

PROTEÍNAS INHIBIDORAS DE INSECTOS NOVEDOSAS**REFERENCIA A SOLICITUD RELACIONADA**

La presente solicitud reivindica el beneficio de las
5 solicitud provisional estadounidense n.º 62/406,082,
presentada el lunes, 10 de octubre de 2016, que se
incorpora a la presente mediante esta referencia en su
totalidad.

INCORPORACIÓN DEL LISTADO DE SECUENCIAS

El archivo de nombre "38-21_62166US0001SEQLISTING_ST25.txt"
que contiene un formulario legible por computadora del
listado de secuencias fue creado el 12 de septiembre de
2017. Este archivo es de 77,039 bytes (según lo medido en
15 MS-Windows®), se presenta a la vez mediante presentación
electrónica (utilizando el sistema de presentación EFS-Web
de la Oficina de Patentes de los Estados Unidos) y se
incorpora a la presente mediante referencia en su
totalidad.

20

CAMPO DE LA INVENCION

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
25 inhibidora de insectos contra plagas relevantes en la
agricultura de plantas de cultivo y semillas. En

particular, la clase de proteínas que se describe es activa como insecticida contra plagas relevantes desde el punto de vista agrícola de plantas de cultivo y semillas, particularmente especies lepidópteras de plagas de insectos. Se proporcionan plantas, partes de plantas y semillas que contienen una construcción de polinucleótidos recombinantes que codifica una o más de las toxinas proteicas descritas.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Mejorar el rendimiento de cultivo de plantas significativas desde el punto de vista agrícola, las cuales incluyen, entre otras, maíz, soja, caña de azúcar, arroz, trigo, verduras y algodón, se ha vuelto cada vez más importante. Además de la necesidad de cultivar productos agrícolas para alimentar, vestir y proporcionar energía a una población humana creciente, se predice que los efectos relacionados con el clima y la presión de la población creciente para usar la tierra para fines diferentes de las prácticas agrícolas reducirán la cantidad de tierra disponible para el cultivo. Estos factores han llevado a pronósticos negativos con respecto a la seguridad del alimento, particularmente en ausencia de mejoras importantes en la biotecnología vegetal y las prácticas agronómicas. A la vista de estas presiones, las mejoras sostenibles desde el punto de vista ambiental en tecnología, técnicas agrícolas

y el manejo de plagas son herramientas vitales para expandir la producción de cultivos en la cantidad limitada de tierra arable disponible para el cultivo.

Los insectos, particularmente los insectos del orden de
5 lepidópteros y coleópteros, se consideran una causa principal de daño a los campos de cultivo, lo cual reduce el rendimiento de cultivo en las áreas infestadas. Las especies de plagas de lepidópteros que afectan negativamente la agricultura incluyen, de modo no taxativo,
10 el gusano soldado (*Spodoptera exigua*), gusano elotero (*Helicoverpa zea*), gusano medidor de la hoja del algodnero (*Alabama argillacea*), taladro del maíz (*Ostrinia nubilalis*), cogollero del maíz (*Spodoptera frugiperda*), oruga del viejo mundo (*Helicoverpa armigera*), gusano
15 defoliador (*Spodoptera litura*), gusano rosado (*Pectinophora gossypiella*), gusano rosado resistente a Cry1Ac (*Pectinophora gossypiella*), lagarta verde (*Chrysodeixis includens*), gusano meridional (*Spodoptera eridania*), barrenador del maíz del suroeste (*Diatraea grandiosella*),
20 gusano moteado (*Earias vittella*), barrenador de la caña de azúcar (*Diatraea saccharalis*), oruga del tabaco (*Heliothis virescens*) y oruga del frijol terciopelo (*Anticarsia gemmatalis*).

Históricamente, la aplicación intensiva de insecticidas
25 químicos sintéticos era considerada como un agente de control de plagas en la agricultura. Las preocupaciones por

el medioambiente y la salud humana, además de los problemas emergentes de resistencia, estimularon la investigación y desarrollo de pesticidas biológicos. Este esfuerzo de investigación llevó al descubrimiento y uso progresivo de
5 varias especies microbianas entomopatógenas, inclusive bacterias.

