, de modo no taxativo, las asociadas a la subunidad pequeña (SSU) de ribulosa-1,5,-bisfosfato carboxilasa, ferredoxina, oxidorreductasa de ferredoxina, el complejo de cultivo ligero proteína I y proteína II, tiorredoxina F, enolpiruvil shiquimato fosfato sintasa (EPSPS), y péptidos de tránsito descritos en la patente estadounidense n.° 7,193,133. Se ha demostrado *in vivo* e *in vitro* que las proteínas que no son cloroplastos pueden dirigirse al cloroplasto mediante el uso de proteínas de fusión con un CTP heterólogo y que el CTP es

suficiente para dirigir una proteína al cloroplasto. Se ha demostrado que la incorporación de un péptido de tránsito de cloroplastos adecuado tal como el *Arabidopsis thaliana* EPSPS CTP (CTP2) (*See,* Klee *et al.*, *Mol. Gen. Genet.* 210:437-442, 1987) o el *Petunia hybrida* EPSPS CTP (CTP4) (*See,* della-Cioppa *et ál.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:6873-6877, 1986) dirige secuencias de proteínas EPSPS heterólogas a cloroplastos en plantas transgénicas (véanse las patentes estadounidenses n.° 5,627,061; 5,633,435; y 5,312,910; y EP 0218571; EP 189707; EP 508909; y EP 924299). Para dirigir una de las proteínas de fusión PirAB al cloroplasto, una secuencia que codifica un péptido de tránsito de cloroplastos se coloca 5´ en unión operable y en marco con una secuencia de codificación sintética de una de las proteínas de fusión PirAB que ha sido diseñada para la expresión óptima en células vegetales.

[00230] Se contempla que secuencias de proteína de toxina adicionales relacionadas con las proteínas PirA, las proteínas PirB, y las proteínas de fusión PirAB pueden crearse mediante el uso de la secuencia de aminoácidos de origen natural de las proteínas PirA, las proteínas PirB Proteins, y las proteínas de fusión PirAB para combinar diferencias a nivel de secuencia de aminoácidos en variantes de secuencia de aminoácidos novedosas y hacer cambios adecuados en la secuencia de aminoácidos recombinante que codifica las variantes.

[00231] La presente descripción contempla además que las variantes mejoradas de proteínas PirA, las proteínas PirB, y las proteínas de fusión PirAB pueden modificarse genéticamente *in planta* mediante el uso de varios métodos de edición de genes conocidos en la técnica. Dichas tecnologías usadas para la edición del genoma incluyen, de modo no taxativo, ZFN (nucleasa de dedos de cinc), meganucleasas, TALEN (nucleasas efectoras de tipo activador de transcripción), y sistemas CRISPR (repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas)/Cas (asociados a CRISPR). Estos métodos de edición del genoma se pueden utilizar para alterar la secuencia de codificación de proteínas de toxina transformada dentro de una célula vegetal en una secuencia de codificación de toxina diferente. Específicamente, a través de estos métodos, uno o más codones dentro de la secuencia de codificación de toxina se altera para modificar genéticamente una secuencia de aminoácidos de proteína nueva. De manera alternativa, se reemplaza o elimina un fragmento dentro de la secuencia de codificación, o se insertan fragmentos de ADN adicionales en la

secuencia de codificación, para modificar genéticamente una nueva secuencia de codificación de toxina. La nueva secuencia de codificación puede codificar una proteína de toxina con propiedades nuevas tales como mayor actividad o espectro contra las plagas de insectos, así como también proporcionar actividad contra una especie de plaga de insectos donde se ha desarrollado resistencia contra la proteína de toxina para insectos original. La célula vegetal que comprende la secuencia de codificación de toxina con edición génica se puede utilizar mediante métodos conocidos en la técnica para generar plantas enteras que expresan la nueva proteína de toxina.

[00232] Las proteínas que se parecen a las proteínas PirA, las proteínas PirB, y las proteínas de fusión PirAB se pueden identificar mediante comparación entre sí usando varios algoritmos basados en computadora conocidos en la técnica. Por ejemplo, las identidades de secuencia de aminoácidos de proteínas relacionadas con las proteínas PirA, las proteínas PirB, y las proteínas de fusión PirAB se pueden analizar usando una alineación de Clustal W usando estos parámetros por defecto: Matriz de ponderación: blosum, Penalización para abertura de hueco: 10,0; Penalización para la extensión de hueco: 0,05, Huecos hidrofílicos: Encendido, Residuos hidrofílicos: GPSNDQERK, Penalizaciones de hueco específicas del residuo: Encendido (Thompson, *et al* (1994) Nucleic Acids Research, 22:4673-4680). El porcentaje de identidad de aminoácido se calcula adicionalmente mediante el producto de 100% multiplicado por (identidades de aminoácidos/longitud de proteína sujeto). Otros algoritmos de alineación también están disponibles en la técnica y proporcionan resultados similares a los obtenidos usando una alineación de Clustal W.

[00233] Se pretende que una proteína que exhibe actividad inhibidora de insectos contra una especie de insectos de lepidópteros, o coleópteros, o hemípteros se relacione con las proteínas PirA si la alineación de dicha proteína de consulta con TIC7939 exhibe al menos 65 % a alrededor de 100 % de identidad de aminoácidos a lo largo de la longitud de la proteína de consulta que tiene alrededor de 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100% de identidad de secuencia de aminoácidos (o cualquier fracción de un porcentaje en este intervalo) entre proteína de

consulta y sujeto; o si la alineación de dicha proteína de consulta con TIC7664 o TIC7666 exhibe al menos 97% a alrededor de 100% de identidad de aminoácidos a lo largo de la longitud de la proteína de consulta que tiene alrededor de 97%, 98%, 99%, 100% de identidad de secuencia de aminoácidos (o cualquier fracción de un porcentaje en este intervalo) entre proteína de consulta y sujeto; o si la alineación de dicha proteína de consulta con TIC4771 exhibe al menos 98% a alrededor de 100% de identidad de aminoácidos a lo largo de la longitud de la proteína de consulta que tiene alrededor de 98%, 99%, 100% de identidad de secuencia de aminoácidos (o cualquier fracción de un porcentaje en este intervalo) entre proteína de consulta y sujeto; o si la alineación de dicha proteína de consulta con TIC7575, TIC7660, TIC7662, TIC7668, TIC10357, TIC10358, TIC10360, TIC10361, TIC10362, TIC10364, TIC10359, o PirA_ABE68878 exhibe 100% de identidad entre proteína de consulta y sujeto.

[00234] Se pretende también que una proteína que exhibe actividad inhibidora de insectos contra una especie de insectos de lepidópteros, o coleópteros, o hemípteros se relacione con las proteínas PirB si la alineación de dicha proteína de consulta con TIC7940 exhibe al menos 65 % a alrededor de 100 % de identidad de aminoácidos a lo largo de la longitud de la proteína de consulta que tiene alrededor de 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100% de identidad de secuencia de aminoácidos (o cualquier fracción de un porcentaje en este intervalo) entre proteína de consulta y sujeto; o si la alineación de dicha proteína de consulta con TIC4772 exhibe al menos 97% a alrededor de 100% de identidad de aminoácidos a lo largo de la longitud de la proteína de consulta que tiene alrededor de 97%, 98%, 99%, 100% de identidad de secuencia de aminoácidos (o cualquier fracción de un porcentaje en este intervalo) entre proteína de consulta y sujeto; o si la alineación de dicha proteína de consulta con TIC4772 exhibe al menos 97% a alrededor de 100% de identidad de aminoácidos a lo largo de la longitud de la proteína de consulta que tiene alrededor de 97%, 98%, 99%, 100% de identidad de secuencia de aminoácidos (o cualquier fracción de un porcentaje en este intervalo) entre proteína de consulta y sujeto; o si la alineación de dicha proteína de consulta con TIC7665, TIC7667, o TIC10368 exhibe al menos 98% a alrededor de 100% de identidad de

aminoácidos a lo largo de la longitud de la proteína de consulta que tiene alrededor de 98%, 99%, 100% de identidad de secuencia de aminoácidos (o cualquier fracción de un porcentaje en este intervalo) entre proteína de consulta y sujeto; o si la alineación de dicha proteína de consulta con TIC7576, TIC7661, TIC7663, TIC7669, TIC10366, TIC10367, TIC10369, TIC10370, TIC10371, TIC10372, TIC10373, PirB_ABE68879, TIC11510, o TIC11511 exhibe 100% de identidad de secuencia de aminoácidos entre proteína de consulta y sujeto.

[00235] Se pretende también que una proteína que exhibe actividad inhibidora de insectos contra una especie de insectos de lepidópteros, o coleópteros, o hemípteros se relacione con las proteínas PirAB si la alineación con dicha proteína de consulta con TIC9321, TIC11411, TIC11443, TIC11444, TIC11445, TIC11446, TIC11513 exhibe al menos 65% a alrededor de 100% identidad de aminoácidos a lo largo de la longitud de la proteína de consulta que tiene alrededor de 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100% de identidad de secuencia de aminoácidos (o cualquier fracción de un porcentaje en este intervalo) entre proteína de consulta y sujeto; o si la alineación de dicha proteína de consulta con TIC10434, TIC11440, o TIC11442 exhibe al menos 70% a alrededor de 100% de identidad de aminoácidos a lo largo de la longitud de la proteína de consulta que tiene alrededor de 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100% de identidad de secuencia de aminoácidos (o cualquier fracción de un porcentaje en este intervalo) entre proteína de consulta y sujeto; o si la alineación de dicha proteína de consulta con TIC9316, TIC9317, TIC9318, TIC9322, TIC9320, TIC10375, TIC10376, TIC10377, TIC10378, TIC10379, TIC10381, TIC11211, TIC11301, TIC11302, TIC10376PL, TIC10378PL, TIC10381PL, TIC11103, o TIC11104 exhibe al menos 80% a alrededor de 100% de identidad de aminoácidos a lo largo de la longitud de la proteína de consulta que tiene alrededor de 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100% de identidad de secuencia de aminoácidos (o cualquier fracción de un porcentaje en este intervalo) entre proteína de consulta y sujeto; o si la alineación de dicha proteína de consulta con TIC9319, TIC10380, TIC11210, TIC11212, o TIC10380PL exhibe al

menos 82% a alrededor de 100% de identidad de aminoácidos a lo largo de la longitud de la proteína de consulta que tiene alrededor de 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100% de identidad de secuencia de aminoácidos (o cualquier fracción de un porcentaje en este intervalo) entre proteína de consulta y sujeto; o si la alineación de dicha proteína de consulta con TIC6880 o TIC6880PL exhibe al menos 86% a alrededor de 100% de identidad de aminoácidos a lo largo de la longitud de la proteína de consulta que tiene alrededor de 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100% de identidad de secuencia de aminoácidos (o cualquier fracción de un porcentaje en este intervalo) entre proteína de consulta y sujeto; o si la alineación de dicha proteína de consulta con TIC11506 o TIC11512 exhibe al menos 94% a alrededor de 100% de identidad de aminoácidos a lo largo de la longitud de la proteína de consulta que tiene alrededor de 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100% de identidad de secuencia de aminoácidos (o cualquier fracción de un porcentaje en este intervalo) entre proteína de consulta y sujeto.

[00236] Las proteínas PirA de ejemplo TIC4771, TIC7575, TIC7660, TIC7662, TIC7664, TIC7666, TIC7668, TIC7939, TIC10357, TIC10358, TIC10360, TIC10361, TIC10362, TIC10363, TIC10364, TIC10359, y PirA_ABE68878 se alinearon entre sí usando un algoritmo Clustal W. Se creó una matriz en pares del porcentaje de identidad de secuencias de aminoácidos para cada una de las proteínas de longitud completa, tal como se informa en las Tablas 4 y 5.

Tabla 4. Presentación de matriz en pares de proteínas PirA.

Secuencia	TIC7666	TIC7668	PirA_ABE68878	TIC10360	TIC7660	TIC10361	TIC7662	TIC10364
TIC7666	-	94,7	92,5	85,7	51,1	48,1	48,1	49,6
TIC7668	94,7	-	94	88,7	51,1	49,6	48,9	50,4
PirA_ABE68878	89,1	90,6	-	81,2	47,8	46,4	47,1	48,6
TIC10360	85,7	88,7	84,2	-	50,4	50,4	52,6	52,6
TIC7660	48,2	48,2	46,8	47,5	-	93,6	75,2	71,6
TIC10361	44,8	46,2	44,8	46,9	92,3	-	75,5	73,4
TIC7662	45,4	46,1	46,1	49,6	75,2	76,6	-	85,1
TIC10364	46,5	47,2	47,2	49,3	71,1	73,9	84,5	-
TIC7575	43,3	45,4	44	47,5	72,3	73,8	87,2	83,7
TIC4771	45,2	45,9	45,9	48,1	72,6	75,6	75,6	76,3
TIC7664	45,2	45,9	45,9	48,9	70,4	71,9	74,1	74,1
TIC10363	45,3	46	45,3	48,2	71,5	74,5	80,3	78,8
TIC10359	47,4	48,9	47,4	51,1	71,9	71,9	74,1	72,6
TIC7939	35,3	36,7	36	36,7	41,7	42,4	41,7	41,7
TIC10358	40,3	41	41	40,3	36,8	38,2	39,6	37,5
TIC10362	42,6	44,9	44,1	44,9	36,8	37,5	43,4	40,4
TIC10357	23,7	23,7	22,8	24,6	21,9	22,8	26,3	25,4

Tabla 5. Presentación de matriz en pares de proteínas PirA.

Secuencia	TIC7666	TIC7668	PirA_ABE68878	TIC10360	TIC7660	TIC10361	TIC7662	TIC10364
TIC7666	-	94,7	92,5	85,7	51,1	48,1	48,1	49,6
TIC7668	94,7	-	94	88,7	51,1	49,6	48,9	50,4
PirA_ABE68878	89,1	90,6	-	81,2	47,8	46,4	47,1	48,6
TIC10360	85,7	88,7	84,2	-	50,4	50,4	52,6	52,6
TIC7660	48,2	48,2	46,8	47,5	-	93,6	75,2	71,6
TIC10361	44,8	46,2	44,8	46,9	92,3	-	75,5	73,4
TIC7662	45,4	46,1	46,1	49,6	75,2	76,6	-	85,1
TIC10364	46,5	47,2	47,2	49,3	71,1	73,9	84,5	-
TIC7575	43,3	45,4	44	47,5	72,3	73,8	87,2	83,7
TIC4771	45,2	45,9	45,9	48,1	72,6	75,6	75,6	76,3
TIC7664	45,2	45,9	45,9	48,9	70,4	71,9	74,1	74,1
TIC10363	45,3	46	45,3	48,2	71,5	74,5	80,3	78,8
TIC10359	47,4	48,9	47,4	51,1	71,9	71,9	74,1	72,6
TIC7939	35,3	36,7	36	36,7	41,7	42,4	41,7	41,7
TIC10358	40,3	41	41	40,3	36,8	38,2	39,6	37,5
TIC10362	42,6	44,9	44,1	44,9	36,8	37,5	43,4	40,4
TIC10357	23,7	23,7	22,8	24,6	21,9	22,8	26,3	25,4

[00237] Las proteínas PirB de ejemplo TIC4772, TIC7576, TIC7661, TIC7663, TIC7665, TIC7667, TIC7669, y TIC7940 se alinearon entre sí usando un algoritmo Clustal W. Se creó una matriz en pares del porcentaje de identidad de secuencias de aminoácidos para cada una de las proteínas de longitud completa, tal como se informa en las Tablas 6 y 7.

Tabla 6. Presentación de matriz en pares de proteínas PirB.

Secuencia	TIC7667	TIC7669	PirB_ABE68879	TIC10369	TIC7576	TIC10373	TIC7663	TIC7661	TIC10370
TIC7667	-	95,5	93,6	93,3	49,6	48,7	49,6	48,9	49,4
TIC7669	95,5	-	95,7	94,5	50,4	49,6	50,4	49,4	49,9
PirB_ABE68879	93,6	95,7	-	94	50,1	49,2	50,8	49,2	49,9
TIC10369	93,3	94,5	94	-	49,4	48,9	50,4	49,2	49,4
TIC7576	48,9	49,6	49,4	48,7	-	94,8	90,6	87,5	89,9
TIC10373	48	48,9	48,5	48,2	94,8	-	92,7	86,4	87,8
TIC7663	48,9	49,6	50,1	49,6	90,6	92,7	-	84,2	86,1
TIC7661	48,2	48,7	48,5	48,5	87,5	86,4	84,2	-	95,3
TIC10370	48,7	49,2	49,2	48,7	89,9	87,8	86,1	95,3	-
TIC10372	48,4	49,1	48,6	47,9	84,4	82,1	80,9	79,5	80,9
TIC11510	47,1	47,1	47,6	47,6	79,5	79	79,7	77,2	78,3
TIC11511	47,3	47,3	47,8	47,8	80	79,5	80,2	77,6	78,8
TIC10368	47,6	47,6	48	48	80,2	79,7	80,4	77,9	79
TIC11505	47	47	47,5	47,5	79,3	78,8	79,5	77	78,1
TIC4772	47,2	47,9	47,9	47,2	79,7	78,5	79,7	76,2	78
TIC7665	49	49,3	49,5	49,5	81,2	80,2	80,9	78,7	79,7
TIC10367	41,7	42,4	42	42,7	43,2	42,7	43,6	42,7	43,2
TIC10371	45,2	44,7	44,5	45	48,8	48,6	48,1	48,3	48,3

TIC7940	37	38,2	37,7	37	41,5	42,5	43	41,8	42,2
TIC10366	24,8	25,1	24,8	25,8	25,1	24,8	24,4	24,6	25,1

Tabla 7. Presentación de matriz en pares de proteínas PirB.

Secuencia	**TIC10372**	**TIC11510**	**TIC11511**	**TIC10368**	**TIC11505**	**TIC4772**	**TIC7665**	**TIC10367**	**TIC10371**	**TIC7940**	**TIC10366**
TIC7667	49,6	48,2	48,4	48,7	48,7	48,2	48,4	41,5	44,9	37	25,3
TIC7669	50,4	48,2	48,4	48,7	48,7	48,9	48,7	42,2	44,4	38,2	25,5
PirB_ABE68879	49,9	48,7	48,9	49,2	49,2	48,9	48,9	41,8	44,2	37,7	25,3
TIC10369	49,2	48,7	48,9	49,2	49,2	48,2	48,9	42,5	44,6	37	26,3
TIC7576	85,4	80,2	80,7	80,9	80,9	80,2	79,1	42,4	47,8	40,9	25,2
TIC10373	83,1	79,8	80,2	80,5	80,5	79,1	78,1	41,9	47,5	41,9	24,9
TIC7663	81,9	80,5	80,9	81,2	81,2	80,2	78,8	42,8	47,1	42,4	24,5
TIC7661	80,5	77,9	78,4	78,6	78,6	76,7	76,7	41,9	47,3	41,2	24,7
TIC10370	81,9	79,1	79,5	79,8	79,8	78,6	77,6	42,4	47,3	41,6	25,2
TIC10372	-	79,1	79,5	79,8	79,8	78,8	76,5	40,5	47,2	39,8	24,2
TIC11510	79,3	-	99,5	99,3	99,3	86,5	81,6	42,2	46,4	41	24,5
TIC11511	79,7	99,5	-	99,8	99,8	86,9	81,6	42,2	46,9	41	24,2
TIC10368	80	99,3	99,8	-	100	87,2	81,8	42	46,6	41	24

TIC11505	79	98,2	98,6	98,8	-	86,2	80,9	41,5	46,1	40,6	24
TIC4772	79,2	86,7	87,1	87,4	87,4	-	80,8	42,5	47	41,8	24,5
TIC7665	79,5	84,5	84,5	84,8	84,8	83,6	-	43	47,3	41,5	25,8
TIC10367	41,7	43,4	43,4	43,2	43,2	43,6	42,7	-	57,6	35	22,1
TIC10371	48,8	47,8	48,3	48,1	48,1	48,3	47,1	57,7	-	38,2	25,5
TIC7940	40,8	42	42	42	42	42,7	41,1	34,8	37,9	-	24,6
TIC10366	24,4	24,6	24,4	24,1	24,4	24,6	25,1	21,5	24,8	24,1	-

[00238] Las proteínas de fusión PirAB de ejemplo TIC6880, TIC9316, TIC9317, TIC9318, TIC9319, TIC9322, TIC9320, TIC9321, TIC6880PL, TIC10375, TIC10376, TIC10377, TIC10378, TIC10379, TIC10380, TIC10381, TIC10434, TIC11210, TIC11211, TIC11212, TIC11301, TIC11302, TIC11440, TIC11441, TIC11442, TIC11443, TIC11444, TIC11445, TIC11446, TIC11506, TIC11512, TIC11513, TIC10376PL, TIC10378PL, TIC10380PL, TIC10381PL, TIC11103, y TIC11104 se alinearon entre sí usando un algoritmo Clustal W. Se creó una matriz en pares del porcentaje de identidad de secuencias de aminoácidos para cada una de las proteínas de longitud completa, tal como se informa en las Tablas 8, 9, 10 y 11.

Tabla 8. Presentación de matriz en pares de proteínas de fusión PirAB.

Secuencia	TIC9322	TIC9320	TIC10434	TIC10377	TIC11211	TIC6880	TIC11440	TIC6880PL	TIC11442	TIC11506
TIC9322	-	95,3	93,3	91,5	87,3	47,8	47,8	47,8	47,8	48,7
TIC9320	95,3	-	95,3	93,1	84,4	48,6	48,6	48,6	48,6	48,9
TIC10434	92,5	94,4	-	90,8	82	48,1	48,1	48,1	48,1	48,8
TIC10377	91,5	93,1	91,7	-	82,6	48	48	48	48	49,6
TIC11211	86,1	83,2	81,6	81,4	-	52,7	52,7	52,9	52,7	53,4
TIC6880	46,9	47,6	47,6	47,1	52,4	-	99,6	99,8	99,6	85,3
TIC11440	37,8	38,4	38,4	38	42,3	80,4	-	80,2	95,6	68,8
TIC6880PL	46,8	47,5	47,5	47	52,5	99,6	99,3	-	99,3	85,1
TIC11442	37,5	38,1	38,1	37,6	41,9	79,7	94,7	79,5	-	68,2
TIC11506	46,7	46,9	47,2	47,6	51,9	83,3	83,3	83,3	83,3	-
TIC11513	46,9	47,1	47,5	47,8	52,2	83,9	83,9	83,9	83,9	99,8
TIC11512	46,8	46,9	47,3	47,6	52	83,5	83,5	83,5	83,5	99,5
TIC11210	47,2	47,7	47,6	48,3	55,5	81,1	81,1	81,1	81,1	84,7
TIC11212	47,2	47,6	47,7	48,5	54,2	80,9	80,9	80,9	80,9	84,7
TIC9319	47,7	48,1	48,3	48,8	54,3	83,2	83,2	83,1	83,2	82,5
TIC10380	47,8	48,5	48	48,1	53,8	79,2	79,2	79	79,2	79,9
TIC10380P	47,7	48,4	47,9	48,1	53,9	78,9	78,9	79,2	78,9	79,8

Secuencia	TIC9322	TIC9320	TIC10434	TIC10377	TIC11211	TIC6880	TIC11440	TIC6880PL	TIC11442	TIC11506
L										
TIC10381	47,4	48,3	48	48,1	52,7	78	78	78	78	84,8
TIC10381PL	47,4	48,2	47,9	48,1	52,6	77,8	77,8	77,8	77,8	84,5
TIC9318	47,5	48,2	48,6	48,9	54,4	78,4	78,4	78,4	78,4	81,8
TIC11445	38	38,6	38,9	39,2	43,6	62,8	76,5	62,8	77,2	65,5
TIC9316	47,5	48,4	47,9	48,1	56	79	79	79	79	81,3
TIC11441	38	38,8	38,3	38,5	44,8	63,2	77,8	63,2	82,9	65,1
TIC11302	48,1	48,8	48,1	48,1	52,3	77,7	77,7	77,7	77,7	78,3
TIC11443	38,5	39	38,5	38,5	41,9	62,2	62,2	62,2	62,2	62,7
TIC9317	47,5	48,1	47,3	47,9	51,6	75,4	75,4	75,4	75,4	76,9
TIC11446	38	38,5	37,9	38,3	41,3	60,4	74,8	60,4	77,5	61,5
TIC11444	38	38,5	37,9	38,3	41,3	60,4	75	60,4	80,1	61,5
TIC11301	46,8	47,5	47	47,7	54,9	76,5	76,5	76,5	76,5	80
TIC10378	47,7	48,6	48,1	48,4	51,8	76,9	76,9	76,9	76,9	78
TIC10378PL	47,6	48,5	48	48,3	51,7	76,8	76,8	76,8	76,8	77,7
TIC11103	36,2	36,6	36,4	36,4	36,2	58,1	58,1	58,1	58,1	59

Secuencia	TIC9322	TIC9320	TIC10434	TIC10377	TIC11211	TIC6880	TIC11440	TIC6880PL	TIC11442	TIC11506
TIC11104	36,7	37,3	37,6	37,3	36,7	60,1	60,1	60,1	60,1	60,6
TIC10376	41,2	41,9	41,5	41,9	40,8	41,9	41,9	41,9	41,9	41,5
TIC10376PL	41,1	41,8	41,5	41,8	40,7	41,8	41,8	41,8	41,8	41,5
TIC10379	43,7	43,7	43,7	43,5	43,1	46,2	46,2	46,2	46,2	46,6
TIC9321	36,4	37,5	37,3	36,2	37,6	42,1	42,1	42,1	42,1	41,2
TIC10375	24,4	24,6	24,2	25,3	24,2	23,7	23,7	23,7	23,7	23,3

Tabla 9. Presentación de matriz en pares de proteínas de fusión PirAB.

Secuencia	TIC11513	TIC11512	TIC11210	TIC11212	TIC9319	TIC10380	TIC10380PL	TIC10381	TIC10381PL	TIC9318
TIC9322	48,6	48,4	47,5	47,5	47,5	49,1	49,1	48,7	48,7	48,7
TIC9320	48,7	48,6	48	47,8	47,8	49,8	49,8	49,6	49,6	49,5
TIC10434	48,7	48,5	47,4	47,6	47,6	48,8	48,8	48,8	48,8	49,4
TIC10377	49,5	49,3	48,6	48,7	48,6	49,5	49,5	49,5	49,5	50,2
TIC11211	53,2	53	55	53,8	53,2	54,5	54,6	53,4	53,4	55
TIC6880	85,1	84,7	79,9	79,8	81,2	79,8	79,6	78,5	78,5	78,9
TIC11440	68,6	68,3	64,5	64,3	65,5	64,3	64,2	63,3	63,3	63,6
TIC6880PL	84,9	84,6	79,8	79,6	80,9	79,4	79,8	78,4	78,4	78,7
TIC11442	68	67,8	63,9	63,8	64,9	63,8	63,6	62,8	62,8	63,1
TIC11506	99	98,6	81,6	81,6	78,6	78,6	78,6	83,5	83,3	80,4
TIC11513	-	99,6	82,1	82,1	79,2	79,2	79,2	84,1	83,9	80,9
TIC11512	99,6	-	82,1	82,1	79,2	78,8	78,8	83,7	83,5	80,6
TIC11210	84,5	84,5	-	96,8	93,2	79,1	79,1	80,9	80,7	82,2
TIC11212	84,5	84,5	96,8	-	92,8	79,3	79,3	80,9	80,7	85,2
TIC9319	82,3	82,3	94,2	93,8	-	79,4	79,2	78,7	78,7	79,2
TIC10380	79,7	79,4	77,4	77,6	76,9	-	99,8	81,7	81,7	81,1
TIC10380P	79,6	79,2	77,3	77,5	76,6	99,6	-	81,5	81,5	81

Secuencia	TIC11513	TIC11512	TIC11210	TIC11212	TIC9319	TIC10380	TIC10380PL	TIC10381	TIC10381PL	TIC9318
L										
TIC10381	84,7	84,3	79,2	79,2	76,2	81,7	81,7	-	99,8	90,7
TIC10381PL	84,3	84	78,9	78,9	76,1	81,5	81,5	99,6	-	90,3
TIC9318	81,6	81,3	80,6	83,6	76,9	81,3	81,3	90,8	90,6	-
TIC11445	65,3	65,1	64,5	66,9	61,5	65,1	65,1	72,7	72,6	80,1
TIC9316	81,1	80,7	83,4	80,4	77,2	83,7	83,7	92	91,9	89,8
TIC11441	64,9	64,6	66,8	64,4	61,8	67	67	73,7	73,6	71,9
TIC11302	78,1	77,7	77,2	77,7	76,1	81,6	81,6	89	88,9	86,7
TIC11443	62,5	62,2	61,8	62,2	61	65,3	65,3	71,3	71,1	69,4
TIC9317	76,7	76,3	75,8	76,1	74,4	77,9	77,9	82,7	82,5	82
TIC11446	61,4	61,1	60,7	61	59,5	62,4	62,4	66,2	66,1	65,6
TIC11444	61,4	61,1	60,7	61	59,5	62,4	62,4	66,2	66,1	65,6
TIC11301	79,9	79,5	82,3	79,2	75,6	79,9	79,9	85,9	85,7	84,8
TIC10378	77,8	77,5	76,6	76,9	75,4	79,4	79,4	84,3	84,2	83,5
TIC10378PL	77,5	77,2	76,3	76,6	75,2	79,3	79,3	84	84,4	83,1
TIC11103	58,8	58,5	57,4	57,4	57,4	60,4	60,4	64,8	64,8	63,3

Secuencia	TIC11513	TIC11512	TIC11210	TIC11212	TIC9319	TIC10380	TIC10380PL	TIC10381	TIC10381PL	TIC9318
TIC11104	60,4	60,1	59	59	59	61,5	61,5	69,6	69,6	75,1
TIC10376	41,7	41,7	41,4	41,7	40,8	40,6	40,6	41,5	41,5	42,8
TIC10376PL	41,6	41,6	41,3	41,6	40,7	40,6	40,6	41,5	41,5	42,7
TIC10379	46,7	46,4	45,5	46,6	45,3	47,1	47,1	46,9	46,7	47,3
TIC9321	41,2	41,2	40,3	40,9	40,9	41	41	41,9	41,9	42,5
TIC10375	23,5	23,7	24,6	24,6	25	24,2	24,2	24,2	24,2	24

Tabla 10. Presentación de matriz en pares de proteínas de fusión PirAB.

Secuencia	TIC11445	TIC9316	TIC11441	TIC11302	TIC11443	TIC9317	TIC11446	TIC11444	TIC11301
TIC9322	48,7	48,7	48,7	49,3	49,3	48,7	48,7	48,7	48
TIC9320	49,5	49,6	49,6	50	50	49,3	49,3	49,3	48,7
TIC10434	49,4	48,7	48,7	48,8	48,8	48,1	48,1	48,1	47,8
TIC10377	50,2	49,3	49,3	49,3	49,3	49,1	49,1	49,1	48,9
TIC11211	55	56,6	56,6	52,9	52,9	52,1	52,1	52,1	55,5
TIC6880	78,9	79,4	79,4	78,2	78,2	75,8	75,8	75,8	76,9
TIC11440	77,5	64	78,8	63	63	61,2	75,8	75,9	62
TIC6880PL	78,7	79,3	79,3	78	78	75,7	75,7	75,7	76,8
TIC11442	77,6	63,5	83,2	62,5	62,5	60,7	77,8	80,4	61,5
TIC11506	80,4	79,9	79,9	76,9	76,9	75,5	75,5	75,5	78,6
TIC11513	80,9	80,4	80,4	77,4	77,4	76	76	76	79,2
TIC11512	80,6	80	80	77,1	77,1	75,7	75,7	75,7	78,8
TIC11210	82,2	85	85	78,7	78,7	77,3	77,3	77,3	84
TIC11212	85,2	82	82	79,3	79,3	77,7	77,7	77,7	80,7
TIC9319	79,2	79,6	79,6	78,5	78,5	76,7	76,7	76,7	78
TIC10380	81,1	83,6	83,6	81,5	81,5	77,8	77,8	77,8	79,7
TIC10380PL	81	83,5	83,5	81,3	81,3	77,6	77,6	77,6	79,6
TIC10381	90,7	91,9	91,9	88,9	88,9	82,5	82,5	82,5	85,7

Secuencia	TIC11445	TIC9316	TIC11441	TIC11302	TIC11443	TIC9317	TIC11446	TIC11444	TIC11301
TIC10381PL	90,3	91,5	91,5	88,6	88,6	82,2	82,2	82,2	85,4
TIC9318	100	89,8	89,8	86,7	86,7	82	82	82	84,8
TIC11445	-	71,9	86,6	69,4	69,4	65,6	80,6	80,3	67,9
TIC9316	89,8	-	100	93,5	93,5	83,9	83,9	83,9	90,1
TIC11441	86,6	80,1	-	74,8	74,8	67,2	84,6	87,1	72,1
TIC11302	86,7	93,5	93,5	-	100	90,1	90,1	90,1	83,9
TIC11443	69,4	74,8	74,8	80,1	-	72,1	72,1	72,1	67,2
TIC9317	82	83,9	83,9	90,1	90,1	-	100	100	93,5
TIC11446	80,6	67,2	84,6	72,1	72,1	80,1	-	97,5	74,8
TIC11444	80,3	67,2	87,1	72,1	72,1	80,1	97,5	-	74,8
TIC11301	84,8	90,1	90,1	83,9	83,9	93,5	93,5	93,5	-
TIC10378	83,5	85,7	85,7	90,3	90,3	94,4	94,4	94,4	90
TIC10378PL	83,1	85,4	85,4	90	90	94	94	94	89,6
TIC11103	63,3	65,7	65,7	65,7	65,7	75,1	75,1	75,1	75,1
TIC11104	75,1	68	68	68	68	63,3	63,3	63,3	63,3
TIC10376	42,8	42,1	42,1	41,7	41,7	41,4	41,4	41,4	41,7
TIC10376PL	42,7	42	42	41,6	41,6	41,3	41,3	41,3	41,6
TIC10379	47,3	46,9	46,9	46	46	45,7	45,7	45,7	46,4
TIC9321	42,5	40,9	40,9	41,2	41,2	41,4	41,4	41,4	41

Secuencia	TIC11445	TIC9316	TIC11441	TIC11302	TIC11443	TIC9317	TIC11446	TIC11444	TIC11301
TIC10375	24	24,6	24,6	24	24	23,7	23,7	23,7	24,2

Tabla 11. Presentación de matriz en pares de proteínas de fusión PirAB.

Secuencia	TIC10378	TIC10378PL	TIC11103	TIC11104	TIC10376	TIC10376PL	TIC10379	TIC9321	TIC10375
TIC9322	49,1	49,1	37,1	37,7	41,8	41,8	43,7	36,8	23,9
TIC9320	50	50	37,5	38,2	42,6	42,6	43,7	37,9	24,1
TIC10434	49	49	37	38,2	41,8	41,8	43,3	37,3	23,5
TIC10377	49,8	49,8	37,3	38,2	42,6	42,6	43,5	36,6	24,8
TIC11211	52,5	52,5	36,6	37,1	40,9	40,9	42,5	37,5	23,4
TIC6880	77,6	77,6	58,4	60,4	41,7	41,7	45,3	41,7	22,7
TIC11440	62,6	62,6	47,1	48,7	33,7	33,7	36,5	33,7	18,3
TIC6880PL	77,5	77,5	58,3	60,3	41,7	41,7	45,2	41,7	22,7
TIC11442	62,1	62,1	46,7	48,3	33,4	33,4	36,2	33,4	18,2
TIC11506	76,9	76,7	58	59,5	40,5	40,5	44,6	39,9	21,9
TIC11513	77,4	77,2	58,3	59,9	41	41	45,2	40,3	22,2
TIC11512	77,1	76,9	58	59,5	41	41	44,8	40,3	22,4
TIC11210	78,4	78,2	58,6	60,2	41,8	41,8	45,2	40,5	24
TIC11212	78,7	78,6	58,6	60,2	42,2	42,2	46,3	41,1	24
TIC9319	78	78	59,2	60,8	41,7	41,7	45,5	41,5	24,6
TIC10380	79,5	79,5	60,3	61,4	40,2	40,2	45,9	40,4	23,1
TIC10380PL	79,4	79,4	60,2	61,3	40,1	40,1	45,8	40,3	23,1
TIC10381	84,5	84,3	64,7	69,5	41,1	41,1	45,7	41,3	23,1

Secuencia	TIC10378	TIC10378PL	TIC11103	TIC11104	TIC10376	TIC10376PL	TIC10379	TIC9321	TIC10375
TIC10381PL	84,2	84,5	64,6	69,4	41	41	45,4	41,2	23,1
TIC9318	83,7	83,6	63,3	75,1	42,4	42,4	46,1	41,9	23
TIC11445	67	66,9	50,6	60,1	33,9	33,9	36,9	33,5	18,4
TIC9316	86	85,9	65,7	68	41,7	41,7	45,8	40,3	23,5
TIC11441	68,9	68,7	52,6	54,5	33,4	33,4	36,6	32,2	18,8
TIC11302	90,6	90,5	65,7	68	41,3	41,3	44,9	40,6	23
TIC11443	72,6	72,4	52,6	54,5	33,1	33,1	35,9	32,5	18,4
TIC9317	94,7	94,5	75,1	63,3	41	41	44,5	40,8	22,6
TIC11446	75,8	75,7	60,1	50,6	32,8	32,8	35,6	32,7	18,1
TIC11444	75,8	75,7	60,1	50,6	32,8	32,8	35,6	32,7	18,1
TIC11301	90,3	90,1	75,1	63,3	41,3	41,3	45,2	40,5	23,1
TIC10378	-	99,8	71,3	64,4	41,5	41,5	44,5	41,4	23,1
TIC10378PL	99,6	-	71,2	64,3	41,5	41,5	44,3	41,3	23
TIC11103	71,6	71,6	-	82	31,6	31,6	35,7	30,9	18,4
TIC11104	64,7	64,7	82	-	32,3	32,3	35,5	31,8	18,2
TIC10376	42,1	42,1	31,9	32,6	-	99,8	54,9	34,8	21,6
TIC10376PL	42	42	31,9	32,6	99,6	-	54,8	34,7	21,5
TIC10379	45,8	45,7	36,6	36,4	55,8	55,8	-	37,1	24,5
TIC9321	42,1	42,1	31,4	32,3	34,9	34,9	36,7	-	22

Secuencia	TIC10378	TIC10378PL	TIC11103	TIC11104	TIC10376	TIC10376PL	TIC10379	TIC9321	TIC10375
TIC10375	24,2	24,2	19,2	19	22,4	22,4	25	22,7	-

[00239] Además del porcentaje de identidad, las proteínas PirA, las proteínas PirB, y las proteínas de fusión PirAB también pueden relacionarse por la estructura primaria (motivos de aminoácidos conservados), por longitud (alrededor de 133 a alrededor de 141 aminoácidos para PirA; alrededor de 414 a alrededor de 428 aminoácidos durante PirB; alrededor de 549 a alrededor de 566 aminoácidos para las proteínas de fusión PirAB) y por otras características. Las características de las proteínas PirA, las proteínas PirB, y las proteínas de fusión PirAB se informan en la Tabla 12.

Tabla 12. Características seleccionadas de las proteínas PirA, proteínas PirB, y proteínas de fusión PirAB.

Proteína	Peso Molecu-lar (en Dal-tons)	Longi-tud de ami-noáci-dos	Punto Iso-eléctri-co	Carga a PH 7,0	Canti-dad de amino-ácidos fuerte-mente básicos (-)	Canti-dad de amino-ácidos fuerte-mente ácidos	Canti-dad de amino-ácidos hidrofó-bicos	Canti-dad de amino-ácidos polares
TIC4771	14963,57	135	5,6164	-1,5	14	14	65	70
TIC4772	48146,05	428	4,5643	-16,0	41	53	216	212
TIC6880	63092,59	563	4,6836	-17,5	55	67	281	282
TIC6880PL	63163,67	564	4,6836	-17,5	55	67	282	282
TIC7575	15655,22	141	5,0636	-2,0	12	13	68	73
TIC7576	47775,12	425	4,7039	-12,5	44	53	221	204
TIC9316	63412,32	566	4,7572	-14,5	56	66	289	277
TIC7660	15352,83	141	4,5839	-4,0	11	14	72	69
TIC7661	47774,39	425	4,7572	-5,5	50	51	222	203
TIC9317	63109,20	566	5,1542	-9,5	61	65	294	272
TIC7662	15761,42	141	4,6130	-3,5	11	14	68	73
TIC7663	47895,35	425	5,0745	-7,5	48	52	221	204

Proteína	Peso Molecu-lar (en Dal-tons)	Longi-tud de ami-noáci-dos	Punto Iso-eléctri-co	Carga a PH 7,0	Canti-dad de amino-ácidos fuerte-mente básí-cos (-)	Canti-dad de amino-ácí-dos fuerte-mente ácidos	Canti-dad de amino-ácidos hidrofó-bicos	Canti-dad de amino-ácidos polares
TIC9318	63638,76	566	4,9378	-11,0	59	66	289	277
TIC7664	14950,65	135	5,0636	-2,0	12	13	68	67
TIC7665	46819,71	414	4,6887	-12,5	43	52	214	200
TIC9319	61752,34	549	4,7452	-14,5	55	65	282	267
TIC7666	14751,43	133	4,6137	-4,0	12	15	68	65
TIC7667	46246,08	419	5,4603	-5,5	50	51	220	199
TIC9322	60979,49	552	5,1485	-9,5	62	66	288	264
TIC7668	14785,54	133	5,1215	-2,5	14	15	68	65
TIC7669	46249,04	419	5,3001	-6,5	50	52	222	197
TIC9320	61016,56	552	5,2518	-9,0	64	67	290	262
TIC7939	15470,32	139	6,2480	-0,5	15	14	70	69
TIC7940	47493,26	419	4,8783	-11,0	53	60	218	201
TIC9321	62945,57	558	5,0432	-11,5	68	74	288	270
TIC10357	12838,48	114	4,7910	-3,0	11	13	68	46
TIC10366	47691,61	427	4,3657	-22,0	43	62	221	206
TIC10375	60512,07	541	4,4263	-25,0	54	75	289	252
TIC10358	16198,29	144	7,7512	1,5	20	17	68	76
TIC10367	47147,69	417	7,7679	5,5	60	49	222	195
TIC10376	63327,96	561	7,8092	7,0	80	66	290	271
TIC10376PL	63399,04	562	7,8092	7,0	80	66	291	271
TIC10360	14976,76	133	4,8490	-2,5	14	16	64	69

Proteína	Peso Molecu-lar (en Dal-tons)	Longi-tud de ami-noáci-dos	Punto Iso-eléctri-co	Carga a PH 7,0	Canti-dad de amino-ácidos fuerte-mente básí-cos (-)	Canti-dad de amino-ácí-dos fuerte-mente ácidos	Canti-dad de amino-ácidos hidrofó-bicos	Canti-dad de amino-ácidos polares
TIC10369	46322,33	419	5,6804	-4,0	50	50	224	195
TIC10377	61281,07	552	5,3889	-6,5	64	66	288	264
TIC10361	15629,20	143	4,7632	-3,0	11	13	71	72
TIC10370	47710,32	425	5,0742	-8,0	48	52	225	200
TIC10378	63321,51	568	4,9947	-11,0	59	65	296	272
TIC10378PL	63392,59	569	4,9947	-11,0	59	65	297	272
TIC10362	15173,94	136	5,1440	-1,5	13	14	62	74
TIC10371	46947,97	416	5,8572	-3,5	47	46	218	198
TIC10379	62103,90	552	5,6801	-5,0	60	60	280	272
TIC10363	15195,80	137	4,7774	-3,0	11	13	67	70
TIC10372	48400,97	430	4,7717	-11,0	45	53	229	201
TIC10380	63578,76	567	4,7697	-14,0	56	66	296	271
TIC10380PL	63649,84	568	4,7697	-14,0	56	66	297	271
TIC10364	15833,53	142	4,4792	-5,0	11	15	72	70
TIC10373	47791,02	425	4,7003	-12,5	44	53	220	205
TIC10381	63606,54	567	4,6406	-17,5	55	68	292	275
TIC10381PL	63677,62	568	4,6406	-17,5	55	68	293	275
TIC10359	14949,54	135	4,7873	-3,5	12	14	68	67
TIC10368	48194,25	429	4,7481	-11,5	43	51	219	210
PirA_ABE68878	15303,18	138	6,2470	-5,0	15	14	71	67
PirB_ABE68879	46424,34	419	5,2938	-6,5	50	52	224	195

Proteína	Peso Molecu-lar (en Dal-tons)	Longi-tud de ami-noáci-dos	Punto Iso-eléctri-co	Carga a PH 7,0	Canti-dad de amino-ácidos fuerte-mente básicos (-)	Canti-dad de amino-ácidos fuerte-mente ácidos	Canti-dad de amino-ácidos hidrofó-bicos	Canti-dad de amino-ácidos polares
TIC10434	61709,50	557	5,4906	-7,0	65	66	295	262
TIC11103	63109,20	566	5,1542	-9,5	61	65	294	272
TIC11104	63638,76	566	4,9378	-11,0	59	66	289	277
TIC11210	62456,91	555	4,7452	-14,5	55	65	282	273
TIC11211	61883,28	560	5,3591	-7,5	62	64	288	272
TIC11212	62563,12	555	4,6679	-16,0	54	66	282	273
TIC11301	63411,60	566	5,3685	-7,5	62	64	290	276
TIC11302	63109,93	566	4,6735	-16,5	55	67	293	273
TIC11440	78037,15	698	4,7751	-19,0	69	81	346	352
TIC11441	79049,52	707	4,7960	-16,5	68	79	357	350
TIC11442	78728,81	704	4,7287	-19,5	67	80	349	355
TIC11443	78747,13	707	4,7204	-18,5	67	80	361	346
TIC11444	78746,41	707	5,1362	-11,5	73	78	362	345
TIC11445	78973,57	707	4,8575	-15,0	70	80	361	346
TIC11446	78852,61	707	5,0123	-13,0	72	79	362	345
TIC10364	15833,53	142	4,4792	-5,0	11	15	72	70
TIC11505	48750,86	434	4,6998	-12,5	43	52	221	213
TIC11506	64566,38	576	4,6400	-17,5	54	67	293	283
TIC11510	48184,21	429	4,7481	-11,5	43	51	218	211
TIC11512	63999,72	571	4,6730	-16,5	54	66	290	281
TIC11511	48208,27	429	4,7481	-11,5	43	51	219	210

Proteína	Peso Molecu-lar (en Dal-tons)	Longi-tud de ami-noáci-dos	Punto Iso-eléctri-co	Carga a PH 7,0	Canti-dad de amino-ácidos fuerte-mente básí-cos (-)	Canti-dad de amino-ácí-dos fuerte-mente ácidos	Canti-dad de amino-ácidos hidrofó-bicos	Canti-dad de amino-ácidos polares
TIC11513	64023,79	571	4,6730	-16,5	54	66	291	280

[00240] Tal como se describe adicionalmente en los Ejemplos de la presente solicitud, las secuencias de ácido nucleico recombinante que codifican las proteínas de fusión PirAB se diseñaron para usar en plantas. Las secuencias de ácido nucleico recombinante optimizadas para plantas de ejemplo se diseñaron para usar en plantas se presentan como las SEQ ID NO:49, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 146, 148, 150, 152, 154, 156, y 158.