El paradigma de control biológico cambió cuando se descubrió el potencial de bacterias entomopatógenas, especialmente las bacterias que pertenecen al género
10 *Bacillus*, y se desarrolló como un agente de control de plagas biológicas. Se han usado cepas de la bacteria *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) como fuente de proteínas pesticidas, dado que se descubrió que las cepas de *Bt* presentan una toxicidad elevada contra insectos
15 específicos. Se conoce que las cepas de *Bt* producen delta-endotoxinas que están localizadas dentro de cuerpos de inclusión cristalinos paraesporales al comienzo de la esporulación y durante la fase de crecimiento estacionario (por ejemplo, proteínas Cry), y también se conoce que
20 producen proteínas insecticidas secretadas. Cuando son ingeridas por un insecto susceptible, las delta-endotoxinas, así como las toxinas secretadas, ejercen sus efectos en la superficie del epitelio del intestino medio y rompen la membrana celular, lo cual lleva a la ruptura y
25 muerte de la célula. Los genes que codifican proteínas insecticidas también se han identificado en especies

bacterianas que no son *Bt*, inclusive otros *Bacillus* y una diversidad de especies bacterianas adicionales, tales como *Brevibacillus laterosporus*, *Lysinibacillus sphaericus* ("Ls", conocido anteriormente como *Bacillus sphaericus*) y *Paenibacillus popilliae*.

Las toxinas insecticidas solubles secretadas y cristalinas son altamente específicas para sus hospedadores y han obtenido una aceptación mundial como alternativas a los insecticidas químicos. Por ejemplo, las toxinas proteicas insecticidas se han empleado en varias aplicaciones agrícolas para proteger plantas importantes desde el punto de vista agrícola de infestaciones de insectos, disminuir la necesidad de aplicaciones de pesticidas químicos y aumentar los rendimientos. Las toxinas proteicas insecticidas se usan para controlar plagas relevantes desde el punto de vista agrícola mediante métodos mecánicos, tal como aspersión para dispersar formulaciones microbianas que contienen varias cepas bacterianas en la superficie de las plantas, y mediante el uso de técnicas de transformación genética para producir plantas y semillas transgénicas que expresan toxinas proteicas insecticidas.

El uso de plantas transgénicas que expresan toxinas proteicas insecticidas se ha adoptado a nivel mundial. Por ejemplo, en 2012, 26.1 millones de hectáreas se plantaron con cultivos transgénicos que expresan toxinas *Bt* (James, C., Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2012.

Informe ISAAA N.º 44). El uso mundial de cultivos transgénicos protegidos contra insectos y la cantidad limitada de toxinas proteicas insecticidas usadas en esos cultivos ha creado una presión para seleccionar alelos de insectos existentes que impartan resistencia a las proteínas insecticidas utilizadas actualmente.

El desarrollo de resistencia en las plagas diana a las toxinas proteicas insecticidas crea una necesidad continua para descubrir y desarrollar nuevas formas de toxinas proteicas insecticidas que sean útiles en el manejo del aumento de la resistencia de los insectos a cultivos transgénicos que expresan toxinas proteicas insecticidas. Nuevas toxinas proteicas con mejor eficacia y que exhiben control sobre un espectro más amplio de especies de insectos susceptibles reducirán la cantidad de insectos supervivientes que pueden desarrollar alelos de resistencia. Además, el uso en una planta de dos o más toxinas proteicas insecticidas transgénicas tóxicas para la misma plaga de insectos y que presente modos diferentes de acción reduce la probabilidad de resistencia en cualquier especie de insecto diana individual.