[00241] Los vectores y casetes de expresión que contienen estas secuencias de ácido nucleico recombinante pueden construirse e introducirse en el maíz, soja, algodón u otras células vegetales de acuerdo con métodos y técnicas de transformación conocidas en la técnica. Por ejemplo, la transformación mediada por *Agrobacterium* se describe en las publicaciones de solicitud de patente estadounidense 2009/0138985A1 (soja), 2008/0280361A1 (soja), 2009/0142837A1 (maíz), 2008/0282432 (algodón), 2008/0256667 (algodón), 2003/0110531 (trigo), 2001/0042257 A1 (remolacha azucarera), patentes estadounidenses n.° 5,750,871 (colza), 7,026,528 (trigo), y 6,365,807 (arroz), y en Arencibia *et al.* (1998) Transgenic Res. 7:213-222 (caña de azúcar) las cuales se incorporan a la presente en su totalidad mediante esta referencia. Las células transformadas pueden regenerarse en plantas transformadas que expresan las proteínas de fusión PirAB TIC6880PL, TIC9316, TIC9317, TIC9318, TIC9319, TIC9320, o TIC9322. Para analizar la actividad pesticida, se realizan bioensayos en presencia de larvas de plaga de lepidópteros usando discos de hoja de planta obtenidos de plantas transformadas tal como se describe en los Ejemplos. Para analizar la actividad pesticida contra las plagas de coleópteros, las plantas transformadas de

generación R_o y F_1 se usan en el ensayo de gusano de la raíz tal como se describe en el ejemplo más adelante. Para analizar la actividad pesticida contra las plagas de hemípteros, las vainas, mazorcas de maíz u hojas de plantas transformadas se usan en el ensayo, ya sea de tejido extraído de la planta o que queda en la planta tal como se describe en los Ejemplos.

[00242] Como una alternativa a métodos de transformación tradicionales, una secuencia de ADN, tal como un transgén, casete de expresión, etc., puede insertarse o integrarse en un sitio o locus específico dentro del genoma de una planta o célula vegetal a través de integración dirigida al sitio. Las moléculas y construcciones de ADN recombinante de la presente descripción, por lo tanto, pueden incluir una secuencia plantilla donante que comprende al menos un transgén, casete de expresión, u otra secuencia de ADN para la inserción en el genoma de la planta o célula vegetal. Dicha plantilla donante para la integración dirigida al sitio puede incluir adicionalmente uno o más brazos de homología que flanquean una secuencia de inserción (es decir, la secuencia, transgén, casete, etc., que se insertará en el genoma de la planta). Las construcciones de ADN recombinante de la presente descripción pueden comprender además un casete de expresión que codifica una nucleasa específica del sitio y/o cualquier proteína asociada para llevar a cabo la integración dirigida al sitio. Este casete de expresión de nucleasa puede estar presente en la misma molécula o vector que la plantilla donante (en cis) o en una molécula o vector separado (en trans). En la técnica se conocen varios métodos para la integración dirigida al sitio que implican diferentes proteínas (o complejos de proteínas y/o ARN guía) que cortan el ADN genómico para producir una rotura de doble cadena (DSB, por sus siglas en inglés) o muesca en el sitio genómico o locus deseado. Tal como se entiende en la técnica, durante el proceso de reparación de la DSB o muesca introducida por la enzima nucleasa, el ADN de plantilla donante puede integrarse en el genoma en el sitio de la DSB o muesca. La presencia de los brazos de homología en la plantilla donante puede promover la adopción y direccionamiento de la secuencia de inserción en el genoma de la planta durante el proceso de reparación a través de recombinación homóloga, aunque puede producirse un evento de inserción a través de la unión de extremos no homólogos (NHEJ, por sus siglas en inglés). Los ejemplos de nucleasas específicas del sitio que se pueden utilizar incluyen nucleasas de dedos de cinc, meganucleasas naturales o modificadas genéticamente, endonucleasas TALE, y

endonucleasas guiadas por ARN (por ejemplo, Cas9 o Cpf1). Para métodos que usan nucleasas específicas del sitios guiadas por ARN (por ejemplo, Cas9 o Cpf1), las construcciones de ADN recombinante también comprenderán una secuencia que codifica uno o más ARN guía para dirigir la nucleasa al sitio deseado dentro del genoma de la planta.

[00243] Se contemplan las composiciones de moléculas de ácido nucleico recombinante que codifican las proteínas PirA, las proteínas PirB, o las proteínas de fusión PirAB, o proteínas insecticidas relacionadas. Por ejemplo, las proteínas PirA, las proteínas PirB, o las proteínas de fusión PirAB, o proteínas insecticidas relacionadas pueden expresarse con construcciones de ADN recombinante en las cuales una molécula de polinucleótido con un ORF que codifica la proteína está unida de manera operativa a elementos de expresión genética tal como un promotor y cualquier otro elemento regulador necesario para la expresión en el sistema para el cual se pretende la construcción. Los ejemplos no taxativos incluyen un promotor funcional de plantas unido de manera operativa a las proteínas de fusión PirAB, TIC6880PL, TIC9316, TIC9317, TIC9318, TIC9319, TIC9320, TIC9322, TIC10376PL, TIC10378PL, TIC10380PL, TIC10381PL, TIC11103, TIC11104, y TIC11302 o proteína insecticida de miembro de familia relacionado que codifica secuencias para la expresión de la proteína en plantas o un promotor funcional de *Bt* unido de manera operativa a proteínas PirA tal como PirA_ABE68878, o las proteínas PirB TIC4772, TIC7576, TIC7661, TIC7663, TIC7665, TIC7667, TIC7669, TIC7940, TIC10366, TIC10367, TIC10369, TIC10370, TIC10371, TIC10372, TIC10373, TIC10368, PirB_ABE68879, TIC11505, TIC11510, y TIC11511; o las proteínas de fusión PirAB, TIC6880, TIC9316, TIC9317, TIC9318, TIC9319, TIC9322, TIC9320, TIC9321, TIC6880PL, TIC10375, TIC10376, TIC10377, TIC10378, TIC10379, TIC10380, TIC10381, TIC10434, TIC11210, TIC11211, TIC11212, TIC11301, TIC11302, TIC11440, TIC11441, TIC11442, TIC11443, TIC11444, TIC11445, TIC11446, TIC11506, TIC11512, TIC11513, TIC10376PL, TIC10378PL, TIC10380PL, TIC10381PL, TIC11103, y TIC11104; o secuencias que codifican proteínas insecticidas de miembro de familia relacionado para la expresión de la proteína en una bacteria *Bt* u otra especie de *Bacillus*. Otros elementos pueden estar unidos de manera operativa a la proteína PirA PirA_ABE68878, las proteínas PirB TIC4772, TIC7576, TIC7661, TIC7663, TIC7665, TIC7667, TIC7669, TIC7940, TIC10366, TIC10367, TIC10369, TIC10370, TIC10371,

TIC10372, TIC10373, TIC10368, PirB_ABE68879, TIC11505, TIC11510, y TIC11511, o las proteínas de fusión PirAB, TIC6880, TIC9316, TIC9317, TIC9318, TIC9319, TIC9322, TIC9320, TIC9321, TIC6880PL, TIC10375, TIC10376, TIC10377, TIC10378, TIC10379, TIC10380, TIC10381, TIC10434, TIC11210, TIC11211, TIC11212, TIC11301, TIC11302, TIC11440, TIC11441, TIC11442, TIC11443, TIC11444, TIC11445, TIC11446, TIC11506, TIC11512, TIC11513, TIC10376PL, TIC10378PL, TIC10380PL, TIC10381PL, TIC11103, y TIC11104, o secuencias que codifican proteínas insecticidas de miembro de familia relacionado que incluyen, de modo no taxativo, potenciadores, intrones, líderes no traducidos, etiquetas de inmovilización de proteínas codificadas (etiqueta HIS), péptidos de translocación (es decir, péptidos de tránsito de plástidos, péptidos señal), secuencias de polipéptidos para enzimas de modificación postraduccional, sitios de unión a ribosomas, y sitios objetivo de ARNi.

[00244] Las moléculas de polinucleótido recombinante proporcionadas en la presente incluyen, de modo no taxativo, un promotor heterólogo unido de manera operativa a un polinucleótido tal como la SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:59, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:63, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:77, SEQ ID NO:79, SEQ ID NO:81, SEQ ID NO:83, SEQ ID NO:85, SEQ ID NO:87, SEQ ID NO:89, SEQ ID NO:91, SEQ ID NO:93, SEQ ID NO:95, SEQ ID NO:97, SEQ ID NO:99, SEQ ID NO:101, SEQ ID NO:104, SEQ ID NO:106, SEQ ID NO:108, SEQ ID NO:110, SEQ ID NO:112, SEQ ID NO:114, SEQ ID NO:116, SEQ ID NO:118, SEQ ID NO:120, SEQ ID NO:122, SEQ ID NO:124, SEQ ID NO:126, SEQ ID NO:128, SEQ ID NO:130, SEQ ID NO:132, SEQ ID NO:134, SEQ ID NO:136, SEQ ID NO:138, SEQ ID NO:140, SEQ ID NO:142, SEQ ID NO:144, SEQ ID NO:146, SEQ ID NO:148, SEQ ID NO:150, SEQ ID NO:152, SEQ ID NO:154, SEQ ID NO:156, y SEQ ID NO:158 que codifica un polipéptido o proteína que tiene la secuencia de aminoácidos tal como

se establece en la SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:72, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:78, SEQ ID NO:80, SEQ ID NO:82, SEQ ID NO:84, SEQ ID NO:86, SEQ ID NO:88, SEQ ID NO:90, SEQ ID NO:92, SEQ ID NO:94, SEQ ID NO:96, SEQ ID NO:98, SEQ ID NO:100, SEQ ID NO:102, SEQ ID NO:105, SEQ ID NO:107, SEQ ID NO:109, SEQ ID NO:111, SEQ ID NO:113, SEQ ID NO:115, SEQ ID NO:117, SEQ ID NO:119, SEQ ID NO:121, SEQ ID NO:123, SEQ ID NO:125, SEQ ID NO:127, SEQ ID NO:129, SEQ ID NO:131, SEQ ID NO:133, SEQ ID NO:135, SEQ ID NO:137, SEQ ID NO:139, SEQ ID NO:141, SEQ ID NO:143, SEQ ID NO:145, SEQ ID NO:147, SEQ ID NO:149, SEQ ID NO:151, SEQ ID NO:153, SEQ ID NO:155, y SEQ ID NO:157. Un promotor heterólogo también puede estar unido de manera operativa a secuencias de codificación de ADN sintético que codifican un plástido objetivo TIC6880PL, TIC9316, TIC9317, TIC9318, TIC9319, TIC9320, TIC9322, TIC10376PL, TIC10378PL, TIC10380PL, TIC10381PL, TIC11103, TIC11104, y TIC11302 o no objetivo TIC6880PL, TIC9316, TIC9317, TIC9318, TIC9319, TIC9320, TIC9322, TIC10376PL, TIC10378PL, TIC10380PL, TIC10381PL, TIC11103, TIC11104, y TIC11302 o proteínas insecticidas relacionadas. Los codones de una molécula de ácido nucleico recombinante que codifica proteínas descritas en la presente pueden sustituirse por codones sinónimos (conocida en la técnica como sustitución silenciosa).

[00245] Tal como se usa en la presente, el término “recombinante” se refiere a un ADN no natural, proteína, u organismo que normalmente no se encontraría en la naturaleza y fue creado por intervención humana. Una “molécula de ADN recombinante” es una molécula de ADN que comprende una combinación de moléculas de ADN que no se producirían juntas de manera natural y es el resultado de la intervención humana. Por ejemplo, una molécula de ADN que está compuesta por una combinación de al menos dos moléculas de ADN

heterólogas entre sí, tal como una molécula de ADN que comprende un transgén y el ADN genómico vegetal adyacente al transgén, es una molécula de ADN recombinante.

[00246] Tal como se usa en la presente, el término “heterólogo” se refiere a la combinación de dos o más moléculas de ADN cuando dicha combinación no se encuentra normalmente en la naturaleza. Por ejemplo, dos moléculas de ADN pueden derivar de especies diferentes y/o dos moléculas de ADN pueden derivar de diferentes genes, por ejemplo, diferentes genes de la misma especie o genes iguales de especies diferentes. Un elemento regulador, por lo tanto, es heterólogo con respecto a una molécula de ADN que puede transcribirse unida de manera operativa si dicha combinación no se encuentra normalmente en la naturaleza, es decir, la molécula de ADN que puede transcribirse no se produce naturalmente unida de manera operativa al elemento regulador.

[00247] Una construcción de ADN recombinante que comprende una secuencia de codificación para las proteínas PirA, las proteínas PirB, o las proteínas de fusión PirAB, o proteína insecticida relacionada puede comprender además una región de ADN que codifica uno o más agentes inhibidores de insectos que pueden configurarse para expresar simultáneamente o coexpresar con una secuencia de ADN que codifica la proteína PirA, la proteína PirB, o la proteína de fusión PirAB, o una proteína insecticida relacionada, una molécula de ARNcd inhibidora de insectos, o una proteína auxiliar. Las proteínas auxiliares incluyen, de modo no taxativo, cofactores, enzimas, compañeros de unión u otros agentes que funcionan para ayudar a la eficacia de un agente inhibidor de insectos, por ejemplo, al contribuir a su expresión, al influenciar su estabilidad en plantas, al optimizar energía libre para la oligomerización, al aumentar su toxicidad y su espectro de actividad. Una proteína auxiliar puede facilitar la absorción de uno o más agentes inhibidores de insectos, por ejemplo, o potenciar los efectos tóxicos del agente tóxico.

[00248] Una construcción de ADN recombinante pueden ensamblarse de modo que todas las proteínas o moléculas de ARNcd se expresen a partir de un promotor o cada proteína o moléculas de ARNcd se encuentren en control de promotor separado o alguna combinación de estas. Las proteínas PirA, las proteínas PirB, o las proteínas de fusión PirAB,

y proteínas relacionadas de la presente invención se pueden expresar a partir de un sistema de expresión de múltiples genes en el cual una o más de las proteínas PirA, las proteínas PirB, o las proteínas de fusión PirAB, o proteínas relacionadas se expresan a partir de un segmento de nucleótido común que también contiene otros marcos de lectura abiertos y promotores, dependiendo del tipo de sistema de expresión seleccionado. Por ejemplo, un sistema de expresión de múltiples genes bacteriano puede utilizar un solo promotor para impulsar la expresión de marcos de lectura abiertos unidos de forma múltiple/en tándem desde dentro de un solo operón (es decir, expresión policistrónica). En otro ejemplo, un sistema de expresión de múltiples genes vegetal puede utilizar casetes de expresión unidos de forma múltiple donde cada uno expresa una proteína diferente u otro agente tal como una o más moléculas de ARNcd.

[00249] Las moléculas de ácido nucleico recombinante o construcciones de ADN recombinante que comprenden las proteínas PirA, las proteínas PirB, o las proteínas de fusión PirAB, o secuencia que codifica proteínas de miembro de familia relacionado pueden administrarse a células hospedadoras mediante vectores, por ejemplo, un plásmido, baculovirus, cromosoma sintético, virión, cósmido, fagémido, fago, o vector viral. Dichos vectores se pueden utilizar para lograr la expresión estable o transitoria de las proteínas PirA, las proteínas PirB, o las proteínas de fusión PirAB, o secuencias que codifican proteínas relacionadas en una célula hospedadora, o expresión posterior del polipéptido codificado. Un polinucleótido recombinante exógeno o construcción de ADN recombinante que comprende una secuencia que codifica proteínas y que se introduce en una célula hospedadora se denomina en la presente “transgén”.

[00250] Las bacterias transgénicas, células de plantas transgénicas, plantas transgénicas, y partes de plantas transgénicas que contienen un polinucleótido recombinante que expresa cualquiera de una o más de las proteínas PirA, las proteínas PirB, o las proteínas de fusión PirAB, o secuencias que codifican proteínas relacionadas. El término “célula bacteriana” o “bacteria” puede incluir, de modo no taxativo, una célula de *Agrobacterium*, *de Bacillus*, *de Escherichia*, de *Salmonella*, de *Pseudomonas*, o *de Rhizobium*. El término “célula vegetal” o “planta” puede incluir, de modo no taxativo, una célula dicotiledónea o una célula

monocotiledónea. Las plantas y células vegetales contempladas incluyen célula vegetal o planta de alfalfa, banana, cebada, judía, brócoli, repollo, brassica, zanahoria, mandioca, ricino, coliflor, apio, garbanzo, col de China, planta cítrica, coco, café, maíz, trébol, algodón, cucurbitácea, pepino, abeto de Douglas, berenjena, eucaliptus, lino, ajo, uva, lúpulo, puerro, lechuga, pino bronco, mijo, melones, nuez, avena, oliva, cebolla, plantas ornamentales, palmera, pasto de pastura, guisante, cacahuate, pimiento, guandú, pino, patata, álamo, calabaza, pino insigne, rabanito, colza, arroz, rizomas, centeno, cártamo, arbusto, sorgo, pino sureño, soja, espinaca, zapallo, fresa, remolacha azucarera, caña de azúcar, girasol, maíz dulce, liquidámbar, boniato, pasto varilla, té, tabaco, tomate, triticale, césped, sandia y trigo. En otras modalidades, se proporcionan plantas transgénicas y partes de plantas transgénicas regeneradas a partir de una célula de planta transgénica. En determinadas modalidades, las plantas transgénicas pueden obtenerse a partir de una semilla transgénica, mediante corte, quiebre, molienda o mediante otro tipo de disociación de la parte de la planta. En determinadas modalidades, la parte de la planta puede ser una semilla, una cápsula, una hoja, una flor, un tallo, una raíz o cualquier parte de estos, o una parte no regenerable de una parte de planta transgénica. Tal como se usa en este contexto, una parte “no regenerable” de una parte de planta transgénica es una parte que no puede inducirse para formar una planta entera o que no puede inducirse para formar una planta entera que pueda reproducirse de manera sexual y/o asexual. En determinadas modalidades, una parte no regenerable de una parte de planta es una parte de una semilla transgénica, cápsula, hoja, flor, tallo o raíz.

[00251] Se proporcionan métodos para elaborar plantas transgénicas que comprenden cantidades inhibidoras de insectos, coleópteros, o lepidópteros, o hemípteros de una TIC6880PL, TIC9316, TIC9317, TIC9318, TIC9319, TIC9320, TIC9322, TIC10376PL, TIC10378PL, TIC10380PL, TIC10381PL, TIC11103, TIC11104, o TIC11302; o proteína relacionada. Dichas plantas pueden elaborarse al introducir un polinucleótido recombinante que codifica cualquier TIC6880PL, TIC9316, TIC9317, TIC9318, TIC9319, TIC9320, TIC9322, TIC10376PL, TIC10378PL, TIC10380PL, TIC10381PL, TIC11103, TIC11104, o TIC11302, o proteína relacionada proporcionada en la presente solicitud en una célula vegetal, y seleccionar una planta derivada de dicha célula vegetal que expresa una cantidad inhibidora de insectos, coleópteros, o lepidópteros, o hemípteros de las proteínas. Las plantas pueden

derivar de células vegetales mediante regeneración, semilla, polen, o técnicas de transformación del meristemo. En la técnica se conocen métodos para transformar plantas.

[00252] Los productos de plantas procesadas, donde el producto procesado comprende una cantidad detectable de una TIC6880PL, TIC9316, TIC9317, TIC9318, TIC9319, TIC9320, TIC9322, TIC10376PL, TIC10378PL, TIC10380PL, TIC10381PL, TIC11103, TIC11104, o TIC11302, o proteína relacionada, un segmento inhibidor de insectos o fragmento de este, o cualquier parte distintiva de este, también se describen en la presente solicitud. En determinadas modalidades, el producto procesado se selecciona del grupo que consiste en partes de planta, biomasa vegetal, aceite, molienda, azúcar, pienso para animales, harina, copos, salvado, hebra, cáscaras, semillas procesadas, y semilla. En determinadas modalidades, el producto procesado no se puede regenerar. El producto vegetal puede comprender productos básicos u otros productos del comercio derivados de una planta transgénica o parte de una planta transgénica, donde el producto básico u otros productos se pueden rastrear a través del comercio mediante la detección de segmentos de nucleótido o ARN expresado o proteínas que codifican o comprenden partes distintivas de una TIC6880PL, TIC9316, TIC9317, TIC9318, TIC9319, TIC9320, TIC9322, TIC10376PL, TIC10378PL, TIC10380PL, TIC10381PL, TIC11103, TIC11104, o TIC11302; o proteína relacionada.

[00253] Las plantas que expresan una TIC6880PL, TIC9316, TIC9317, TIC9318, TIC9319, TIC9320, TIC9322, TIC10376PL, TIC10378PL, TIC10380PL, TIC10381PL, TIC11103, TIC11104, o TIC11302, o proteína relacionada pueden cruzarse mediante cruzamiento con eventos transgénicos que expresan otras proteínas de toxinas y/o que expresan otros rasgos transgénicos tales como genes con tolerancia a herbicidas, genes que confieren rasgos de rendimiento o estrés, y similares, o dichos rasgos pueden combinarse en un solo vector de modo que todos los rasgos esté unidos.

[00254] Tal como se describe adicionalmente en los Ejemplos, las secuencias que codifican TIC6880PL, TIC9316, TIC9317, TIC9318, TIC9319, TIC9320, TIC9322, TIC10376PL, TIC10378PL, TIC10380PL, TIC10381PL, TIC11103, TIC11104, y TIC11302 se diseñaron para usar en plantas. Los vectores y casetes de expresión que contienen estas

secuencias de nucleótidos sintéticas o artificiales pueden construirse e introducirse en células vegetales de maíz, algodón, y soja de acuerdo con métodos y técnicas de transformación conocidas en la técnica. Las células transformadas se regeneran plantas transformadas que se observa que expresan TIC6880PL, TIC9316, TIC9317, TIC9318, TIC9319, TIC9320, TIC9322, TIC10376PL, TIC10378PL, TIC10380PL, TIC10381PL, TIC11103, TIC11104, y TIC11302. Para analizar la actividad pesticida, se realizan bioensayos en presencia de plagas de lepidópteros, coleópteros y hemípteros.

[00255] Tal como se describe adicionalmente en los Ejemplos, las secuencias que codifican TIC6880PL, TIC9316, TIC9317, TIC9318, TIC9319, TIC9320, TIC9322, TIC10376PL, TIC10378PL, TIC10380PL, TIC10381PL, TIC11103, TIC11104, o TIC11302, o proteína relacionada y pueden identificarse secuencias que tienen un porcentaje de identidad de secuencia con estas proteínas usando métodos conocidos por los expertos en la técnica tales como reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), amplificación térmica e hibridación. Por ejemplo, una proteína TIC6880PL, TIC9316, TIC9317, TIC9318, TIC9319, TIC9320, TIC9322, TIC10376PL, TIC10378PL, TIC10380PL, TIC10381PL, TIC11103, TIC11104, o TIC11302 o proteínas relacionadas se pueden utilizar para producir anticuerpos que se unen específicamente a proteínas relacionadas, y se pueden utilizar para seleccionar y encontrar otros miembros de proteínas que están estrechamente relacionados.

[00256] Además, las secuencias de nucleótidos que codifican una proteína TIC6880PL, TIC9316, TIC9317, TIC9318, TIC9319, TIC9320, TIC9322, TIC10376PL, TIC10378PL, TIC10380PL, TIC10381PL, TIC11103, TIC11104, o TIC11302, o proteína relacionada se pueden utilizar como sondas y cebadores para seleccionar para identificar otros miembros de la clase usando métodos de ciclo térmico o amplificación isotérmica e hibridación. Por ejemplo, los oligonucleótidos derivados de secuencias tal como se establece en la SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:146, SEQ ID NO:148, SEQ ID NO:150, SEQ ID NO:152, SEQ ID NO:154, SEQ ID NO:156, y SEQ ID NO:158 se pueden utilizar para determinar la presencia o ausencia de una proteína TIC6880PL, TIC9316, TIC9317, TIC9318, TIC9319, TIC9320, TIC9322, TIC10376PL, TIC10378PL, TIC10380PL, TIC10381PL, TIC11103, TIC11104, o

TIC11302, o transgén de proteína relacionada en una muestra de ácido desoxirribonucleico de un producto básico. Dada la sensibilidad de determinados métodos de detección de ácido nucleico que emplean oligonucleótidos, se anticipa que los oligonucleótidos derivados de las secuencias establecidas como SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:146, SEQ ID NO:148, SEQ ID NO:150, SEQ ID NO:152, SEQ ID NO:154, SEQ ID NO:156, y SEQ ID NO:158 se pueden utilizar para detectar un transgén TIC6880PL, TIC9316, TIC9317, TIC9318, TIC9319, TIC9320, TIC9322, TIC10376PL, TIC10378PL, TIC10380PL, TIC10381PL, TIC11103, TIC11104, o TIC11302 en productos básicos derivados de fuentes agrupadas donde solo una fracción del producto básico deriva de una planta transgénica que contiene cualquiera de la SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:146, SEQ ID NO:148, SEQ ID NO:150, SEQ ID NO:152, SEQ ID NO:154, SEQ ID NO:156, o SEQ ID NO:158. Se reconoce adicionalmente que dichos oligonucleótidos se pueden utilizar para introducir variación de secuencia de nucleótidos en la SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:146, SEQ ID NO:148, SEQ ID NO:150, SEQ ID NO:152, SEQ ID NO:154, SEQ ID NO:156, o SEQ ID NO:158. Dichos oligonucleótidos de “mutagénesis” son útiles para la identificación de TIC6880PL, TIC9316, TIC9317, TIC9318, TIC9319, TIC9320, TIC9322, TIC10376PL, TIC10378PL, TIC10380PL, TIC10381PL, TIC11103, TIC11104, o TIC11302, o variantes de secuencias de aminoácidos relacionadas que exhiben una gama de actividad inhibidora de insectos o expresión variada en células hospedadoras de plantas transgénicas.

[00257] Los homólogos de secuencia de nucleótidos, por ejemplo, proteínas insecticidas codificadas por secuencias de nucleótidos que hibridan entre ellas o cualquiera de las secuencias descritas en la presente solicitud en condiciones de hibridación, también son una modalidad de la presente invención. La invención también proporciona un método para detectar una primera secuencia de nucleótidos que se hibrida con una segunda secuencia de nucleótidos, donde la primera secuencia de nucleótidos (o su secuencia de complemento inverso) codifica una proteína pesticida o fragmento pesticida de esta y se hibrida en condiciones de hibridación rigurosas con la segunda secuencia de nucleótidos. En dicho caso,

la segunda secuencia de nucleótidos puede ser la secuencia de nucleótidos que se selecciona del grupo que consiste en: SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:59, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:63, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:77, SEQ ID NO:79, SEQ ID NO:81, SEQ ID NO:83, SEQ ID NO:85, SEQ ID NO:87, SEQ ID NO:89, SEQ ID NO:91, SEQ ID NO:93, SEQ ID NO:95, SEQ ID NO:97, SEQ ID NO:99, SEQ ID NO:101, SEQ ID NO:104, SEQ ID NO:106, SEQ ID NO:108, SEQ ID NO:110, SEQ ID NO:112, SEQ ID NO:114, SEQ ID NO:116, SEQ ID NO:118, SEQ ID NO:120, SEQ ID NO:122, SEQ ID NO:124, SEQ ID NO:126, SEQ ID NO:128, SEQ ID NO:130, SEQ ID NO:132, SEQ ID NO:134, SEQ ID NO:136, SEQ ID NO:138, SEQ ID NO:140, SEQ ID NO:142, SEQ ID NO:144, SEQ ID NO:146, SEQ ID NO:148, SEQ ID NO:150, SEQ ID NO:152, SEQ ID NO:154, SEQ ID NO:156, y SEQ ID NO:158 en condiciones de hibridación rigurosas. Las secuencias de codificación de nucleótidos hibridan entre sí en condiciones de hibridación adecuadas y las proteínas codificadas por estas secuencias de nucleótidos reaccionan de manera cruzada con antisuero cultivado contra cualquiera de las otras proteínas. Las condiciones de hibridación rigurosas, tal como se define en la presente, comprenden al menos hibridación a 42 °C seguida de dos lavados durante cinco minutos cada uno a temperatura ambiente con 2X SSC, SDS al 0,1 %, seguido de dos lavados durante treinta minutos cada uno a 65 °C en 0,5X SSC, SDS al 0,1 %. Los lavados a temperaturas incluso mayores constituyen condiciones aun más rigurosas, por ejemplo, condiciones de hibridación de 68 ºC, seguido de lavado a 68 ºC, en 2xSSC que contiene SDS al 0,1 %.

[00258] Un experto en la técnica reconocerá que, debido a la redundancia del código genético, muchas otras secuencias pueden codificar proteínas relacionadas con las proteínas PirA, las proteínas PirB, o las proteínas de fusión PirAB, y esas secuencias, en la medida que funcionan para expresar proteínas pesticidas ya sea en cepas de *Bacillus* o en células

vegetales, son modalidades de la presente invención, reconociendo, por supuesto, que muchas de dichas secuencias de codificación redundantes no se hibridarán en estas condiciones con las secuencias naturales de *Xenorhabdus o Photorhabdus* que codifican las proteínas PirA, las proteínas PirB, o las proteínas de fusión PirAB. La presente solicitud contempla el uso de este y otros métodos de identificación conocidos por los expertos en la técnica para identificar las proteínas PirA, las proteínas PirB, o las proteínas de fusión PirAB, o secuencias que codifican proteínas relacionadas y secuencias que tienen un porcentaje sustancial de porcentaje de identidad de con estas.

[00259] Los métodos para controlar insectos, en particular infestaciones de lepidópteros, coleópteros, o hemípteros de plantas de cultivo, con la proteína TIC6880PL, TIC9316, TIC9317, TIC9318, TIC9319, TIC9320, TIC9322, TIC10376PL, TIC10378PL, TIC10380PL, TIC10381PL, TIC11103, TIC11104, o TIC11302, o proteínas relacionadas, también se describen en la presente solicitud. Dichos métodos pueden comprender cultivar una planta que comprende una cantidad inhibidora de insectos, coleópteros, o lepidópteros, o hemípteros de una TIC6880PL, TIC9316, TIC9317, TIC9318, TIC9319, TIC9320, TIC9322, TIC10376PL, TIC10378PL, TIC10380PL, TIC10381PL, TIC11103, TIC11104, o TIC11302; o proteína de toxina relacionada. En determinadas modalidades, dichos métodos pueden comprender además uno o más de: (i) aplicar cualquier composición que comprende o codifica una proteína TIC6880PL, TIC9316, TIC9317, TIC9318, TIC9319, TIC9320, TIC9322, TIC10376PL, TIC10378PL, TIC10380PL, TIC10381PL, TIC11103, TIC11104, o TIC11302, o proteína de toxina relacionada a una planta o una semilla que produce a una planta; y (ii) transformar una planta o una célula vegetal que produce una planta con un polinucleótido que codifica una proteína TIC6880PL, TIC9316, TIC9317, TIC9318, TIC9319, TIC9320, TIC9322, TIC10376PL, TIC10378PL, TIC10380PL, TIC10381PL, TIC11103, TIC11104, o TIC11302, o proteína de toxina relacionada. En general, se contempla que una proteína TIC6880PL, TIC9316, TIC9317, TIC9318, TIC9319, TIC9320, TIC9322, TIC10376PL, TIC10378PL, TIC10380PL, TIC10381PL, TIC11103, TIC11104, o TIC11302, o proteína de toxina relacionada puede proporcionarse en una composición, proporcionarse en un microorganismo, o proporcionarse en una planta transgénica para conferir actividad inhibidora de insectos contra los insectos lepidópteros, coleópteros o hemípteros.

[00260] En determinadas modalidades, un ácido nucleico recombinante de las proteínas PirA, las proteínas PirB, o las proteínas de fusión PirAB, o toxina de proteína relacionada es el ingrediente activo de manera insecticida de una composición inhibidora preparada mediante cultivo de *Bacillus* recombinante o cualquier otra célula bacteriana recombinante transformada para expresar una de las proteínas PirA, las proteínas PirB, o las proteínas de fusión PirAB, o proteína de toxina relacionada en condiciones adecuadas para la expresión. Dicha composición puede prepararse mediante disecación, liofilización, homogeneización, extracción, filtración, centrifugación, sedimentación, o concentración de un cultivo de dichas células recombinantes que expresan/producen dicho polipéptido recombinante. Dicho proceso puede dar como resultado un *Bacillus* u otro extracto de célula bacteriana entomopatogénico, suspensión celular, homogenado celular, lisado celular, sobrenadante celular, filtrado celular, o sedimento celular. Al obtener los polipéptidos recombinantes producidos de este modo, una composición que incluye los polipéptidos recombinantes puede incluir células bacterianas, esporas bacterianas, y cuerpos de inclusión paraesporal y pueden formularse para varios usos, que incluyen como productos de pulverización inhibidores de insectos agrícolas o como formulaciones inhibidoras de insectos en bioensayos de dieta.

[00261] En una modalidad, para reducir la probabilidad de desarrollo de resistencia, una composición inhibidora de insectos que comprende una de las proteínas PirA, las proteínas PirB, o las proteínas de fusión PirAB, o una proteína relacionada puede comprender además al menos un polipéptido adicional conocido por los expertos en la técnica que exhibe actividad inhibidora de insectos contra las misma especies de insectos lepidópteros, coleópteros, o hemípteros, pero que es diferente de las proteínas PirA, las proteínas PirB, o las proteínas de fusión PirAB, o una proteína de toxina relacionada. Los polipéptidos adicionales posibles para dicha composición incluyen una proteína inhibidora de insectos y una molécula de ARNcd inhibidora de insectos. Un ejemplo para el uso de dichas secuencias de ribonucleótidos para controlar plagas de insectos se describe en *Baum*, et ál. (Publicación de patente estadounidense 2006/0021087 A1).

[00262] Dicho polipéptido adicional para el control de plagas de lepidópteros pueden seleccionarse del grupo que consiste en una proteína inhibidora de insectos, tal como, de modo no taxativo, Cry1A (patente estadounidense n.° 5,880,275), Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1A.105, Cry1Ae, Cry1B (publicación de patente estadounidense n.° 10/525,318), Cry1C (patente estadounidense n.° 6,033,874), Cry1D, Cry1Da y variantes de estas, Cry1E, Cry1F, y quimeras de Cry1A/F (patente estadounidense n.° 7,070,982; 6,962,705; y 6,713,063), Cry1G, Cry1H, Cry1I, Cry1J, Cry1K, Cry1L, quimeras tipo Cry1 tales como, de modo no taxativo, TIC836, TIC860, TIC867, TIC869, y TIC1100 (publicación de solicitud internacional WO2016/061391 (A2)), TIC2160 (publicación de solicitud internacional WO2016/061392(A2)), Cry2A, Cry2Ab (patente estadounidense n.° 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 estadounidense 2013-0117884 A1), AXMI-52, AXMI-58, AXMI-88, AXMI-97, AXMI-102, AXMI-112, AXMI-117, AXMI-100 (publicación de patente estadounidense 2013-0310543 A1), AXMI-115, AXMI-113, AXMI-005 (publicación de patente estadounidense 2013-0104259 A1), AXMI-134 (publicación de patente estadounidense 2013-0167264 A1), AXMI-150 (publicación de patente estadounidense 2010-0160231 A1), AXMI-184 (publicación de patente estadounidense 2010-0004176 A1), AXMI-196, AXMI-204, AXMI-207, AXMI-209 (publicación de patente estadounidense 2011-0030096 A1), AXMI-218, AXMI-220 (publicación de patente estadounidense 2014-0245491 A1), AXMI-221z, AXMI-222z, AXMI-223z, AXMI-224z, AXMI-225z (publicación de patente estadounidense 2014-0196175 A1), AXMI-238 (publicación de patente estadounidense 2014-0033363 A1), AXMI-270 (publicación de patente estadounidense 2014-0223598 A1), AXMI-345 (publicación de patente estadounidense 2014-0373195 A1), AXMI-335 (publicación de solicitud internacional WO2013/134523(A2)), DIG-3 (publicación de patente estadounidense 2013-0219570 A1), DIG-5 (publicación de patente estadounidense 2010-0317569 A1), DIG-11 (publicación de patente estadounidense 2010-0319093 A1), AfIP-1A y derivados de este (publicación de patente estadounidense 2014-0033361 A1), AfIP-1B y derivados de este (publicación de patente estadounidense 2014-0033361 A1), PIP-1APIP-1B (publicación de patente estadounidense 2014-0007292 A1), PSEEN3174 (publicación de patente estadounidense 2014-0007292 A1), AECFG-592740 (publicación de patente estadounidense 2014-0007292 A1), Pput_1063 (publicación de

patente estadounidense 2014-0007292 A1), DIG-657 (publicación de solicitud internacional WO2015/195594(A2)), Pput_1064 (publicación de patente estadounidense 2014-0007292 A1), GS-135 y derivados de este (publicación de patente estadounidense 2012-0233726 A1), GS153 y derivados de este (publicación de patente estadounidense 2012-0192310 A1), GS154 y derivados de este (publicación de patente estadounidense 2012-0192310 A1), GS155 y derivados de este (publicación de patente estadounidense 2012-0192310 A1), SEQ ID NO:2 y derivados de esta tal como se describe en la publicación de patente estadounidense 2012-0167259 A1, SEQ ID NO:2 y derivados de esta tal como se describe en la publicación de patente estadounidense 2012-0047606 A1, SEQ ID NO:2 y derivados de esta tal como se describe en la publicación de patente estadounidense 2011-0154536 A1, SEQ ID NO:2 y derivados de esta tal como se describe en la publicación de patente estadounidense 2011-0112013 A1, SEQ ID NO:2 y 4 y derivados de esta tal como se describe en la publicación de patente estadounidense 2010-0192256 A1, SEQ ID NO:2 y derivados de esta tal como se describe en la publicación de patente estadounidense 2010-0077507 A1, SEQ ID NO:2 y derivados de esta tal como se describe en la publicación de patente estadounidense 2010-0077508 A1, SEQ ID NO:2 y derivados de esta tal como se describe en la publicación de patente estadounidense 2009-0313721 A1, SEQ ID NO:2 o 4 y derivados de esta tal como se describe en la publicación de patente estadounidense 2010-0269221 A1, SEQ ID NO:2 y derivados de esta tal como se describe en la patente estadounidense n.° 7,772,465 (B2), CF161_0085 y derivados de este tal como se describe en WO2014/008054 A2, proteínas tóxicas de lepidópteros y sus derivados tal como se describe en las publicaciones de patente estadounidense US2008-0172762 A1, US2011-0055968 A1, y US2012-0117690 A1; SEQ ID NO:2 y derivados de esta tal como se describe en US7510878(B2), SEQ ID NO:2 y derivados de esta tal como se describe en la patente estadounidense n.° 7812129(B1), Cry71Aa1 y Cry72Aa1 (publicación de patente estadounidense US2016-0230187 A1), Axmi422 (publicación de patente estadounidense US2016-0201082 A1), Axmi440 (publicación de patente estadounidense US2016-0185830 A1), Axmi281 (publicación de patente estadounidense 2016-0177332 A1), BT-0044, BT-0051, BT-0068, BT-0128 y variantes de estos (WO 2016-094159 A1), BT-009, BT-0012, BT-0013, BT-0023, BT0067 y variantes de estos (WO 2016-094165 A1), Cry1JP578V, Cry1JPS1, Cry1 JPS1P578V (WO 2016-061208 A1); y similares.

[00263] Dicho polipéptido adicional para el control de plagas de coleópteros se puede seleccionar del grupo que consiste en una proteína inhibidora de insectos, tal como, de modo no taxativo, Cry3Bb (patente estadounidense n.° 6,501,009), variantes de Cry1C, variantes de Cry3A, Cry3, Cry3B, Cry34/35, 5307, AXMI134 (publicación de patente estadounidense 2013-0167264 A1) AXMI-184 (publicación de patente estadounidense 2010-0004176 A1), AXMI-205 (publicación de patente estadounidense 2014-0298538 A1), AXMI-207 (publicación de patente estadounidense 2013-0303440 A1), AXMI-218, AXMI-220 (publicación de patente estadounidense 20140245491A1), AXMI-221z, AXMI-223z (publicación de patente estadounidense 2014-0196175 A1), AXMI-279 (publicación de patente estadounidense 2014-0223599 A1), AXMI-R1 y variantes de este (publicación de patente estadounidense 2010-0197592 A1, TIC407, TIC417, TIC431, TIC807, TIC853, TIC901, TIC1201, TIC3131, DIG-10 (publicación de patente estadounidense 2010-0319092 A1), eHIPs (publicación de solicitud de patente estadounidense n.° 2010/0017914), IP3 y variantes de este (publicación de patente estadounidense 2012-0210462 A1), □-Hexatoxin-Hv1a (publicación de solicitud de patente estadounidense 2014-0366227 A1), variantes de PHI-4 (publicación de solicitud de patente estadounidense 2016-0281105 A1), variantes de PIP-72 (WO 2016-144688 A1), variantes de PIP-45, variantes de PIP-64, variantes de PIP-74, variantes de PIP-75, y variantes de PIP-77 (WO 2016-144686 A1), DIG-305 (WO 2016109214 A1), variantes de PIP-47 (publicación de patente estadounidense 2016-0186204 A1), DIG-17, DIG-90, DIG-79 (WO 2016-057123 A1), DIG-303 (WO 2016-070079 A1); y similares.