Por lo tanto, los inventores describen en la presente una familia de toxinas proteicas novedosa de *Bacillus thuringiensis*, junto con toxinas proteicas similares, proteínas variantes y ejemplos de proteínas recombinantes que presentan actividad insecticida contra especies de

lepidópteros diana, particularmente contra el gusano soldado (*Spodoptera exigua*), gusano elotero (*Helicoverpa zea*), gusano medidor de la hoja del algodónero (*Alabama argillacea*), taladro del maíz (*Ostrinia nubilalis*),
 5 cogollero del maíz (*Spodoptera frugiperda*), oruga del viejo mundo (*Helicoverpa armigera*), gusano defoliador (*Spodoptera litura*), gusano rosado (*Pectinophora gossypiella*), gusano rosado resistente a Cry1Ac (*Pectinophora gossypiella*), lagarta verde (*Chrysodeixis includens*), gusano meridional
 10 (*Spodoptera eridania*), barrenador del maíz del suroeste (*Diatraea grandiosella*), gusano moteado (*Earias vittella*), barrenador de la caña de azúcar (*Diatraea saccharalis*), oruga del tabaco (*Heliothis virescens*) y oruga del frijol terciopelo (*Anticarsia gemmatalis*).

15

COMPENDIO DE LA INVENCION

En la presente se describe un grupo novedoso de proteínas pesticidas con actividad inhibidora de insectos (toxinas proteicas), denominadas en la presente TIC4472, TIC1425 y
 20 TIC2613 que pertenecen a la clase de toxinas proteicas TIC4472, que se demostró que exhiben actividad inhibidora contra una o más plagas de plantas de cultivo. La proteína TIC4472 y las proteínas en la clase de toxinas proteicas TIC4472 se pueden usar solas o junto con otras proteínas
 25 insecticidas y agentes tóxicos en formulaciones e *in planta*, lo que proporciona alternativas a las proteínas

insecticidas y químicos insecticidas que actualmente se usan en los sistemas agrícolas.

En una modalidad, en la presente solicitud se describe una molécula de ácido nucleico recombinante que comprende un
5 fragmento promotor heterólogo unido operativamente a un segmento de polinucleótido que codifica una proteína pesticida o un fragmento de esta, en donde (a) dicha proteína pesticida comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:6; o (b) dicha
10 proteína pesticida comprende una secuencia de aminoácidos que tiene: (i) al menos 93%, o 95%, o 98%, o 99%, o alrededor de 100 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:6; o (ii) al menos 73%, o 75%, o 80%, o 85%, o 90%, o 95%, o alrededor
15 de 100% de identidad de secuencia de aminoácidos con la SEQ ID NO:8 o SEQ ID NO:10; o (c) dicho segmento de polinucleótido se hibrida con un polinucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, o SEQ ID NO:9; o (d) dicho
20 segmento de polinucleótido que codifica una proteína pesticida o un fragmento de esta comprende una secuencia de polinucleótido que tiene al menos 65%, o 70%, o 75%, o 80%, o 85%, o 90%, o 95%, o 98%, o 99%, o alrededor de 100% de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos de
25 la SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, o SEQ ID NO:9; o (e) dicha molécula de ácido nucleico

recombinante se une de manera operativa a 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. 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 como pesticida de la proteína pesticida.

En otra modalidad de la presente solicitud hay células

hospedadoras que comprenden una molécula de ácido nucleico recombinante de la solicitud, en donde la célula hospedadora se selecciona del grupo que consiste en una célula bacteriana y una célula vegetal. Las células hospedadoras bacterianas contempladas incluyen

Agrobacterium, *Rhizobium*, *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Pantoec* y *Erwinia*. En determinadas modalidades, dicha especie *Bacillus* es *Bacillus cereus* o *Bacillus thuringiensis*, dicha *Brevibacillus* es *Brevibacillus laterosperous*, o *Escherichia*

es *Escherichia coli*. Las células hospedadoras vegetales contempladas incluyen una célula vegetal dicotiledónea y una célula vegetal monocotiledónea. Las células vegetales contempladas incluyen además una célula vegetal de alfalfa, banana, cebada, poroto, brócoli, repollo, brassica, zanahoria, mandioca, ricino, coliflor, apio, garbanzo, repollo chino, cítricos, coco, café, maíz, trébol, algodón

(*Gossypium* sp.), una cucurbitácea, pepino, abeto de Douglas, berenjena, eucaliptus, lino, ajo, uva, lúpulo, puerro, lechuga, pino taeda, mijo, melón, nuez, avena, aceituna, cebolla, plantas ornamentales, palmera, pasto
 5 forrajero, arveja, maní, morrón, gandul, pino, papa, álamo, calabaza, pino insigne, rábano, colza, arroz, rizomas, centeno, cártamo, arbusto, sorgo, pino del sur, soja, espinaca, calabacín, frutilla, remolacha azucarera, caña de azúcar, girasol, maíz dulce, liquidámbar, boniato, pasto
 10 varilla, té, tabaco, tomate, triticale, césped, sandía y trigo.

En otra modalidad, la proteína pesticida presenta actividad contra insectos lepidópteros, incluidos el gusano soldado (*Spodoptera exigua*), gusano elotero (*Helicoverpa zea*),
 15 gusano medidor de la hoja del algodonerero (*Alabama argillacea*), taladro del maíz (*Ostrinia nubilalis*), cogollero del maíz (*Spodoptera frugiperda*), oruga del viejo mundo (*Helicoverpa armigera*), gusano defoliador (*Spodoptera litura*), gusano rosado (*Pectinophora gossypiella*), gusano
 20 rosado resistente a Cry1Ac (*Pectinophora gossypiella*), lagarta verde (*Chrysodeixis includens*), gusano meridional (*Spodoptera eridania*), barrenador del maíz del suroeste (*Diatraea grandiosella*), gusano moteado (*Earias vittella*), barrenador de la caña de azúcar (*Diatraea saccharalis*),
 25 oruga del tabaco (*Heliothis virescens*) y oruga del frijol terciopelo (*Anticarsia gemmatalis*).

También se contemplan en la presente solicitud plantas que comprenden una molécula de ácido nucleico recombinante que comprende un fragmento promotor heterólogo unido de manera operativa a un segmento de polinucleótido que codifica una

5 proteína pesticida o un fragmento de esta, en donde: (a) dicha proteína pesticida comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:6; o

(b) dicha proteína pesticida comprende una secuencia de aminoácidos que tiene: (i) al menos 93%, o 95%, o 98%, o

10 99%, o alrededor de 100 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:6; o (ii) al menos 73%, o 75%, o 80%, o 85%, o 90%, o 95%, o alrededor de 100% de identidad de secuencia de aminoácidos con la SEQ ID NO:8 o SEQ ID NO:10; o (c) dicho segmento de

15 polinucleótido se hibrida en condiciones de hibridación rigurosas con el complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:9; o (d) dicha planta presenta una cantidad detectable de dicha proteína pesticida. En determinadas modalidades, la proteína

20 pesticida comprende SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8 o SEQ ID NO:10. En una modalidad, la planta es una planta dicotiledónea o una planta monocotiledónea. En otra modalidad, la planta se selecciona además del grupo que consiste en alfalfa, banana, cebada, poroto, brócoli,

25 repollo, brassica, zanahoria, mandioca, ricino, coliflor, apio, garbanzo, repollo chino, cítricos, coco, café, maíz,

trébol, algodón, una cucurbitácea, pepino, abeto de Douglas, berenjena, eucaliptus, lino, ajo, uva, lúpulo, puerro, lechuga, pino taeda, mijo, melón, nuez, avena, aceituna, cebolla, plantas ornamentales, palmera, pasto
5 forrajero, arveja, maní, morrón, gandul, pino, papa, álamo, calabaza, pino insigne, rábano, colza, arroz, rizomas, centeno, cártamo, arbusto, sorgo, pino del sur, soja, espinaca, calabacín, frutilla, remolacha azucarera, caña de azúcar, girasol, maíz dulce, liquidámbar, boniato, pasto
10 varilla, té, tabaco, tomate, triticale, césped, sandía y trigo.

En modalidades adicionales, se describen las semillas que comprenden las moléculas de ácido nucleico recombinantes.