[00264] Dichos polipéptidos adicionales para el control de plagas de hemípteros pueden seleccionarse del grupo que consiste en proteínas activas de hemípteros, tales como, de modo no taxativo, TIC1415 (publicación de patente estadounidense 2013-0097735 A1), TIC807 (patente estadounidense n.° 8609936), TIC852 y TIC853 (publicación de patente estadounidense 2010-0064394 A1), TIC834 y variantes de estos (publicación de patente estadounidense 2013-0269060 A1), AXMI-036 (publicación de patente estadounidense 2010-0137216 A1), y AXMI-171 (publicación de patente estadounidense 2013-0055469 A1), Cry64Ba y Cry64Ca (*Liu et al., (2018) Cry64Ba and Cry64Ca, Two ETX/MTX2-Type Bacillus*

thuringiensis Insecticidal Protein Active against Hemipteran Pests. Applied and Environmental Microbiology, 84(3): 1-11).

[00265] En otras modalidades, dicha composición/formulación puede comprender además un polipéptido adicional que exhibe actividad inhibidora de insectos para un insecto que no se inhibe mediante una proteína inhibidora de insectos de otra manera de la presente invención para expandir el espectro de inhibición de insectos obtenido, por ejemplo, por un polipéptido adicional que exhibe actividad inhibidora de insectos para tisanópteros.

[00266] La posibilidad de los insectos de desarrollar resistencia a determinados insecticidas se encuentra documentada en la técnica. Una estrategia de manejo de la resistencia a insectos es emplear cultivos transgénicos que expresan dos agentes inhibidores de insectos diferentes que operan a través de diferentes modos de acción. Por lo tanto, cualquier insecto con resistencia a uno de los agentes inhibidores de insectos puede controlarse mediante el otro agente inhibidor de insectos. Otra estrategia de manejo de resistencia a insectos emplea el uso de plantas que no están protegidas contra las especies de plaga de coleópteros o lepidópteros objetivo para proporcionar un refugio para dichas plantas no protegidas. Un ejemplo particular se describe en la patente estadounidense n.º 6,551,962, que se incorpora en su totalidad mediante esta referencia.

[00267] Otras modalidades tales como sustancias químicas pesticidas aplicadas tópicamente que se diseñan para controlar plagas que también se controlan mediante las proteínas descritas en la presente que se usarán con proteínas en tratamientos de semillas, formulaciones de pulverización, goteo, limpieza se pueden aplicar directamente al suelo (suelo empapado), se pueden aplicar a plantas en crecimiento que expresan las proteínas descritas en la presente, o se pueden formular para aplicarse a semillas que contienen uno o más transgenes que codifican una o más proteínas descritas. Dichas formulaciones para usar en tratamientos de semillas se pueden aplicar con varios adhesivos y adherentes conocidos en la técnica. Dichas formulaciones pueden contener pesticidas que son sinérgicos en modo de acción con las proteínas descritas, de modo que los pesticidas de la formulación actúen a través de un modo de acción diferente para controlar las mismas plagas o plagas similares

que se pueden controlar mediante las proteínas descritas, o que dichos pesticidas actúen para controlar las plagas dentro de un intervalo más amplio de hospedador o especie de plaga de planta que no son controladas de manera eficaz por una de las proteína PirA, las proteínas PirB, o las proteínas de fusión PirAB, o proteínas pesticidas relacionadas.

[00268] La composición/formulación mencionada anteriormente puede comprender además un portador agrícolamente aceptable, tal como un cebo, un polvo, sedimento, gránulo, aerosol, emulsión, una suspensión coloide, una solución acuosa, una preparación de cristal/esporas de *Bacillus*, un tratamiento de semilla, una célula vegetal/ tejido vegetal/ planta recombinante transformada para expresar una o más de las proteínas, o bacteria transformada para expresar una o más de las proteínas. Dependiendo del nivel del inhibidor de insectos o inhibición insecticida inherente en el polipéptido recombinante y el nivel de formulación que se aplicara a una planta o ensayo de dieta, la composición/formulación puede incluir varias cantidades en peso del polipéptido recombinante, por ejemplo, de 0,0001 % a 0,001 % a 0,01 % a 1 % a 99 % en peso del polipéptido recombinante.

EJEMPLOS

[00269] En vista de lo anterior, los expertos en la técnica entenderán que se pueden realizar cambios en los aspectos específicos descritos y aun así obtener un resultado igual o similar sin apartarse del espíritu y alcance de la invención. Por lo tanto, los detalles funcionales y estructurales específicos descritos en la presente no deben interpretarse como taxativos. Debería entenderse que la descripción entera de cada referencia citada en la presente se incorpora dentro de la descripción de la presente solicitud.

EJEMPLO 1

Descubrimiento de las proteínas PirA y las proteínas PirB y la construcción de las proteínas de fusión PirAB

[00270] Este Ejemplo describe el descubrimiento de las proteínas PirA pesticidas TIC4771, TIC7575, TIC7660, TIC7662, TIC7664, TIC7666, TIC7668, TIC7939, TIC10357,

TIC10358, TIC10360, TIC10361, TIC10362, TIC10363, TIC10364, TIC10359, y PirA_ABE68878 (de manera colectiva, “las proteínas PirA”), proteínas PirB TIC4772, TIC7576, TIC7661, TIC7663, TIC7665, TIC7667, TIC7669, TIC7940, TIC10366, TIC10367, TIC10369, TIC10370, TIC10371, TIC10372, TIC10373, TIC10368, PirB_ABE68879, TIC11505, TIC11510, y TIC11511 (de manera colectiva “las proteínas PirB”), y la creación de las proteínas de fusión PirAB, TIC6880, TIC9316, TIC9317, TIC9318, TIC9319, TIC9322, TIC9320, TIC9321, TIC6880PL, TIC10375, TIC10376, TIC10377, TIC10378, TIC10379, TIC10380, TIC10381, TIC10434, TIC11210, TIC11211, TIC11212, TIC11301, TIC11302, TIC11440, TIC11441, TIC11442, TIC11443, TIC11444, TIC11445, TIC11446, TIC11506, TIC11512, TIC11513, TIC10376PL, TIC10378PL, TIC10380PL, TIC10381PL, TIC11103, y TIC11104 (de manera colectiva “las proteínas de fusión PirAB”).

[00271] Se identificaron las secuencias que codifican las proteínas pesticidas PirAB de *Photorabdus* y *Xenorabdus* a partir de colecciones patentadas así como también información pública de secuencias, sintesizada, clonada, con confirmación de secuencia, y analizada en bioensayo de insectos. Se identificaron operones bacterianos de las especies *Photorabdus* y *Xenorabdus*, donde cada operón comprende una secuencia de codificación de PirA y PirB. Las proteínas PirA pesticidas TIC4771, TIC7575, TIC7660, TIC7662, TIC7664, TIC7666, TIC7668, TIC7939, TIC10357, TIC10358, TIC10360, TIC10361, TIC10362, TIC10363, TIC10364, TIC10359, y PirA_ABE68878; y proteínas PirB TIC4772, TIC7576, TIC7661, TIC7663, TIC7665, TIC7667, TIC7669, TIC7940, TIC10366, TIC10367, TIC10369, TIC10370, TIC10371, TIC10372, TIC10373, TIC10368, PirB_ABE68879, TIC11505, TIC11510, y TIC11511, se aislaron de las especies *Photorabdus y Xenorabdus* indicadas en la Tabla 13. Con respecto a las proteínas TIC7939 y TIC7940, el operón se identificó a partir de una muestra de microbioma y la especie bacteriana de la que derivó todavía es desconocida.

Tabla 13. Proteínas de toxinas pesticidas PirA y PirB novedosas y especies *Photorabdus y Xenorabdus* correspondientes.

Proteína PirA	Proteína PirB

Especie bacteriana	Toxina	Nu-cleótidos SEQ ID NO:	Proteína SEQ ID NO:	Toxina	Nu-cleótidos SEQ ID NO:	Proteína SEQ ID NO:
Xenorhabdus nematophila ISB000002	TIC4771	1	2	TIC4772	3	4
Xenorhabdus ehlersii 85823	TIC7575	7	8	TIC7576	9	10
Xenorhabdus cabanillasii 85908	TIC7660	13	14	TIC7661	15	16
Xenorhabdus ehlersii 85887	TIC7662	19	20	TIC7663	21	22
Xenorhabdus poinarii 86198	TIC7664	25	26	TIC7665	27	28
Photorhabdus luminescens 86197	TIC7666	31	32	TIC7667	33	34
Photorhabdus luminescens 86194	TIC7668	37	38	TIC7669	39	40
Microbioma	TIC7939	43	44	TIC7940	45	46
Shewanella violacea DSS12	TIC10357	57	58	TIC10366	59	60
Photorhabdus luminescens laumondii TTO1	TIC10358	63	64	TIC10367	65	66
Photorhabdus asymbiotica	TIC10360	69	70	TIC10369	71	72
Xenorhabdus sp. NBAII XenSa04	TIC10361	75	76	TIC10370	77	78
Yersinia aldovae 670-83	TIC10362	81	82	TIC10371	83	84
Xenorhabdus doucetiae FRM16	TIC10363	87	88	TIC10372	89	90
Xenorhabdus griffiniae BMMCB	TIC10364	93	94	TIC10373	95	96
Xenorhabdus nematophila	TIC10359	99	100	TIC10368	101	102
Photorhabdus luminescens Hm	PirA_ABE6	104	105	PirB_ABE6	106	107

	Proteína PirA			Proteína PirB		
Especie bacteriana	**Toxina**	**Nu-cleótidos SEQ ID NO:**	**Proteína SEQ ID NO:**	**Toxina**	**Nu-cleótidos SEQ ID NO:**	**Proteína SEQ ID NO:**
	8878			8879		
Xenorhabdus nematophila MDI-0035777				TIC11505	134	135
Xenorhabdus bovienii MDI-0035808				TIC11510	138	139
Xenorhabdus nematophila AN6/1				TIC11511	142	143

[00272] Se identificaron las secuencias que codifican las proteínas pesticidas PirA y PirB de *Photorabdus* y *Xenorabdus* a partir de colecciones patentadas así como también información pública de secuencias, sintetizada, clonada, con confirmación de secuencia, y analizada en bioensayo de insectos. Se identificaron operones bacterianos y se diseñaron cebadores de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en función de cóntigos derivados de la secuenciación de cada especie *Photorabdus* y *Xenorabdus* indicada en la Tabla 13. Se produjeron amplicones de la secuencia de codificación de longitud completa para cada toxina de proteína usando ADN total aislado de cada especie indicada en la Tabla 13. Cada uno de los amplicones se clonó usando métodos conocidos en la técnica en vectores de expresión de *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) en enlace operativo con un promotor expresable de *Bt*.

[00273] Se elaboraron proteínas de fusión que comprenden las proteínas PirA y PirB usando métodos conocidos en la técnica. Las secuencias de codificación que codifican las proteínas de fusión PirAB comprendían las secuencias de codificación de proteínas PirA y PirB unidas de manera operativa, de modo que cuando se expresa en una célula, se produjo una proteína que comprende las proteínas PirA y PirB contiguas entre sí. En la Tabla 1 se presentan proteínas de fusión PirAB compuestas por una proteína PirA contigua a una

proteína PirB. Las proteínas de fusión PirAB presentadas en la Tabla 1 están compuestas por una proteína PirA y PirB derivada del mismo operón bacteriano, o una proteína PirA y PirB derivada de operones bacterianos diferentes. En la Tabla 2 se presentan proteínas de fusión PirAB compuestas por una proteína PirB contigua a una proteína PirA. Las proteínas de fusión PirAB en la Tabla 2 están compuestas por una proteína PirA y PirB derivada del mismo operón bacteriano. En la Tabla 3 se presentan proteínas de fusión PirAB compuestas por una proteína PirA contigua a otra proteína PirA que a la vez es contigua a una proteína PirB. Los componentes de la proteína PirA de las proteínas de fusión PirAB presentadas en la Tabla 3 pueden ser proteínas PirA duplicadas o proteínas PirA diferentes.

EJEMPLO 2

Las proteínas PirA, proteínas PirB, y proteínas de fusión PirAB demuestran actividad contra lepidópteros, coleópteros, y hemípteros en bioensayo de insectos

[00274] Este Ejemplo ilustra la actividad inhibidora exhibida por las proteínas PirA, las proteínas PirB, y las proteínas de fusión PirAB contra varias especies de lepidópteros, coleópteros, y hemípteros.

[00275] Las proteínas PirA, las proteínas PirB, y las proteínas de fusión PirAB se expresaron en *Bt* y *E. coli* y se analizaron para determinar la toxicidad contra varias especies de lepidópteros, coleópteros, hemípteros, y dípteros. Las preparaciones de cada toxina se analizaron contra las especies de plagas de lepidópteros cogollero del maíz (*Spodoptera frugiperda*, FAW), gusano del maíz (*Helicoverpa zea,* (CEW), también conocido como oruga de la soja y gusano del algodón), barrenador del maíz del suroeste (*Diatraea grandiosella*, SWCB), palomilla dorso de diamante (*Plutella xylostella*, DBM), barrenador europeo del maíz (*Ostrinia nubilalis*, ECB), oruga de las leguminosas (*Anticarsia gemmatalis*, VBC), gusano cortador negro (*Agrotis ipsilon*, BCW), oruga militar del sur (*Spodoptera eridania*, SAW), gusano falso medidor (*Pseudoplusia includes*, SBL), y oruga del tabaco (*Heliothis virescens*, TBW); las especies de plagas de coleópteros escarabajo de la patata (*Leptinotarsa decemlineata*, CPB), gusano de la raíz del maíz del norte (*Diabrotica barberi*, NCR), gusano

de la raíz del maíz del sur (*Diabrotica undecimpunctata howardii*, SCR), y gusano de la raíz del maíz del sur (*Diabrotica virgifera*, WCR); las especies de plagas de hemípteros chinche verde (*Nezara viridula*, SG), chinche marrón (*Euschistus heros*, NBSB), chinche ligus (*Lygus lineolaris*, TPB), y chinche del triángulo (*Lygus Hesperus*, WTP); y la especie de dípters mosquito de la fiebre amarilla (*Aedes aegypti*, YFM).

[00276] Se cultivaron *Bt* y *E. coli* transformados que expresan las proteínas PirA, las proteínas PirB, y las proteínas de fusión PirAB y se agregaron esporas o proteínas solubilizadas a la dieta del insecto para el ensayo. Se evaluaron la mortalidad y el retraso del crecimiento al comparar el crecimiento y desarrollo de insectos en una dieta que contiene una o más de las proteínas PirA, las proteínas PirB, y las proteínas de fusión PirAB, con insectos en una dieta con un cultivo de control no tratado. Se observó actividad para las plagas de insectos lepidópteros, coleópteros, hemípteros y dípteros. La actividad de bioensayo observada para cada proteína se presenta en las Tablas 14 (lepidópteros) y 15 (coleópteros, hemípteros, y dípteros), donde “+” indica actividad, una celda vasía indica que no se observó actividad, y “NA” indica que la toxina no se analizó contra esa plaga de insectos específica.

Tabla 14. Actividad de bioensayo de proteínas PirA, proteínas PirB, y proteínas de fusión PirAB contra plagas de insectos lepidópteros.

Tipo	**Toxina**	**FAW**	**CEW**	**SWCB**	**DBM**	**ECB**	**VBC**	**BCW**	**SAW**	**SBL**	**TBW**
PirA	**TIC4771**		**+**		**+**	**+**	**+**		**+**		
PirB	**TIC4772**		**+**		**+**		**+**				
Fusión	**TIC6880**	**+**	**+**	**+**	**+**	**+**	**+**				
PirA	**TIC7575**	NA	NA		NA						
PirB	**TIC7576**	NA	NA		NA						
Fusión	**TIC9316**	NA		**+**	NA	**+**	**+**	**+**	**+**		**+**
PirA	**TIC7660**	NA	NA		NA						

PirB	**TIC7661**	NA	NA		NA						
Fusión	**TIC9317**	NA	NA	+	NA	+	+				
PirA	**TIC7662**	NA	NA		NA						
PirB	**TIC7663**	NA	NA		NA						
Fusión	**TIC9318**	NA	NA	+	NA	+	+	+			+
PirA	**TIC7664**	NA	NA		NA						
PirB	**TIC7665**	NA	NA		NA						+
Fusión	**TIC9319**	NA	NA	+	NA	+	+	+			
PirA	**TIC7666**	NA	NA		NA						
PirB	**TIC7667**	NA	NA	+	NA						
Fusión	**TIC9322**	+	+	+	NA		+				
PirA	**TIC7668**	NA	NA		NA						
PirB	**TIC7669**	NA	NA		NA						
Fusión	**TIC9320**	NA	NA	+	NA	+	+				
Fusión	**TIC9321**	NA	NA		NA						
PirA	**TIC10357**	NA	NA		NA	NA	NA				NA
PirB	**TIC10366**	NA	NA		NA	NA	NA				NA
Fusión	**TIC10375**	NA	NA		NA	NA	NA				NA
PirA	**TIC10358**	NA	NA		NA	NA	NA				NA

PirB	**TIC10367**	NA	NA		NA	NA	NA				NA
Fusión	**TIC10376**	NA	NA	**+**	NA	NA	NA				NA
PirA	**TIC10360**	NA	NA		NA	NA	NA				NA
PirB	**TIC10369**	NA	NA		NA	NA	NA				NA
Fusión	**TIC10377**	NA	NA		NA	NA	NA				NA
PirA	**TIC10361**	NA	NA		NA	NA	NA				NA
PirB	**TIC10370**	NA	NA		NA	NA	NA				NA
Fusión	**TIC10378**	NA	NA	**+**	NA	NA	NA				NA
PirA	**TIC10362**	NA	NA		NA	NA	NA				NA
PirB	**TIC10371**	NA	NA		NA	NA	NA				NA
Fusión	**TIC10379**	NA		**+**	NA	NA	NA				NA
PirA	**TIC10363**	NA	NA		NA	NA	NA				NA
PirB	**TIC10372**	NA	NA	**+**	NA	NA	NA				NA
Fusión	**TIC10380**	**+**	NA		NA	NA	NA				NA
PirA	**TIC1036**	NA	NA		NA	NA	NA				NA

	4										
PirB	**TIC10373**	NA	NA		NA	NA	NA				NA
Fusión	**TIC10381**		NA		NA	NA	NA				NA
PirB	**TIC10368**	NA	NA		NA	NA	NA				NA
Fusión	**TIC10434**		NA		NA	NA	NA				NA
Fusión	**TIC11103**	NA	NA	**+**	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Fusión	**TIC11104**	NA	NA		NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Fusión	**TIC11210**	NA	NA	**+**	NA	NA	NA	**+**			NA
Fusión	**TIC11211**	NA	NA	**+**	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Fusión	**TIC11212**	NA	NA	**+**	NA	NA	NA				NA
Fusión	**TIC11301**		NA	**+**	NA	**+**	**+**		NA	NA	NA
Fusión	**TIC11302**		NA	**+**	NA	**+**	**+**		NA	NA	NA

Tabla 15. Actividad de bioensayo de proteínas PirA, proteínas PirB, y proteínas de fusión PirAB contra plagas de insectos coleópteros, hemípteros, y dípteros.

		Coleópteros				**Hemípteros**				**Dípteros**
Tipo	**Toxina**	**CPB**	**NCR**	**SCR**	**WCR**	**SGB**	**NBSB**	**TPB**	**WTP**	**YFM**
PirA	**TIC4771**	**+**	NA	NA	NA	NA		**+**		NA

PirB	**TIC4772**		NA	NA		NA		+		NA
Fusión	**TIC6880**	+	NA		+	+	+	+	+	+
PirA	**TIC7575**		NA	NA		NA	NA			NA
PirB	**TIC7576**		NA	NA	NA	NA	NA			
Fusión	**TIC9316**	+	NA	NA		+	+	+	+	NA
PirA	**TIC7660**		NA	NA	NA	NA	NA			NA
PirB	**TIC7661**		NA	NA	NA	NA	NA			NA
Fusión	**TIC9317**	+			+	+		+	+	NA
PirA	**TIC7662**		NA	NA		NA	NA			NA
PirB	**TIC7663**		NA	NA	NA	NA	NA			NA
Fusión	**TIC9318**	+			+	+	+	+	+	NA
PirA	**TIC7664**	+	NA	NA	NA	NA	NA			NA
PirB	**TIC7665**		NA	NA	NA	NA	NA			NA
Fusión	**TIC9319**	+	NA	NA		+		+	+	NA
PirA	**TIC7666**		NA	NA		NA	NA			NA
PirB	**TIC7667**		NA	NA	NA	NA	NA			NA
Fusión	**TIC9322**	+	NA	NA				+		NA
PirA	**TIC7668**		NA	NA	NA	NA	NA			NA
PirB	**TIC7669**		NA	NA	NA	NA	NA			NA
Fusión	**TIC9320**	+	NA	NA		+	+	+		NA
Fusión	**TIC9321**	+	NA	NA		NA	NA			NA
PirA	**TIC10357**	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA		NA
PirB	**TIC10366**	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA		NA
Fusión	**TIC10375**	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA		NA
PirA	**TIC10358**	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA		NA
PirB	**TIC10367**	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA		NA
Fusión	**TIC10376**	NA	+	NA	+	NA		NA		NA
PirA	**TIC10360**	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA		NA

PirB	**TIC10369**	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA		NA
Fusión	**TIC10377**	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA		NA
PirA	**TIC10361**	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA		NA
PirB	**TIC10370**	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA		NA
Fusión	**TIC10378**	NA	+	NA	+	NA	+	NA		NA
PirA	**TIC10362**	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA		NA
PirB	**TIC10371**	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA		NA
Fusión	**TIC10379**	NA	+	NA	+	NA	NA	NA		NA
PirA	**TIC10363**	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA		NA
PirB	**TIC10372**	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA		NA
Fusión	**TIC10380**	NA	+	NA	+	NA	+	NA	NA	NA
PirA	**TIC10364**	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA		NA
PirB	**TIC10373**	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA		NA
Fusión	**TIC10381**	NA	+	NA	+	NA	+	NA		NA
PirB	**TIC10368**	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA		NA
Fusión	**TIC10434**	NA	+	NA	+	NA		NA	NA	NA
Fusión	**TIC11103**	NA	NA	NA	NA	NA		NA		NA
Fusión	**TIC11104**	NA	NA	NA	NA	NA	+	NA	NA	NA
Fusión	**TIC11210**	NA	NA	NA	NA	NA	+	NA		NA
Fusión	**TIC11211**	NA	NA	NA	NA	NA	+	NA		NA
Fusión	**TIC11212**	NA	NA	NA	NA	NA		NA	NA	NA
Fusión	**TIC11301**	NA	+	NA	+	NA	+	NA	+	NA
Fusión	**TIC11302**	NA	NA	NA	+	NA	+	NA	+	NA

[00277] Como puede verse en las Tablas 14 y 15, las proteínas de toxinas PirA y PirB solas en la mayoría de los casos no demostraron actividad insecticida. Sin embargo, las proteínas de fusión que comprenden la proteína PirA y PirB de cada operón mostraron un amplio espectro de actividad contra las especies de plagas de insectos lepidópteros, coleópteros, hemípteros, y dípteranos. Algunas de las proteínas PirA y PirB no demostraron

actividad oral cuando se analizó su capacidad individual. Por ejemplo, la proteína PirA TIC4771 demostró actividad contra las especies de lepidópteros CEW, DBM, ECB, VBC, SAW, la especie de coleópteros CPB, y la especie de hemípteros TPB. La proteína PirB TIC4772 demostró actividad contra las especies de lepidópteros CEW, DBM, VBC, SAW, y la especie de hemípteros TPB. Cuando se combinaron las proteína TIC4771 y TIC4772 en la proteína de fusión PirAB TIC6880 se retuvo gran parte de la actividad contra lepidópteros (CEW, DBM, ECB, y VBC). Se perdió la actividad contra SAW, pero se observó actividad contras dos especies de insectos más FAW y SWCB. TIC6880 también demostró actividad adicional con respecto a TIC4471 y TIC4772 individuales con respecto a las especies de plagas de insectos coleópteros y hemípteros. Con respecto a los con respecto coleópteros, TIC6880 retuvo actividad contra CPB, y agregó actividad contra WCR. Con respecto a los hemípteros, TIC6880 retuvo actividad contra TPB y agregó actividad observada contra SGB, NBSB, y WTP. TIC6880 también demostró actividad contra la especie de dípteros YFM, que no se ve en TIC4771 o TIC4772.