En otra modalidad, se contempla una composición inhibidora
15 de insecto que comprende las moléculas de ácido nucleico recombinantes descritas en la presente solicitud. La composición inhibidora de insectos puede comprender además una secuencia de nucleótidos que codifica al menos otro agente pesticida distinto de dicha proteína pesticida. En
20 determinadas modalidades, 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. También se contempla que al menos otro agente pesticida en la composición inhibidora
25 de insectos presente actividad contra una o más especies de plagas de los órdenes de lepidópteros, coleópteros o

hemípteros. Al menos otro agente pesticida en la composición inhibidora de insectos, en una modalidad, se selecciona del grupo que consiste en una 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 y una proteína DIG-11.

También se contemplan productos básicos que comprenden una cantidad detectable de las moléculas de ácido nucleico recombinantes descritas en la presente solicitud. Dichos productos básicos incluyen maíz envasado por una empresa de comercialización de granos, copos de maíz, tortas de maíz, harina de maíz, maíz triturado, jarabe de maíz, aceite de maíz, forraje de maíz, almidón de maíz, cereal de maíz, y

similares, y productos básicos de soja, arroz, trigo, sorgo, gandul, maní, fruta, melón y vegetales correspondientes que incluyen, cuando corresponda, jugos, concentrados, conservas, jaleas, mermeladas, y otras formas
5 comestibles de dichos productos básicos que contienen una cantidad detectable de dichos polinucleótidos y/o polipéptidos de la presente solicitud, semilla de algodón entera o procesada, aceite de algodón, hila, semillas y partes de planta procesadas para alimento, fibra, papel,
10 biomasa, y productos de combustible como combustible derivado de aceite o sedimentos de algodón derivados de desecho de fibras de algodón, semilla de soja entera o procesada, aceite de soja, proteína de soja, soja triturada, harina de soja, copos de soja, salvado de soja,
15 leche de soja, queso de soja, vino de soja, alimento para animales que comprende soja, papel que comprende soja, crema que comprende soja, biomasa de soja, y productos de combustible producidos con plantas de soja y partes de planta de soja.

20 También se contemplan en la presente solicitud métodos para producir una semilla que comprende las moléculas de ácido nucleico recombinantes descritas en la presente solicitud. El método comprende plantar al menos una de la semilla que comprende las moléculas de ácido nucleico recombinantes
25 descritas en la presente solicitud; cultivar una planta a partir de la semilla; y cosechar una semilla a partir de

las plantas, en donde la semilla cosechada comprende las moléculas de ácido nucleico recombinantes en la presente solicitud.

En otra modalidad ilustrativa, se proporciona una planta
5 resistente a infestación de insectos, en donde las células de dicha planta comprenden: (a) una molécula de ácido nucleico recombinante que codifica una cantidad eficaz como insecticida de una proteína pesticida que se establece en la SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:6; o (b) una
10 cantidad eficaz como insecticida de una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene: (i) al menos 93%, o 95% o alrededor de 100 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:6; o (ii) al menos 73%, o 75%, o 80%, o 85%, o
15 90%, o 95%, o alrededor de 100% de identidad de secuencia de aminoácidos con la SEQ ID NO:8 o SEQ ID NO:10.

También se describen en la presente solicitud los métodos para controlar una plaga de especie de lepidópteros, y controlar una infestación de plaga de especie de
20 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 como insecticida de una proteína pesticida que se establece en la SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:6; o (b) poner en
25 contacto la plaga con una cantidad eficaz como insecticida de una o más proteínas pesticidas que comprenden una

secuencia de aminoácidos que tiene: (i) al menos 93%, o 95% o alrededor de 100 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:6; o (ii) al menos 73%, o 75%, o 80%, o 85%, o 90%, o 95%, o
5 alrededor de 100% de identidad de secuencia de aminoácidos con la SEQ ID NO:8 o SEQ ID NO:10.

Además se proporciona en la presente un método para detectar la presencia de una molécula de ácido nucleico recombinante que comprende un segmento de polinucleótido

10 que codifica una proteína pesticida o un fragmento de esta, en donde: (a) dicha proteína pesticida comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:6; o (b) dicha proteína pesticida comprende una secuencia de aminoácidos que tiene: (i) al menos 93%, o
15 95%, o 98%, o 99% o alrededor de 100 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:6; o (ii) al menos 73%, o 75%, o 80%, o 85%, o 90%, o 95%, o alrededor de 100% de identidad de secuencia de aminoácidos con la SEQ ID NO:8 o SEQ ID NO:10; o (c)
20 dicho segmento de polinucleótido se hibrida con un polinucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, o SEQ ID NO:10. En una modalidad de la invención, el método comprende poner en contacto una muestra de ácidos nucleicos
25 con una sonda de ácido nucleico que se hibrida en condiciones de hibridación rigurosas con el ADN genómico de

una planta que comprende un segmento de polinucleótido que codifica una proteína pesticida o un fragmento de esta proporcionada en la presente, y no se hibrida en dichas condiciones de hibridación con el ADN genómico de una
5 planta isogénica de otro modo que no comprende el segmento, en donde la sonda es homóloga o complementaria a la SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:9, o una secuencia que codifica una proteína pesticida que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene: (a) al menos 93%, o 95%, o 98%, o
10 99%, o alrededor de 100 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:6; o (b) al menos 73%, o 75%, o 80%, o 85%, o 90%, o 95%, o alrededor de 100% de identidad de secuencia de aminoácidos con la SEQ ID NO:8 o SEQ ID NO:10. El método además puede
15 comprender (a) someter la muestra y la sonda a condiciones de hibridación rigurosas; y (b) detectar la hibridación de la sonda con el ADN de la muestra.

La invención también proporciona métodos para detectar la presencia de una proteína pesticida o un fragmento de esta
20 en una muestra que comprende una proteína, en donde dicha proteína pesticida comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8 o SEQ ID NO:10; o dicha proteína pesticida comprende una secuencia de aminoácidos que tiene: (a) al menos 93%, o
25 95%, o 98%, o 99%, o alrededor de 100 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:2 o

SEQ ID NO:6; o (b) al menos 73%, o 75%, o 80%, o 85%, o 90%, o 95%, o alrededor de 100% de identidad de secuencia de aminoácidos con la SEQ ID NO:8 o SEQ ID NO:10. En una modalidad, el método comprende: (a) poner en contacto una muestra con un anticuerpo inmunorreactivo; y (b) detectar la presencia de la proteína. En algunas modalidades, la etapa de la detección comprende un ELISA, o un ensayo de transferencia Western.

10

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS SECUENCIAS

SEQ ID NO:1 es una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína pesticida TIC4472 obtenida de la especie de *Bacillus thuringiensis* EG10742.

15

SEQ ID NO:2 es la secuencia de aminoácidos de la proteína pesticida TIC4472.

20

SEQ ID NO:3 es una secuencia de codificación sintética que codifica una proteína pesticida TIC4472PL diseñada para la expresión en una célula vegetal donde un codón de alanina adicional se inserta inmediatamente después del codón de metionina de inicio.

25

SEQ ID NO:4 es la secuencia de aminoácidos de TIC4472PL codificada por una secuencia codificante sintética diseñada para la expresión en una célula vegetal (SEQ ID NO:3), y en donde un aminoácido de alanina adicional se inserta inmediatamente después de la metionina de inicio.

SEQ ID NO:5 es una secuencia de ácido nucleico que codifica

una proteína pesticida TIC1425 obtenida de la especie de *Bacillus thuringiensis* EG10731.

SEQ ID NO:6 es la secuencia de aminoácidos de la proteína pesticida TIC1425.

- 5 SEQ ID NO:7 es una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína pesticida TIC2613 obtenida de la especie de *Bacillus thuringiensis* EG5408.

SEQ ID NO:8 es la secuencia de aminoácidos de la proteína pesticida TIC2613.