[00278] Aunque las proteínas PirA y PirB TIC7575 y TIC7576, respectivamente, no demostraron actividad inhibidora de insectos contra los insectos analizados, la proteína de fusión PirAB correspondiente, TIC9316 demostró actividad contra las especies de lepidópteros SWCB, ECB, VBC, BCW, SAW, y TBW. TIC9316 también demostró actividad contra la especie de coleópteros CPB y las especies de hemípteros SGB, NBSB, TPB, y WTP.

[00279] Las proteínas PirA y PirB TIC7660 y TIC7661, respectivamente no demostraron actividad. Sin embargo, la proteína de fusión PirAB TIC9317 correspondiente demostró actividad contra las especies de lepidópteros SWCB, ECB, y VBC, las especies de coleópteros CPB y WCR, y las especies de hemípteros SGB, TPB, y WTP.

[00280] Las proteínas PirA y PirB TIC7662 y TIC7663, respectivamente, no demostraron actividad. Sin embargo, la proteína de fusión PirAB TIC9318 correspondiente demostró actividad contra las especies de lepidópteros SWCB, ECB, VBC, BCW, y TBW, las especies de coleópteros CPB y WCR, y las especies de hemípteros SGB, NBSB, TPB, y WTP.

[00281] La proteína PirA TIC7664 demostró actividad contra la especie de coleópteros CPB. La proteína PirB TIC7665 demostró actividad contra la especie de lepidópteros TBW. La proteína de fusión PirAB TIC9319 correspondiente demostró actividad contra las especies de lepidópteros SWCB, ECB, VBC, y BCW, las especies de coleópteros CPB y WCR, y las especies de hemípteros SGB, TPB, y WTP.

[00282] La proteína PirA TIC7666 no demostró actividad inhibidora de insectos. La proteína PirB TIC7667 demostró actividad contra la especie de lepidópteros SWCB. La proteína de fusión PirAB TIC9322 correspondiente demostró actividad contra las especies de lepidópteros FAW, CEW, SWCB y VBC, las especies de coleópteros CPB, y las especies de hemípteros TPB.

[00283] Las proteínas PirA y PirB TIC7668 y TIC7669, respectivamente, no demostraron actividad. La proteína de fusión PirAB TIC9320 correspondiente demostró actividad contra las especies de lepidópteros SWCB, ECB, y VBC, las especies de coleópteros CPB, y las especies de hemípteros SGB, NBSB, y TPB.

[00284] La proteína de fusión PirAB TIC9321 demostró actividad contra la plaga de coleópteros CPB.

[00285] La proteína PirA TIC10357, proteína PirB TIC10366, y la proteína de fusión PriAB TIC10375 correspondiente no demostraron actividad contra la cantidad limitada de lepidópteros analizados.

[00286] La proteína PirA TIC10358 y proteína PirB TIC10367, respectivamente, no mostraron actividad contra las especies de insectos analizadas. Sin embargo, la proteína de fusión PirAB TIC10376 correspondiente demostró actividad contra la especie de plaga de insectos lepidópteros, SWCB y las especies de plaga de insectos coleópteros, NCR y WCR.

[00287] La proteína PirA TIC10360 y la proteína PirB TIC10369, respectivamente, no demostraron actividad contra la cantidad limitada de especies de plaga de insectos lepidópteros analizadas.

[00288] La proteína PirA TIC10361 y la proteína PirB TIC10370, respectivamente, no demostraron actividad contra la cantidad limitada de especies de plaga de insectos lepidópteros analizadas. Sin embargo, la proteína de fusión TIC10378 correspondiente demostró actividad contra la especie de plaga de insectos lepidópteros, SWCB, las especies de plaga de coleópteros, NCR y WCR, y la especie de plaga de hemípteros, NBSB.

[00289] La proteína PirA TIC10362 y la proteína PirB TIC10371 no demostraron actividad contra la cantidad limitada de especies de plaga de insectos lepidópteros analizadas.

[00290] La proteína PirA TIC10363 no demostró actividad contra la cantidad limitada de especies de plaga de insectos analizadas. La proteína PirB TIC10372 demostró actividad contra la especie de insectos lepidópteros SWCB. La proteína de fusión TIC10380 correspondiente retuvo actividad contra la especie de plaga de insectos lepidópteros, SWCB, y agregó actividad contra las especies de plaga de coleópteros NCR y WCR y la especie de plaga de hemípteros NBSB.

[00291] La proteína PirA TIC10364 y la proteína PirB TIC10373 no demostraron actividad contra la cantidad limitada de especies de plaga de insectos analizadas. La proteína de fusión TIC10381 correspondiente demostró actividad contra las especies de plaga de coleópteros, NCR y WCR, y la especie de plaga de hemípteros, NBSB.

[00292] La proteína de fusión PirAB TIC10434 demostró actividad contra la especie de plaga de coleópteros NCR y WCR.

[00293] La proteína de fusión PirAB TIC11103 demostró actividad contra la especie de plaga de lepidópteros SWCB.

[00294] La proteína de fusión PirAB TIC1104 demostró actividad contra la especie de hemípteros NBSB.

[00295] La proteína de fusión PirAB TIC11210 demostró actividad contra las especies de plaga de lepidópteros, SWCB y BCW, y la especie de plaga de hemípteros, NBSB.

[00296] La proteína de fusión PirAB TIC11211 demostró actividad contra la especie de plaga de lepidópteros, SWCB, y la especie de hemípteros, NBSB.

[00297] La proteína de fusión PirAB TIC11212 demostró actividad contra la especie de plaga de insectos lepidópteros SWCB.

[00298] La proteína de fusión PirAB TIC11301 demostró actividad contra las especies de plagas de lepidópteros SWCB, ECB, y VBC, las especies de plaga de coleópteros NCR y WCR, y las especies de plagas de hemípteros NBSB, y WTP.

[00299] La proteína de fusión PirAB TIC11302 demostró actividad contra las especies de plagas de lepidópteros SWCB, ECB, y VBC, la especie de plaga de coleópteros WCR, y las especies de plagas de hemípteros NBS, y WTP.

EJEMPLO 3

La mezcla de las PirA, PirB, y proteínas de fusión PirAB demuestra actividad contra lepidópteros, coleópteros, y hemípteros en bioensayo de insectos

[00300] Este Ejemplo ilustra la actividad inhibidora exhibida al mezclar las proteínas PirA TIC7575 y TIC7660 con las proteínas PirB TIC7576 y TIC7661, así como también al mezclar las proteínas de fusión PirAB TIC9316 y TIC9317; TIC9316 con TIC11301; y TIC9317 y TIC11302 en varias concentraciones.

[00301] Las mezclas de las proteínas PirA y PirB y las mezclas de las proteínas de fusión PirAB en varias concentraciones se presentaron en la dieta de insectos y se analizaron para determinar la actividad contra las especies de plagas de lepidópteros BCW, SWC, y VBC, las especies de plagas de coleópteros WCR y NCR, y la especie de plagas de hemípteros NBSB. Las mezclas comprendían diferentes concentraciones de las proteínas de toxinas. La Tabla 16 a continuación muestra las especies de insectos en las que se observó actividad para cada mezcla.

Tabla 16. Actividad de bioensayo de mezclas de las proteínas de toxinas PirA y PirB y mezclas de las proteínas de fusión PirAB.

Mezcla	Actividad
TIC7575 0,0625mg/mL; TIC7576 0,1875mg/mL	BCW; VBC; NBSB
TIC7575 0,0625mg/mL; TIC7576 0,1875mg/mL; doble para ,5mg/mL final	NCR; WCR; NBSB
TIC7575 0,0625mg/mL; TIC7661 0,1875mg/mL; doble para ,5mg/mL final	NCR; WCR
TIC7660 0,0625mg/mL; TIC7576 0,1875mg/mL; doble para ,5mg/mL final	NCR; WCR
TIC7660 0,0625mg/mL; TIC7661 0,1875mg/mL; doble para ,5mg/mL final	NCR; WCR
TIC7575 0,0625mg/mL; TIC7576 0,125mg/mL; TIC7660 0,0625mg/mL	WCR; VBC
TIC7575 0,0625mg/ml; TIC7660 0,0625mg/mL; TIC7661 0,125mg/mL	WCR
TIC9316 0,04mg/mL; TIC9317 0,01mg/mL	VBC
TIC9316 0,025mg/mL; TIC9317 0,025mg/mL	VBC
TIC9316 0,25mg/ml; TIC9317 0,25mg/mL	NBS
TIC9316 0,4mg/mL; TIC9317 0,1mg/mL	NBS
TIC9316 0,04mg/mL; TIC11301 0,01mg/mL	VBC; SWC

TIC9316 0,025mg/mL; TIC11301 0,025mg/mL	VBC
TIC9316 0,01mg/mL; TIC11301 0,04mg/mL	VBC
TIC9316 0,1mg/mL; TIC11301 0,4mg/mL	NBS
TIC9316 0,4mg/mL; TIC11301 0,1mg/mL	VBC; NBSB
TIC9317 0,01mg/mL; TIC11302 0,04mg/mL	VBC
TIC9317 0,25mg/mL; TIC11302 0,25mg/mL	NBS

[00302] Tal como puede verse en la Tabla 16, las mezclas de las proteínas PirA TIC7575 y TIC7660 con las proteínas PirB TIC7576 y TIC7661 proporcionaron actividad similar a las proteínas de fusión correspondientes, TIC9316 y TIC9317. Las mezclas de las proteínas de fusión PirAB TIC9316 y TIC9317; TIC9316 con TIC11301; y TIC9317 y TIC11302 demostraron actividad similar a una o ambas proteínas de fusión.

EJEMPLO 4

Diseño de secuencias de codificación sintéticas que codifican las proteínas de fusión PirAB TIC6880PL, TIC9316, TIC9317, TIC9318, TIC9319, TIC9320, TIC9322, TIC10376PL, TIC10378PL, TIC10380PL, TIC10381PL, TIC11103, TIC11104, y TIC11302 para la expresión en células vegetales

[00303] Se construyeron secuencias de codificación sintéticas o artificiales para usar en la expresión de las proteínas de fusión PirAB TIC6880PL, TIC9316, TIC9317, TIC9318, TIC9319, TIC9320, TIC9322, TIC10376PL, TIC10378PL, TIC10380PL, TIC10381PL, TIC11103, TIC11104, y TIC11302 en plantas. Estas secuencias de codificación sintéticas se clonaron en vectores de transformación de plantas binarios y se usaron para transformar células vegetales. Las secuencias de ácido nucleico sintéticas se sintetizaron de acuerdo con métodos descritos generalmente en la patente estadounidense 5,500,365, evitando determinadas secuencias de problemas perjudiciales tales como las secuencias de poliadenilación vegetal ricas en ATTTA y A/T y al mismo tiempo conservando la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión PirAB. La secuencia de codificación sintética para las proteínas de fusión PirAB TIC6880PL, TIC9316, TIC9317, TIC9318, TIC9319, TIC9320,

TIC9322, TIC10376PL, TIC10378PL, TIC10380PL, TIC10381PL, y TIC11302 se presentaron en la Tabla 17. Las secuencias de codificación que codifican TIC6880PL, TIC10376PL, TIC10378PL, TIC10380PL, y TIC10381PL contenían un codón de alanina adicional inmediatamente después del residuo iniciador de metionina de la parte de las secuencias de codificación de PirA correspondientes dentro de la secuencia de codificación de la proteína de fusión PirAB.

Tabla 17. Secuencias de codificación sintéticas usadas para la expresión en células vegetales que codifican las proteínas PirAB TIC6880PL, TIC9316, TIC9317, TIC9318, TIC9319, TIC9320, TIC9322, TIC10376PL, TIC10378PL, TIC10380PL, TIC10381PL, y TIC11302.

Proteína de fusión PirAB	Nucleótidos SEQ ID NO:	Proteína SEQ ID NO:	Proteína PirA	Proteína PirB
TIC6880PL*	49	50	TIC4771*	TIC4772
TIC9316	51	12	TIC7575	TIC7576
TIC9317	52	18	TIC7660	TIC7661
TIC9318	53	24	TIC7662	TIC7663
TIC9319	54	30	TIC7664	TIC7665
TIC9320	55	42	TIC7668	TIC7669
TIC9322	56	36	TIC7666	TIC7667
TIC10376PL*	146	147	TIC10358*	TIC10367
TIC10378PL*	148	149	TIC10361*	TIC10370
TIC10380PL*	150	151	TIC10363*	TIC10372
TIC10381PL*	152	153	TIC10364*	TIC10373
TIC11302	158	119	TIC7660	TIC7576

* comprende un residuo de alanina adicional inmediatamente después del residuo iniciador de metionina.

[00304] Las secuencias de codificación sintéticas y secuencias de proteínas correspondientes para TIC11103 y TIC11104 se presentan en la Tabla 18 a continuación.

Tabla 18. Secuencias de codificación sintéticas usadas para la expresión en células vegetales que codifican las proteínas de fusión PirAB TIC11103 y TIC11104.

Proteína de fusión PirAB	Nucleótidos SEQ ID NO:	Proteína SEQ ID NO:	Proteína PirB	Proteína PirA
TIC11103	154	155	TIC7661	TIC7660
TIC11104	156	157	TIC7663	TIC7662

EJEMPLO 5

Casetes de expresión para la expresión de proteínas de fusión PirAB en células vegetales

[00305] Se diseñó una variedad de casetes de expresión vegetal con las secuencias tal como se establece en la Tabla 17. Dichos casetes de expresión son útiles para la expresión transitoria en protoplastos vegetales o transformación de células vegetales. Se diseñan casetes de expresión típicos con respecto a la colocación eventual de la proteína dentro de la célula vegetal. Para una proteína dirigida a plástidos, las secuencias de codificación de proteína pesticida sintéticas TIC6880PL, TIC9316, TIC9317, TIC9318, TIC9319, TIC9320, TIC9322, TIC10376PL, TIC10378PL, TIC10380PL, TIC10381PL, TIC11103, TIC11104, y TIC11302 están unidas de manera operativa y en marco con una secuencia de codificación de péptidos señal dirigidos a cloroplastos. Los vectores de transformación vegetal resultantes comprenden un primer casete de transgén para la expresión de la proteína pesticida que comprende un promotor constitutivo, unido de manera operativa 5´ a un líder, unido de manera operativa 5´ a un intrón (u opcionalmente a ningún intrón), unido de manera operativa 5´ a una secuencia de codificación sintética que codifica una proteína TIC6880PL, TIC9316, TIC9317, TIC9318, TIC9319, TIC9320, TIC9322, TIC10376PL, TIC10378PL, TIC10380PL, TIC10381PL, TIC11103, TIC11104, y TIC11302 dirigida o no dirigida a plástidos, que a su vez

está unida de manera operativa 5´ a una 3´ UTR y, un segundo casete de transgén para la selección de células vegetales transformadas usando selección de glifosato o antibiótico. Todos los elementos descritos anteriormente están dispuestos de manera contigua a menudo con secuencia adicional proporcionada para la construcción del casete de expresión tales como sitios de endonucleasa de restricción o sitios de clonación independiente de ligación.

EJEMPLO 6

Plantas transgénicas de maíz que expresan TIC9316, TIC9317, TIC9318, TIC10376, TIC10378, TIC10380, y TIC10381 demuestran actividad contra especies de plaga de lepidópteros

[00306] Este Ejemplo ilustra la actividad inhibidora de las proteínas de fusión PirAB TIC9316, TIC9317, TIC9318, TIC10378, TIC10380, y TIC10381 cuando se expresan en plantas transgénicas de maíz y se analizan en especies de plagas de insectos lepidópteros.

[00307] Los vectores de transformación vegetal binarios que comprenden casetes de transgén diseñados para expresar TIC9316, TIC9317, TIC9318, TIC10376, TIC10378, TIC10380, o TIC10381 se clonaron usando métodos conocidos en la técnica. El vector de transformación vegetal comprendía un primer casete de transgén para la expresión de la proteína pesticida TIC9316, TIC9317, TIC9318, TIC10376, TIC10378, TIC10380, o TIC10381 que comprendía un promotor expresable vegetal, unido de manera operativa 5´ a un líder, unido de manera operativa 5´ a un intrón, unido de manera operativa 5´ a una secuencia de codificación sintética que codifica TIC9316, TIC9317, TIC9318, TIC10376, TIC10378, TIC10380, o TIC10381, unido de manera operativa 5´ a una 3´ UTR y, un segundo casete de transgén para la selección de células vegetales transformadas usando glifosato. Los vectores resultantes se utilizaron para transformar de manera estable plantas de maíz usando un método de transformación mediado por *Agrobacterium*. Las células transformadas se indujeron a formar plantas mediante métodos conocidos en la técnica. Se realizaron bioensayos usando discos de hojas de plantas análogos a los descritos en la patente estadounidense n.° 8,344,207. Se usó una planta de maíz no transformada para obtener tejido

que se usará como control negativo. Se evaluaron múltiples eventos de transformación de cada vector binario contra las especies de plagas de lepidópteros FAW, CEW, SWCB, ECB, y BCW.

[00308] Varios eventos transformados que expresan TIC9316 demostraron actividad inhibidora buena a moderada contra SWCB y ECB. Asimismo, los eventos transformados que expresan TIC9317 también demostraron actividad inhibidora buena a moderada contra SWCB y ECB. Los eventos transformados que expresan TIC9318 demostraron actividad inhibidora buena a excelente contra SWCB y ECB. Los eventos transformados que expresan TIC10376, TIC10378, TIC10380, y TIC10381 demostraron actividad inhibidora buena a moderada contra SWCB.

EJEMPLO 7

Ensayo de actividad de las proteínas de fusión PirAB contra plagas de coleópteros de gusano de la raíz del maíz cuando se expresan en plantas de maíz transformadas de manera estable

[00309] Este Ejemplo ilustra la actividad inhibidora de TIC6880PL, TIC9316, TIC9317, TIC9318, TIC9319, TIC9320, TIC9322, TIC10376PL, TIC10378PL, TIC10380PL, TIC10381PL, TIC11103, TIC11104, o TIC11302 contra diferentes especies de coleópteros que se alimentan de las raíces del maíz.

[00310] Los vectores de transformación vegetal binarios que comprenden casetes de transgén diseñados para expresar TIC6880PL, TIC9316, TIC9317, TIC9318, TIC9319, TIC9320, TIC9322, TIC10376PL, TIC10378PL, TIC10380PL, TIC10381PL, TIC11103, TIC11104, o TIC11302 tanto dirigida como no dirigida a plástidos se clonaron usando métodos conocidos en la técnica y comprenden las secuencias tal como se muestra en las Tablas 17 y 18. Los vectores resultantes se utilizan para transformar de manera estable plantas de maíz usando métodos conocidos en la técnica. Se seleccionan y se cultivan eventos de inserción de T-ADN individuales. La actividad pesticida se analiza contra las plagas de coleópteros

NCR, SCR, y WCR que se alimentan de las raíces de las plantas de maíz transformadas de manera estable.

[00311] Las plantas transformadas de manera estable R_0 se usan para analizar la resistencia a coleópteros así como también para generar la progenie F_1. Se seleccionan múltiples eventos de copia individuales de cada transformación de vector binario. Una parte de los eventos que surgen de cada transformación de vector binario se usan en el ensayo de coleópteros R_0, mientras que otra parte de los eventos se usa para generar progenie F_1 para análisis adicionales.

[00312] Las plantas del ensayo R_0 se trasplantan a macetas de ocho pulgadas [20,32 cm]. Las plantas se inoculan con huevos de WCR, NCR, o SCR. Los huevos se incuban durante aproximadamente 10 (diez) días antes de la inoculación para permitir que se produzca la rotura del cascarón 4 (cuatro) días después de la inoculación para garantizar sobreviva una cantidad suficiente de larvas y puedan atacar las raíces del maíz. Las plantas transformadas se inoculan en aproximadamente la etapa V2 a V3. Las plantas se cultivan después de la infestación durante aproximadamente 28 (veintiocho) días. Las plantas se sacan de las macetas y las raíces se lavan cuidadosamente para retirar toda la tierra. Se evalúa el daño en las raíces usando una escala de clasificación del daño de 1-5, tal como se presenta en la Tabla 19. También se realiza comparación con los controles negativos para garantizar que el ensayo se haya realizado de manera adecuada. En el ensayo de coleópteros se usan múltiples eventos R_0 para cada transformación de vector binario. Los puntajes de daño en las raíces indican la resistencia conferida por la proteína de fusión PirAB analizada a la plaga de coleópteros analizada.