- 10 SEQ ID NO:9 es una secuencia de codificación sintética que codifica una proteína pesticida TIC2613PL diseñada para la expresión en una célula vegetal donde un codón de alanina adicional se inserta inmediatamente después del codón de metionina de inicio.

- 15 SEQ ID NO:10 es la secuencia de aminoácidos de TIC2613PL codificada por una secuencia codificante sintética diseñada para la expresión en una célula vegetal (SEQ ID NO:9), y en donde un aminoácido de alanina adicional se inserta inmediatamente después de la metionina de inicio.

20

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

El problema en la técnica del control de plagas agrícolas puede caracterizarse como una necesidad de nuevas toxinas proteicas que sean eficaces contra plagas diana, que

- 25 presenten un amplio espectro de toxicidad contra especies de plagas diana, que sean capaces de expresarse en plantas

sin provocar problemas agronómicos indeseables y proporcionen un modo alternativo de acción en comparación con las toxinas actuales que se utilizan en las plantas a nivel comercial.

5 Las proteínas pesticidas novedosas ejemplificadas por TIC4472, TIC4472PL, TIC1425, TIC2613 y TIC2613PL se describen en la presente, y abordan cada una de estas necesidades, particularmente contra un amplio espectro de plagas de insectos lepidópteros, y más particularmente
 10 contra el gusano soldado (*Spodoptera exigua*), gusano elotero (*Helicoverpa zea*), gusano medidor de la hoja del algodónero (*Alabama argillacea*), taladro del maíz (*Ostrinia nubilalis*), cogollero del maíz (*Spodoptera frugiperda*), oruga del viejo mundo (*Helicoverpa armigera*), gusano
 15 defoliador (*Spodoptera litura*), gusano rosado (*Pectinophora gossypiella*), gusano rosado resistente a Cry1Ac (*Pectinophora gossypiella*), lagarta verde (*Chrysodeixis includens*), gusano meridional (*Spodoptera eridania*), barrenador del maíz del suroeste (*Diatraea grandiosella*),
 20 gusano moteado (*Earias vittella*), barrenador de la caña de azúcar (*Diatraea saccharalis*), oruga del tabaco (*Heliothis virescens*) y oruga del frijol terciopelo (*Anticarsia gemmatalis*).

La referencia en la presente solicitud a TIC4472, "proteína
 25 TIC4472", "toxina proteica TIC4472", "proteína de toxina TIC4472", "proteína pesticida TIC4472", "toxinas

relacionadas con TIC4472", "proteínas de toxinas
relacionadas con TIC4472", TIC4472PL, "proteína TIC4472PL",
"toxina proteica TIC4472PL", "proteína de toxina
TIC4472PL", "proteína pesticida TIC4472PL", "toxinas
5 relacionadas con TIC4472PL", "proteínas de toxinas
relacionadas con TIC4472PL", TIC1425, "proteína TIC1425",
"toxina proteica TIC1425", "proteína de toxina TIC1425",
"proteína pesticida TIC1425", "toxinas relacionadas con
TIC1425", "proteínas de toxinas relacionadas con TIC1425",
10 TIC2613, "proteína TIC2613", "toxina proteica TIC2613",
"proteína de toxina TIC2613", "proteína pesticida TIC2613",
"toxinas relacionadas con TIC2613", "proteínas de toxinas
relacionadas con TIC2613", TIC2613PL, "proteína TIC2613PL",
"toxina proteica TIC2613PL", "proteína de toxina
15 TIC2613PL", "proteína pesticida TIC2613PL", "toxinas
relacionadas con TIC2613PL", "proteínas de toxinas
relacionadas con TIC2613PL" y similares, se refiere a
cualquier proteína pesticida novedosa o proteína inhibidora
de insectos que comprende, que consiste en, que es
20 sustancialmente homóloga a, que es similar a, o que se
deriva de cualquier secuencia de proteína pesticida o
proteína inhibidora de insectos de TIC4472 (SEQ ID NO:2),
TIC4472PL (SEQ ID NO:4), TIC1425 (SEQ ID NO:6), TIC2613
(SEQ ID NO:8) o TIC2613PL (SEQ ID NO:10) y segmentos
25 pesticidas o inhibidores de insectos de estas, o
combinaciones de estas, que confieren actividad contra