Tabla 19. Puntajes de clasificación de daño en las raíces R_0.

Puntaje de daño en las raíces	Descripción
1	No presenta alimentación visible
2	Algo de alimentación; no

Puntaje de daño en las raíces	Descripción
	hay poda
3	Poda de al menos una raíz
4	Nodo entero podado
5	Más de un nodo podado

[00313] Una parte de los eventos transformados de manera estable R_0 que surgen de cada transformación de vector binario se usa para producir la progenie F_1. Se permite que las plantas transformadas de manera estable R_0 de autofertilicen, produciendo la progenie F_1. Se planta la semilla F_1. Las plantas heterocigotas se identifican a través de métodos moleculares conocidos en la técnica y se usan para ensayo contra las plagas de coleópteros, así como también medidas de expresión de ELISA de la proteína de toxina. Una parte de la progenie F_1 heterocigota de cada evento se usa para ensayo de insectos, mientras que otra parte se usa para medir la expresión de proteínas de toxina.

[00314] Los huevos de WCR, NCR, o SCR de incuban durante aproximadamente 10 (diez) días para permitir la rotura del cascarón dentro de 4 (cuatro) días después de la inoculación. Para WCR, cada maceta se inocula con alrededor de dos mil huevos. Para NCR, es posible que se usen menos huevos debido a su menor disponibilidad de huevos de esta especie. Las plantas se inoculan en aproximadamente la etapa V2 a V3. Las plantas se cultivan después de la infestación durante aproximadamente 28 (veintiocho) días. Las plantas se sacan de las macetas y las raíces se lavan cuidadosamente para retirar toda la tierra. Se evalúa el daño en las raíces usando una escala de clasificación del daño de 0-3, tal como se presenta en la Tabla 20. Se realiza comparación con el control negativo para garantizar que el ensayo se haya realizado de manera adecuada. Los puntajes de daño en las raíces indican resistencia conferida por TIC6880PL, TIC9316, TIC9317, TIC9318, TIC9319, TIC9320, TIC9322, TIC10376PL, TIC10378PL, TIC10380PL, TIC10381PL, TIC11103, TIC11104, o TIC11302 a la plaga de coleópteros.

Tabla 20. Puntajes de clasificación de daño en las raíces F_1.

Puntaje de daño en las raíces	Descripción
0	No presenta alimentación visible
0,01-0,09	Marcas y rastros de alimentación
0,1-0,9	Poda de raíces. pero menos de un nodo completo
1,0-1,9	Al menos un nodo completo (o equivalente) destruido dentro de 1,5 pulgadas [3,81 cm] de la planta
2,0-2,9	Dos o más nodos eliminados
3	Tres o más nodos eliminados

EJEMPLO 8

Ensayo de actividad de las proteínas de fusión PirAB contra plagas de lepidópteros cuando se expresan en plantas de maíz, soja o algodón transformadas de manera estable.

[00315] Este Ejemplo ilustra el ensayo de actividad contra varias especies de plagas de lepidópteros del tejido alimentado de plantas de maíz; soja o algodón transformadas de manera estable que expresan una de las proteínas de fusión PirAB.

[00316] Los vectores de transformación vegetal binarios que comprenden casetes de transgén diseñados para expresar versiones tanto dirigidas como no dirigidas a plástidos de las proteínas de fusión PirAB se clonaron usando métodos conocidos en la técnica y comprenden las secuencias de codificación tal como se presentan en las Tablas 17 y 18.

[00317] El maíz, soja, o algodón se transforma con los vectores de transformación binarios descritos anteriormente usando un método de transformación mediado por *Agrobacterium*. Las células transformadas se inducen a formar plantas mediante métodos conocidos en la técnica. Se realizan bioensayos usando discos de hojas de plantas análogos

a los descritos en la patente estadounidense n.° 8,344,207. Se usa una planta de maíz, soja, o algodón no transformada para obtener tejido que se usará como control negativo. Se evalúan múltiples eventos de transformación de cada vector binario contra las plagas de lepidópteros tales como, de modo no taxativo, BCW, CEW, DBM, ECB, FAW, SAW, SBL, SWCB, TBW, y VBC. Se determina que esos insectos que demuestran retraso del crecimiento y/o mortalidad en el bioensayo de insectos son susceptibles a los efectos de las proteínas de fusión PirAB analizadas.

EJEMPLO 9

Ensayo de actividad de las proteínas de fusión PirAB contra plagas de alticinos cuando se expresan en plantas de colza transformadas de manera estable

[00318] Este Ejemplo ilustra el ensayo de actividad contra varias especies de plagas de alticinos cuando se dejan alimentar de plantas transgénicas enteras de colza o tejidos derivados de plantas transgénicas de colza que expresan una de las proteínas de fusión PirAB.

[00319] Los vectores de transformación vegetal binarios que comprenden casetes de transgén diseñados para expresar versiones tanto dirigidas como no dirigidas a plástidos de las proteínas de fusión PirAB se clonaron usando métodos conocidos en la técnica y comprenden las secuencias de codificación tal como se presentan en las Tablas 17 y 18.

[00320] Los vectores de transformación binarios resultantes se utilizan para transformar de manera estable células vegetales de colza usando métodos conocidos en la técnica. Las células transformadas se inducen para formar plantas. Se realizan bioensayos usando discos de hojas de plantas análogos a los descritos en la patente estadounidense n.° 8,344,207 usando alticinos recoletados en el campo. Se usa una planta de colza no transformada para obtener tejido que se usará como control negativo. Se evalúan múltiples eventos de transformación de cada vector binario contra las plagas de coleópteros de alticinos tales como, de modo no taxativo, pulguillas de las crucíferas (*Phyllotreta cruciferae*), pulguilla

rayada (*Phyllotreta striolata*), y pulguilla negra (*Phyllotreta pusilla*). La mortalidad de los alticinos se determina cada día a medida que los alticinos continúan alimentándose. Los discos de hojas se cambian cada 2 (dos) a 3 (tres) días en un período de 12 (doce) días para garantizar que haya material fresco disponible para la alimentación de los alticinos, y para reducir cualquier impacto de la degradación de proteínas en una muestra.

[00321] De manera alternativa, las plantas de colza transformadas se pueden plantar en un campo donde está presente una infestación de alticinos. Las plantas pueden alojarse en una carpa para evitar que los alticinos que emergen de la tierra se escapen de los terrenos experimentales. Se pueden tomar clasificaciones de dalo de las hojas de colza para determinar qué plantas experimentaron menor daño y demostraron resistencia a los alticinos.

Ejemplo 10

Ensayo de la actividad de las proteínas de fusión PirAB contra plagas de hemípteros en plantas de soja transformadas de manera estable

[00322] Este Ejemplo describe el ensayo de actividad contra plagas de insectos hemípteros en plantas de soja transformadas de manera estable para expresar una de las proteínas de fusión The PirAB.

[00323] Los vectores de transformación vegetal binarios que comprenden casetes de transgén diseñados para expresar versiones tanto dirigidas como no dirigidas a plástidos de una de las proteínas de fusión PirAB se clonaron usando métodos conocidos en la técnica y comprenden las secuencias de codificación tal como se presentan en las Tablas 17 y 18. Las plantas de soja se transforman usando los vectores de transformación vegetal binarios. Las células vegetales de soja transformadas se inducen para formar plantas enteras. El ensayo para determinar la actividad contra las plagas de hemípteros se realiza usando una variedad de técnicas que dependerán de las especies de plagas de hemípteros y el tejido objetivo preferido de esa plaga. Por ejemplo, las especies de plagas de hemípteros de chinches típicamente se alimentan de semillas en desarrollo y vainas de la planta de soja. Para someter a ensayo la actividad de las chinches, se cosechan las vainas en la etapa R5 de plantas

transgénicas de soja que expresan una de las proteínas de fusión PirAB y se colocan en una placa de Petri o una placa grande de múltiples pocillos que contiene una capa de agar o papel húmedo para proporcionar humedad al entorno alimenticio. Las ninfas de chinches en segundo estadio se colocan en la placa de Petri o placa grande de múltiples pocillos. Una cubierta que proporciona el intercambio de oxígeno y al mismo tiempo evita la desecación se coloca sobre el entorno alimenticio. Se permite que las ninfas de chinches se alimenten durante varios días. Se toman medidas de retraso del crecimiento y mortalidad y se comparan con las ninfas de chinches que se alimentan de vainas de plantas de soja no transformadas.

[00324] De manera alternativa, el ensayo de actividad también se puede realizar en plantas enteras transformadas de manera estable. Las plantas transformadas que expresan una de las proteínas de fusión PirAB se cultivan en una cámara de crecimiento o en el invernadero. En la etapa R5, las plantas se colocan en una jaula hecha de láminas de “polinización” de plástico respirable (Vilutis and Company Inc, Frankfort, IL). Las mangas de las láminas se aseguran al tallo principal justo por encima de la superficie del suelo usando una atadura con Velcro®. Cada planta se infesta con una cantidad específica de ninfas de chinches en segundo estadio. Las ninfas se liberan en cada jaula individual a través de una rendija pequeña en el lado de la jaula y luego la jaula se asegura cerrada garantizando que los insectos no escapen. Se permite que las ninfas se alimenten de las vainas de soja durante varios días a una semana o más. Se realizan observaciones cada día para determinar medidas del retraso del crecimiento y mortalidad. Al final del período de alimentación, se recolectan las ninfas vivas y muertas. Las plantas se cortan debajo de las jaulas y se llevan a un laboratorio donde se recolectan los insectos para cada planta. Antes de abrir la jaula, las plantas se agitan vigorosamente para garantizar que caigan todos los insectos desde sus sitios de alimentación a la base de la jaula. Luego se abre la base de la jaula y se retira todo el material de la planta y se coloca en una lámina negra. Los insectos pueden recolectarse usando un aspirador o algún otro medio. Se registra la cantidad de insectos y su etapa de desarrollo para cada planta. También se registra la cantidad y etapa de desarrollo de las ninfas muertas. Estas medidas se comparan con las medidas obtenidas de las plantas no transformadas de control negativo.

[00325] Los retrasos en el desarrollo de ninfas de chinches (retraso del crecimiento) o mortalidad se interpretan como un indicio de toxicidad si, en comparación con los controles no transformados, hay una diferencia significativa.

Ejemplo 11

Ensayo de la actividad de las proteínas de fusión PirAB contra plagas de hemípteros en plantas de maíz transformadas de manera estable

[00326] Este Ejemplo describe el ensayo de actividad contra plagas de insectos hemípteros en plantas de maíz transformadas de manera estable para expresar una de las proteínas de fusión The PirAB.

[00327] Los vectores de transformación vegetal binarios que comprenden casetes de transgén diseñados para expresar versiones tanto dirigidas como no dirigidas a plástidos de una de las proteínas de fusión PirAB se clonaron usando métodos conocidos en la técnica y comprenden las secuencias de codificación tal como se presentan en las Tablas 17 y 18. Las plantas de maíz se transforman usando los vectores de transformación vegetal binarios. Las células vegetales de maíz transformadas se inducen para formar plantas enteras. El ensayo para determinar la actividad contra las plagas de hemípteros se realiza usando una variedad de técnicas que dependerán de las especies de plagas de hemípteros y el tejido objetivo preferido de esa plaga. Por ejemplo, las especies de plagas de hemípteros de chinches típicamente se alimentan de plantas de maíz jóvenes en los últimos meses de primavera o primeros meses de verano, lo que da como resultado orificios en la hoja, y si es grave, plantas deformadas. En los últimos meses de verano, las chinches típicamente se alimentan de la mazorca misma, destruyendo directamente los granos.

[00328] Un método para analizar la actividad de las chinches es exponer las ninfas de chinches a discos de hoja derivados de plantas de maíz transformadas de manera estable que expresan una de las proteínas de fusión PirAB en placas grandes de múltiples pocillos. Las ninfas de chinches en segundo estadio se colocan en placas grandes de múltiples pocillos con

discos de hoja derivados de plantas de maíz transformadas de manera estable y se permite que se alimenten durante varios días. Se toman medidas de retraso del crecimiento y mortalidad y se comparan con las ninfas de chinches que se han alimentado de discos de hojas de maíz no transformados.

[00329] De manera alternativa, se pueden utilizar plantas enteras transformadas para someter a ensayo la actividad de las chinches. Las plantas de maíz transformadas de manera estable que expresan una de las proteínas de fusión PirAB se colocan en jaulas de manera similar a lo descrito para las plantas de soja en el Ejemplo 4. Las ninfas de chinches en segundo estadio se introducen en plantas de maíz en etapa V3 y se permite que se alimenten durante varios días a una semana. Después del período de alimentación prescrito, se recolectan las ninfas vivas y muertas. Las medidas de retraso del crecimiento y mortalidad se comparan con plantas de control no transformadas.

[00330] Para someter a ensayo la actividad de las chinches usando mazorcas de maíz transformadas de manera estable, se puede adoptar un enfoque similar al del ensayo en plantas en etapa V3. Las mazorcas de maíz en desarrollo de plantas de maíz transformadas de manera estable que expresan una de las proteínas de fusión PirAB se encapsulan usando láminas de material que permite el intercambio libre de aire y al mismo tiempo permite el escape de las ninfas de chinches. Las mazorcas encapsuladas se infestan con ninfas de chinches en segundo estadio y se permite que se alimenten de los granos en desarrollo de la mazorca durante varios días a una semana. Las medidas de retraso del crecimiento y mortalidad se comparan con mazorcas de plantas de control no transformadas.

Ejemplo 12

Ensayo de la actividad de las proteínas de fusión PirAB contra plagas de hemípteros en plantas de algodón transformadas de manera estable

[00331] Este Ejemplo describe el ensayo de actividad contra plagas de insectos hemípteros en plantas de algodón transformadas de manera estable para expresar una de las proteínas de fusión The PirAB.

[00332] Los vectores de transformación vegetal binarios que comprenden casetes de transgén diseñados para expresar versiones tanto dirigidas como no dirigidas a plástidos de una de las proteínas de fusión PirAB se clonaron usando métodos conocidos en la técnica y comprenden las secuencias de codificación tal como se presentan en las Tablas 17 y 18. Las plantas de algodón se transforman usando los vectores de transformación vegetal binarios. Las células vegetales de algodón transformadas se inducen para formar plantas enteras. El ensayo para determinar la actividad contra las plagas de hemípteros se realiza usando una variedad de técnicas que dependerán de las especies de plagas de hemípteros y el tejido objetivo preferido de esa plaga. Por ejemplo, las especies de plagas de hemípteros de chinches se alimentan típicamente de semillas y, por lo tanto, la lesión en las cápsulas de algodón es la preocupación principal. Principalmente dañan el algodón al perforar las cápsulas y se alimentan de las semillas. Su actividad alimenticia puede dar como resultado manchas oscuras de alrededor de 1/16 de pulgada [1,6 mm] de diámetro en la parte exterior de las cápsulas más grandes donde se produjo la alimentación. La alimentación de semillas puede dar como resultado producción reducida de hebras y hebras manchadas cerca del sitio de alimentación. Por su tamaño, los adultos y las ninfas en cuarto y quinto estadio tienen el mayor potencial para dañar las cápsulas, y por lo tanto es importante matar el insecto en sus etapas de ninfa más tempranas. La especie de plaga de Lygus se alimenta principalmente de los cuadrados y cápsulas jóvenes. Las ninfas se alimentan de manera más voraz y tienden a provocar el daño más severo. Cuando se alimentan de los cuadrados, Lygus se dirige a las anteras en desarrollo que a menudo da como resultado que el cuadrado se marchite y caiga de la planta. Para aquellos cuadrados que se desarrollan en cápsulas, es posible que las cápsulas tengan anteras que no pueden formar polen, semillas no fertilizadas, y lóculos vacíos. Cuando se alimentan de las cápsulas, Lygus se dirige a semillas en desarrollo, lo que provoca pequeñas manchas negras hundidas en el exterior de la cápsula.

[00333] Un método para someter a ensayo la actividad de las proteínas de fusión The PirAB en plantas de algodón transformadas de manera estable es usar cuadrados en un bioensayo de insectos. Los cuadrados se cultivan de plantas de algodón transformadas que expresan TIC6880PL, TIC9316, TIC9317, TIC9318, TIC9319, TIC9320, TIC9322, TIC10376PL, TIC10378PL, TIC10380PL, TIC10381PL, TIC11103, TIC11104, o TIC11302. Los cuadrados pueden colocarse en una placa de petri o cada cuadrado en un pocillo de una placa grande de pocillos. Se colocan Lygus neonatos jóvenes o ninfas de chinches en la placa de petri o placa grande de pocillos y se permite que se alimenten durante un tiempo prescrito. Se toman medidas del retraso del crecimiento y mortalidad durante el transcurso de tiempo de alimentación y se comparan con controles en los que se usan cuadrados derivados de plantas de algodón no transformadas en ensayo.

[00334] De manera alternativa, el ensayo de actividad se puede realizar en plantas de algodón enteras transformadas. Por ejemplo, para analizar contra la especie Lygus, se muestran semillas R_1 derivadas de plantas que expresan una de las proteínas de fusión PirAB en macetas de 10 pulgadas [24,5 cm]. Una planta de algodón no transformada, preferentemente de la misma variedad que las plantas transformadas, se usa como control negativo. Las plantas se mantienen en una cámara de ambiente con un fotoperíodo de 16 (dieciséis) horas de luz a 32 (treinta y dos) grados Celsius y 8 (ocho) horas de oscuridad a 23 (veintitrés) grados Celsius, y una intensidad de luz entre 800 (ochocientos) y 900 (novecientos) micro-Einsteins. 40 (cuarenta) a 45 (cuarenta y cinco) días después de plantadas, las plantas individuales se colocan en una jaula hecha de láminas de “polinización” de plástico respirable (Vilutis and Company Inc, Frankfort, IL). Las mangas de las láminas se aseguran al tallo principal justo por encima de la superficie del suelo usando una atadura con Velcro®. Se recolectan dos pares de adultos hembra y macho sexualmente maduros *Lygus lineolaris* o *Lygus hesperus* (de seis días) de un cultivo de laboratorio en un tubo plástico de fondo redondo de catorce mililitros (Bacton Dickson Labware, Franklin Lakes, NJ) y se usaron para cada planta. Los adultos se liberan en cada jaula individual a través de una rendija pequeña en el lado de la jaula y luego la jaula se asegura cerrada garantizando que los insectos no escapen. Se permite que los insectos se apareen y las plantas se mantienen en la jaula durante 21 (veintiún) días.

[00335] Después de 21 (veintiún) días, las plantas se cortan debajo de las jaulas y se llevan a un laboratorio donde se recolectan los insectos para cada planta y se cuentan. Antes de abrir la jaula, las plantas se agitan vigorosamente para garantizar que caigan todos los insectos desde sus sitios de alimentación a la base de la jaula. Luego se abre la base de la jaula y se retira todo el material de la planta y se coloca en una lámina negra. Los insectos se recolectan usando un aspirador. Luego la planta se inspecciona minuciosamente para recuperar cualquier insecto restante. Se registra la cantidad de insectos recolectados y su etapa de desarrollo para cada planta. Los conteos de insectos se dividen en varios grupos en función de la madurez de Lygus: ninfas hasta el 3.er estadio, 4.to estadio, 5.to estadio y adultos.

[00336] Para analizar con las especies de chinches, se siembran en macetas semillas R1 derivadas de plantas que expresan una de las proteínas de fusión PirAB y se cultivan y colocan en jaulas tal como se describió anteriormente. Las plantas de algodón no transformadas también se usan como control negativo. Las ninfas de chinches en segundo estadio se usan para infestar las plantas y se permite que se alimenten de los cuadrados y cápsulas durante varios días o semanas. Las plantas en jaula se recolectan tal como se describió anteriormente y las chinches recolectadas se examinan y se determinan los puntajes de mortalidad, así como también se registra la madurez de las ninfas. Estos puntajes luego se comparan con las plantas de control negativo.

EJEMPLO 13

TIC9318 y TIC11302 demuestran actividad contra plagas de gusano de la raíz del maíz occidental cuando se expresan en plantas de maíz transformadas de manera estable

[00337] Este Ejemplo ilustra la actividad inhibidora de TIC9318 y TIC11302 contra el gusano de la raíz del maíz occidental (*Diabrotica virgifera*, WCR) en plantas de maíz transformadas de manera estable.

[00338] Las plantas de maíz se transformaron con construcciones de transformación vegetal binarias que comprenden un casete de expresión para la expresión de TIC9318 o TIC11302. Los vectores de transformación vegetal binarios comprendían casetes de transgén diseñados para expresar TIC9318 o TIC11302 y se clonaron usando métodos conocidos en la técnica. Los vectores de transformación vegetal comprendía un primer casete de transgén para la expresión de la proteína pesticida TIC9318, o TIC11302 que comprendía un promotor expresable vegetal, unido de manera operativa 5´ a un líder, unido de manera operativa 5´ a un intrón, unido de manera operativa 5´ a una secuencia de codificación sintética que codifica TIC9318, o TIC11302, unido de manera operativa 5´ a una 3´ UTR y, un segundo casete de transgén para la selección de células vegetales transformadas usando glifosato. Los vectores resultantes se utilizaron para transformar de manera estable plantas de maíz usando un método de transformación mediado por *Agrobacterium*. Las células transformadas se indujeron a formar plantas mediante métodos conocidos en la técnica.

[00339] Las plantas transformadas de manera estable R_0 se usaron para someter a ensayo TIC11302 para determinar la resistencia a WCR así como también para generar la progenie F_1. Se seleccionaron múltiples eventos de copia individuales de cada transformación de vector binario. Una parte de los eventos que surgen de cada transformación de vector binario se utilizó en el ensayo de WCR R_0.

[00340] Las plantas del ensayo R_0 se trasplantaron a macetas de ocho pulgadas [20,32 cm]. Las plantas se inocularon con aproximadamente dos mil huevos de WCR cada una. Los huevos se incubaron durante aproximadamente 10 (diez) días antes de la inoculación para permitir que se produzca la rotura del cascarón 4 (cuatro) días después de la inoculación para garantizar sobreviva una cantidad suficiente de larvas y pudieran atacar las raíces del maíz. Cada maceta se inoculó con aproximadamente dos mil huevos de WCR. Las plantas transformadas se inocularon en aproximadamente la etapa V2 a V3. Las plantas se cultivaron después de la infestación durante aproximadamente 28 (veintiocho) días. Las plantas se sacaron de las macetas y las raíces se lavan cuidadosamente para retirar toda la tierra. Se evaluó el daño en las raíces usando una escala de clasificación del daño de 1-5, tal como se presenta en la Tabla 19 del Ejemplo 17. También se realizó comparación con los controles

negativos para garantizar que el ensayo se haya realizado de manera adecuada. En el ensayo de WCR se usaron múltiples eventos R_0 para cada transformación de vector binario de TIC11302.

[00341] Una parte de los eventos transformados de manera estable R_0 que surgen de cada transformación de vector binario de TIC9318 y TIC11302 se usaron para producir la progenie F_1. Se permitió que las plantas transformadas de manera estable R_0 se autofertilicen, produciendo la progenie F_1. La semilla F_1 se plantó en macetas de ocho pulgadas [20,32 cm]. Las plantas heterocigotas se identificaron a través de métodos moleculares conocidos en la técnica y se usaron para ensayo contra WCR. La inoculación con los huevos de WCR fue tal como se describió para los eventos transformados de manera estable R_0 tal como se describió anteriormente. Se evaluó el daño en las raíces usando una escala de clasificación del daño de 0-3, tal como se presenta en la Tabla 20 del Ejemplo 7. Se realizó comparación con el control negativo para garantizar que el ensayo se haya realizado de manera adecuada. La clasificación de daño en las raíces promedio (RDR, por sus siglas en inglés) para cada construcción se presenta en la Tabla 21 a continuación, donde “NA” indica no analizado.

Tabla 21. Clasificación de daño en las raíces promedio (RDR) para plantas de maíz transformadas de manera estable con TIC9318 o TIC11302.

Construccción	**Proteína de fusión PirAB**	**Nucleótido SEQ ID NO:**	**Proteína SEQ ID NO:**	**RDR R_0**	**RDR de control neg. R_0**	**RDR F_1**	**RDR de control neg. F_1**
Construcción_1	TIC9318	53	24	NA	NA	1,4	2,8
Construcción_2	TIC9318	53	24	NA	NA	1,5	1,8
Construcción_3	TIC9318	53	24	NA	NA	1,2	1,8
Construcción_4	TIC11302	158	119	2,9	4,1	1,5	1,8

Construcción_5	TIC11302	158	119	2,8	4,1	1,4	1,8
Construcción_6	TIC11302	158	119	2,9	4,1	1,4	1,8

[00342] Como puede observarse en la Tabla 21 anterior, tanto TIC9318 como TIC11302 demostraron resistencia al gusano de la raíz del maíz occidental (*Diabrotica virgifera virgifera*) en comparación con los controles negativos.

[00343] Todas las composiciones descritas y reivindicadas en la presente pueden realizarse y llevar a la práctica sin experimentación indebida a partir de la presente descripción. Si bien las composiciones de la presente descripción se han descrito en términos de las modalidades ilustrativas precedentes, será evidente para los expertos en la técnica que se pueden aplicar variaciones, cambios, modificaciones, y alteraciones a la composición descrita en la presente sin apartarse del concepto verdadero, espíritu y alcance de la invención. Más específicamente, será evidente que los agentes descritos en la presente pueden sustituirse con determinados agentes descritos que se están relacionados en forma química y fisiológica, logrando los mismos resultados o resultados similares. Se considera que dichas modificaciones y sustitutos similares evidentes para los expertos en la técnica quedan comprendidos dentro del espíritu, alcance y concepto de la invención, tal como se define en las reivindicaciones adjuntas.

[00344] Todas las publicaciones y documentos de patentes publicados mencionados en la presente memoria descriptiva se incorporan a la presente mediante referencia en la misma medida que si cada publicación o solicitud de patente individual se indicará específica e individualmente como incorporada a la presente mediante referencia.

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ácido nucleico recombinante que comprende un promotor heterólogo unido de manera operativa a un segmento de polinucleótido que codifica una proteína pesticida o fragmento pesticida de esta, donde:

a. dicha proteína pesticida comprende la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO:2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 105, 107, 109, 111, 113, 115, 117, 119, 121, 123, 125, 127, 129, 131, 133, 135, 137, 139, 141, 143, 145, 147, 149, 151, 153, 155, o 157; o

b. dicha proteína pesticida comprende una secuencia de aminoácidos que tiene:

i. al menos 65 % de identidad con las SEQ ID NO:44, 46, 48, 123, 127, 129, 131, 133, y 145; o

ii. al menos 70 % de identidad con las SEQ ID NO:109, 121, y 125; o

iii. al menos 80 % de identidad con las SEQ ID NO: 12, 18, 24, 36, 42, 62, 68, 74, 80, 86, 98, 113, 117, 119, 147, 149, 153, 155, y 157; o

iv. al menos 82 % de identidad con las SEQ ID NOs:30, 92, 111, 115, y 151; o

v. al menos 86 % de identidad con las SEQ ID NO:6 y 50; o

vi. al menos 94 % de identidad con las SEQ ID NO:137, y 141; o

vii. al menos 97 % de identidad con las SEQ ID NO:4, 26, y 32; o

viii. al menos 98 % de identidad con las SEQ ID NO:2, 28, 34, 102, y 102; o

ix. al menos 99 % de identidad con las SEQ ID NO:135; o

x. 100 % de identidad con las SEQ ID NO:8, 10, 14, 16, 20, 22, 38, 40, 58, 60, 64, 66, 70, 72, 76, 78, 82, 84, 88, 90, 94, 96, 100, 105, 107, 139, y 143; o

c. dicho segmento de polinucleótido se hibrida en condiciones de hibridación rigurosas con un polinucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos de las SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 104, 106, 108, 110, 112, 114, 116, 118, 120, 122, 124, 126, 128, 130, 132, 134, 136, 138, 140, 142, 144, 146, 148, 150, 152, 154, 156, o 158.

2. La molécula de ácido nucleico recombinante de la reivindicación 1, donde:

a. La molécula de ácido nucleico recombinante comprende una secuencia que funciona para expresar la proteína pesticida en una planta; o

b. la molécula de ácido nucleico recombinante se expresa en una célula vegetal para producir una cantidad eficaz de manera pesticida de la proteína pesticida; o

c. la molécula de ácido nucleico recombinante se encuentra en unión operativa con un vector, y dicho vector se selecciona del grupo que consiste en un plásmido, fagémido, bácmido, cósmido, y un cromosoma artificial de levadura o bacteriano.

3. La molécula de ácido nucleico recombinante de la reivindicación 1, definida como presente dentro de una célula hospedadora, donde dicha célula hospedadora se selecciona del grupo que consiste en una célula bacteriana y una célula vegetal.

4. La molécula de ácido nucleico recombinante de la reivindicación 3, donde la célula hospedadora bacteriana es de un género de bacterias que se selecciona del grupo que consiste en: *Agrobacterium, Rhizobium*, *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Pantoea,* y *Erwinia.*

5. La molécula de ácido nucleico recombinante de la reivindicación 4, donde la especie *Bacillus* es *Bacillus cereus* o *Bacillus thuringiensis*, dicho *Brevibacillus* es *Brevibacillus laterosperus*, o dicho *Escherichia* es *Escherichia coli.*

6. La molécula de ácido nucleico recombinante de la reivindicación 3, donde dicha célula vegetal es una célula vegetal dicotiledónea o monocotiledónea.

7. La molécula de ácido nucleico recombinante de la reivindicación 6, donde dicha célula hospedadora vegetal se selecciona del grupo que consiste en célula vegetal de alfalfa, banana, cebada, judía, brócoli, repollo, Brassica, zanahoria, mandioca, ricino, coliflor, apio, garbanzo, col de China, planta cítrica, coco, café, maíz, trébol, algodón, cucurbitácea, pepino, abeto de Douglas, berenjena, eucaliptus, lino, ajo, uva, lúpulo, puerro, lechuga, pino bronco, mijo, melones, nuez, avena, oliva, cebolla, plantas ornamentales, palmera, pasto de pastura, guisante, cacahuate, pimiento, guandú, pino, patata, álamo, calabaza, pino insigne, rabanito, colza, arroz, rizomas, centeno, cártamo, arbusto, sorgo, pino sureño, soja, espinaca, zapallo, fresa, remolacha azucarera, caña de azúcar, girasol, maíz dulce, liquidámbar, boniato, pasto varilla, té, tabaco, tomate, triticale, césped, sandia y trigo.

8. La molécula de ácido nucleico recombinante de la reivindicación 1, donde dicha proteína pesticida exhibe actividad contra un insecto coleóptero.

9. La molécula de ácido nucleico recombinante de la reivindicación 8 donde dicho insecto es gusano de la raíz del maíz occidental, gusano de la raíz del maíz del sur, gusano de la raíz del maíz del norte, gusano de la raíz del maíz mexicano, gusano de la raíz del maíz brasileño, escarabajo de la patata, complejo del gusano de la raíz del maíz brasileño que consiste en *Diabrotica viridula* y *Diabrotica speciosa*, pulguilla de las crucíferas, pulguilla rayada, o pulguilla negra.

10. La molécula de ácido nucleico recombinante de la reivindicación 1, donde dicha proteína pesticida exhibe actividad contra una especie de insectos del orden de lepidópteros.

11. La molécula de ácido nucleico recombinante de la reivindicación 10, donde dicho insecto es gusano cortador negro, gusano del maíz, palomilla dorso de diamante, barrenador europeo del maíz, cogollero del maíz, oruga militar del sur, gusano falso medidor, barrenador del maíz del suroeste, oruga del tabaco, oruga de las leguminosas, barrenador de la caña de azúcar, barrenador menor del maíz, gusano soldado, gardama, oruga del Viejo Mundo, gusano del algodón, o gusano rosado.

12. La molécula de ácido nucleico recombinante de la reivindicación 1, donde dicha proteína pesticida exhibe actividad contra una especie de insectos en el orden de hemípteros.

13. La molécula de ácido nucleico recombinante de la reivindicación 12, donde dicho insecto es chinche verde, chinche marrón, chinche de la alfalfa, especie de chinche de abdomen verde, chinche de alas marrones, chinche marrón, chinche verde, chinche marrón marmoleada, chinche del triángulo, o chinche ligus.

14. Una planta o parte de esta que comprende la molécula de ácido nucleico recombinante de la reivindicación 1.

15. La planta o parte de esta de la reivindicación 14, donde dicha planta es una planta dicotiledónea o monocotiledónea.

16. La planta o parte de esta de la reivindicación 14, donde la planta se selecciona del grupo que consiste en una alfalfa, banana, cebada, judía, brócoli, repollo, Brassica, zanahoria, mandioca, ricino, coliflor, apio, garbanzo, col de China, planta cítrica, coco, café, maíz, trébol, algodón, una cucurbitácea, pepino, abeto de Douglas, berenjena, eucaliptus, lino, ajo, uva, lúpulo, puerro, lechuga, pino bronco, mijo, melones, nuez, avena, oliva, cebolla, plantas ornamentales, palmera, pasto de pastura, guisante, cacahuate, pimiento, guandú, pino, patata, álamo, calabaza, pino insigne, rabanito, colza, arroz, rizomas, centeno, cártamo,

arbusto, sorgo, pino sureño, soja, espinaca, zapallo, fresa, remolacha azucarera, caña de azúcar, girasol, maíz dulce, liquidámbar, boniato, pasto varilla, té, tabaco, tomate, triticale, césped, sandia y trigo.

17. Una semilla de la planta de la reivindicación 14, donde dicha semilla comprende dicha molécula ácido nucleico recombinante.

18. Una composición inhibidora de insectos que comprende la molécula ácido nucleico recombinante de la reivindicación 1.

19. La composición inhibidora de insectos de la reivindicación 18, que comprende además una secuencia de nucleótidos que codifica al menos un agente pesticida distinto que es diferente a dicha proteína pesticida.

20. La composición inhibidora de insectos de la reivindicación 19, donde dicho al menos un agente pesticida distinto se selecciona del grupo que consiste en una proteína inhibidora de insectos, una molécula de ARNcd inhibidora de insectos, y una proteína auxiliar.

21. La composición inhibidora de insectos de la reivindicación 19, donde dicho al menos un agente pesticida distinto exhibe actividad contra una o más de las especies de plagas de los órdenes de lepidópteros, coleópteros, o hemípteros.

22. La composición inhibidora de insectos de la reivindicación 21, donde dicho al menos un agente pesticida diferente es una proteína que se selecciona del grupo que consiste en Cry1A, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1A.105, Cry1Ae, Cry1B, Cry1C, variantes de Cry1C, Cry1D, Cry1E, Cry1F, quimeras de Cry1A/F, Cry1G, Cry1H, Cry1I, Cry1J, Cry1K, Cry1L, Cry2A, Cry2Ab, Cry2Ae, Cry3, variantes de Cry3A, Cry3B, Cry4B, Cry6, Cry7, Cry8, Cry9, Cry15, Cry34, Cry35, Cry43A, Cry43B, Cry51Aa1, ET29, ET33, ET34, ET35, ET66, ET70, TIC400, TIC407, TIC417, TIC431, TIC800, TIC807, TIC834, TIC853, TIC900, TIC901, TIC1201, TIC1415, TIC2160, TIC3131, TIC836, TIC860, TIC867, TIC869, TIC1100, VIP3A, VIP3B, VIP3Ab, AXMI-AXMI-, 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-207, 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-335,AXMI-R1 y variantes de estos, IP3 y variantes de estos, DIG-3, DIG-5, DIG-10, DIG-657 DIG-11, Cry71Aa1, Cry72Aa1, variantes de PHI-4, variantes de PIP-72, variantes de PIP-45, variantes de PIP-64, variantes de PIP-74, variantes de PIP-75, variantes de PIP-77, Axmi422, Dig-305,

Axmi440, variantes de PIP-47, Axmi281, BT-009, BT-0012, BT-0013, BT-0023, BT0067, BT-0044, BT-0051, BT-0068, BT-0128, DIG-17, DIG-90, DIG-79, Cry1JP578V, Cry1JPS1, y Cry1 JPS1P578V.

23. La composición inhibidora de insectos de la reivindicación 18, definida además como que comprende una célula vegetal que expresa dicha molécula de ácido nucleico recombinante.

24. Un producto básico producido a partir de la planta o parte de esta de la reivindicación 14, donde el producto básico comprende una cantidad detectable de dicha molécula de ácido nucleico recombinante o una proteína pesticida codificada por esta.

25. El producto básico de la reivindicación 24, que se selecciona del grupo que consiste en maíz básico embolsado por un gestor de granos, copos de maíz, tortas de maíz, maicena, harina de maíz, jarabe de maíz, aceite de maíz, ensilado de maíz, almidón de maíz, cereal de maíz, y similares, semilla de algodón entera o procesada, aceite de algodón, hebra, semillas y partes de plantas procesadas para pienso o alimento, fibra, papel, biomasas, y productos de combustible tal como combustible derivado de aceite de algodón o sedimentos derivados de desechos de la desmotadora de algodón, semilla de soja entera o procesada, aceite de soja, proteína de soja, harina de soja, copos de soja, salvado de soja, leche de soja, queso de soja, vino de soja, pienso de animales que comprende soja, papel que comprende soja, crema que comprende soja, biomasa de soja, y productos de combustible producidos usando plantas de soja y partes de plantas de soja.

26. Un método para producir una semilla que comprende:

a. plantar al menos una primera semilla de acuerdo con la reivindicación 17.

b. cultivar una planta a partir de la semilla; y

c. cosechar semilla de la planta, donde dicha semilla cosechada comprende una molécula de ácido nucleico recombinante.

27. Una planta resistente a infestación de insectos, donde las células de dicha planta comprenden la molécula de ácido nucleico recombinante de la reivindicación 1.

28. Un método para controlar una especies de plaga o infestación de plaga de coleópteros, lepidópteros, o hemípteros, donde dicho método comprende:

a. poner en contacto la plaga con una cantidad eficaz de manera insecticida de una proteína pesticida tal como se establece en las SEQ ID NO:2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20,

22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 105, 107, 109, 111, 113, 115, 117, 119, 121, 123, 125, 127, 129, 131, 133, 135, 137, 139, 141, 143, 145, 147, 149, 151, 153, 155, o 157; o

b. poner en contacto la plaga con una cantidad eficaz de manera insecticida de una o más proteínas pesticidas que comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene:

i. al menos 65 % de identidad con las SEQ ID NO:44, 46, 48, 123, 127, 129, 131, 133, y 145; o

ii. al menos 70% de identidad con las SEQ ID NO:109, 121, y 125; o

iii. al menos 80 % de identidad con las SEQ ID NO: 12, 18, 24, 36, 42, 62, 68, 74, 80, 86, 98, 113, 117, 119, 147, 149, 153, 155, y 157; o

iv. al menos 82% de identidad con las SEQ ID NO:30, 92, 111, 115, y 151; o

v. al menos 86% de identidad con las SEQ ID NO:6 y 50; o

vi. al menos 94 % de identidad con las SEQ ID NO:137, y 141; o

vii. al menos 97% de identidad con las SEQ ID NO:4, 26, y 32; o

viii. al menos 98 % de identidad con las SEQ ID NO:2, 28, 34, 102, y 102; o

ix. al menos 99% de identidad con las SEQ ID NO:135; o

x. 100 % de identidad con las SEQ ID NO:8, 10, 14, 16, 20, 22, 38, 40, 58, 60, 64, 66, 70, 72, 76, 78, 82, 84, 88, 90, 94, 96, 100, 105, 107, 139, y 143.

29. Un método para detectar la presencia de la molécula de ácido nucleico recombinante de la reivindicación 1 en una muestra que comprende ADN genómico vegetal que comprende:

a. poner en contacto una muestra con una sonda de ácido nucleico que se hibrida en condiciones de hibridación rigurosas con ADN genómico de una planta que comprende la molécula de ADN de la reivindicación 1, y no se hibrida en dichas condiciones de hibridación con ADN genómico de una planta de otro modo isogénica que no comprende la molécula de ácido nucleico recombinante de la reivindicación 1, donde la sonda es homóloga o complementaria con las SEQ ID NO: 49, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 146, 148, 150, 152, 154, 156, o 158, o una secuencia que codifica una proteína pesticida que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene:

i. al menos 65 % de identidad con las SEQ ID NO:44, 46, 48, 123, 127, 129, 131, 133, y 145; o

ii. al menos 70% de identidad con las SEQ ID NO:109, 121, y 125; o

iii. al menos 80 % de identidad con las SEQ ID NO: 12, 18, 24, 36, 42, 62, 68, 74, 80, 86, 98, 113, 117, 119, 147, 149, 153, 155, y 157; o

iv. al menos 82% de identidad con las SEQ ID NO:30, 92, 111, 115, y 151; o

v. al menos 86% de identidad con las SEQ ID NO:6 y 50; o

vi. al menos 94 % de identidad con las SEQ ID NO:137, y 141; o

vii. al menos 97% de identidad con las SEQ ID NO:4, 26, y 32; o

viii. al menos 98 % de identidad con las SEQ ID NO:2, 28, 34, 102, y 102; o

ix. al menos 99% de identidad con las SEQ ID NO:135; o

x. 100 % de identidad con las SEQ ID NO:8, 10, 14, 16, 20, 22, 38, 40, 58, 60, 64, 66, 70, 72, 76, 78, 82, 84, 88, 90, 94, 96, 100, 105, 107, 139, y 143;

b. someter la muestra y sonda a condiciones de hibridación rigurosas; y

c. detectar la hibridación de la sonda con el ADN de la muestra.

30. Un método para detectar la presencia de una proteína pesticida o fragmento de esta en una muestra que comprende la proteína, donde dicha proteína pesticida comprende la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO:2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 105, 107, 109, 111, 113, 115, 117, 119, 121, 123, 125, 127, 129, 131, 133, 135, 137, 139, 141, 143, 145, 147, 149, 151, 153, 155, o 157; o dicha proteína pesticida comprende una secuencia de aminoácidos que tiene:

i. al menos 65 % de identidad con las SEQ ID NO:44, 46, 48, 123, 127, 129, 131, 133, y 145; o

ii. al menos 70% de identidad con las SEQ ID NO:109, 121, y 125; o

iii. al menos 80 % de identidad con las SEQ ID NO: 12, 18, 24, 36, 42, 62, 68, 74, 80, 86, 98, 113, 117, 119, 147, 149, 153, 155, y 157; o

iv. al menos 82% de identidad con las SEQ ID NO:30, 92, 111, 115, y 151; o

v. al menos 86% de identidad con las SEQ ID NO:6 y 50; o

vi. al menos 94 % de identidad con las SEQ ID NO:137, y 141; o

vii. al menos 97% de identidad con las SEQ ID NO:4, 26, y 32; o

viii. al menos 98 % de identidad con las SEQ ID NO:2, 28, 34, 102, y 102; o

ix. al menos 99% de identidad con las SEQ ID NO:135; o

x. 100 % de identidad con las SEQ ID NO:8, 10, 14, 16, 20, 22, 38, 40, 58, 60, 64, 66, 70, 72, 76, 78, 82, 84, 88, 90, 94, 96, 100, 105, 107, 139, y 143;

donde dicho método comprende:

xi. poner en contacto la muestra con un anticuerpo inmunorreactivo; y

xii. detectar unión del anticuerpo a la proteína pesticida o fragmento de esta, donde la unión indica la presencia de la proteína.

31. El método de reivindicación 30, donde la etapa de detección comprende ELISA o un análisis de transferencia Western.

RESUMEN

Se describe una clase de proteínas pesticidas de PirA, PirB, y proteínas de fusión PirAB que exhiben actividad tóxica contras las especies de plagas de coleópteros, lepidópteros, y hemípteros. Se proporcionan construcciones de ADN que contienen una secuencia de ácido nucleico recombinante que codifica las proteínas PirA, PirB, y proteínas de fusión PirAB. Se proporcionan plantas transgénicas, células vegetales, semilla, y partes de plantas resistentes a la infestación de coleópteros, lepidópteros, y hemípteros que contienen secuencias de ácido nucleico recombinante que codifican las proteínas PirA, PirB, y proteínas de fusión PirAB. También se proporcionan métodos para detectar la presencia de secuencias de ácido nucleico recombinante o las proteínas de la presente invención en una muestra biológica, y métodos para controlar las plagas de especies de coleópteros, lepidópteros, y hemípteros usando las proteínas PirA, PirB, y proteínas de fusión PirAB.