plagas de lepidópteros, lo que incluye cualquier proteína que presente actividad pesticida o inhibidora de insectos si la alineación de dicha proteína con TIC4472, TIC4472PL o TIC1425 produce una identidad de secuencia de aminoácidos de cualquier fracción de porcentaje de entre alrededor del 93% y alrededor del 100%; o si la alineación de dicha proteína con TIC2613 o TIC2613PL produce una identidad de secuencia de aminoácidos de cualquier fracción de porcentaje entre alrededor del 73% y alrededor del 100%.

10 Las proteínas TIC4472, TIC4472PL, TIC1425, TIC2613 o TIC2613PL incluyen tanto la forma dirigida al plástido como la forma no dirigida al plástido de las proteínas.

El término "segmento" o "fragmento" se usa en esta solicitud para describir secuencias consecutivas de aminoácidos o ácidos nucleicos que son más cortas que la secuencia completa de aminoácidos o ácidos nucleicos que describe una proteína TIC4472, TIC4472PL, TIC1425, TIC2613 o TIC2613PL.

Un segmento o fragmento que presenta actividad inhibidora de insectos también se describe en la presente solicitud si la alineación de dicho segmento o fragmento, con la sección correspondiente de la proteína TIC4472 que se establece en la SEQ ID NO:2, la proteína TIC4472PL que se establece en la SEQ ID NO:4, la proteína TIC1425 que se establece en la SEQ ID NO:6 genera identidad de secuencia de aminoácidos de cualquier porcentaje de fracción de alrededor de 93 a alrededor de 100 por ciento entre el segmento o fragmento y

la sección correspondiente de la proteína TIC4472, TIC4472PL o TIC1425; o si la alineación de dicho segmento o fragmento, con la sección correspondiente de TIC2613 que se establece en la SEQ ID NO:8, o la proteína TIC2613PL que se establece en la SEQ ID NO:10 genera identidad de secuencia de aminoácidos de cualquier porcentaje de fracción de alrededor de 73 a alrededor de 100 por ciento entre el segmento o fragmento y la sección correspondiente de la proteína TIC2613 o TIC2613PL.

- 10 En otras modalidades específicas, se puede definir que un fragmento de una proteína TIC4472, TIC4472PL, TIC1425, TIC2613 o TIC2613PL presenta la actividad pesticida que posee la molécula de la proteína inicial de la cual se deriva. Se puede definir que un fragmento de una secuencia
- 15 de ácido nucleico que codifica una proteína TIC4472, TIC4472PL, TIC1425, TIC2613 o TIC2613PL codifica una proteína que presenta la actividad pesticida que posee la molécula de proteína codificada por la secuencia de ácido nucleico inicial de la cual se deriva. Un fragmento o una
- 20 variante descrita en la presente además puede comprender un dominio identificado en la presente que es responsable de la actividad pesticida de una proteína.

En modalidades específicas, se proporcionan fragmentos de una proteína TIC4472, TIC4472PL, TIC1425, TIC2613 o

25 TIC2613PL que comprenden al menos alrededor de 50, al menos alrededor de 75, al menos alrededor de 95, al menos

alrededor de 100, al menos alrededor de 125, al menos
alrededor de 150, al menos alrededor de 175, al menos
alrededor de 200, al menos alrededor de 225, al menos
alrededor de 250, al menos alrededor de 275, al menos
5 alrededor de 300, al menos alrededor de 500, al menos
alrededor de 600, al menos alrededor de 700, al menos
alrededor de 750, al menos alrededor de 800, al menos
alrededor de 900, al menos alrededor de 1000, al menos
alrededor de 1100, al menos alrededor de 1150 o al menos
10 alrededor de 1175 aminoácidos contiguos, o más, de una
proteína TIC4472, TIC4472PL, TIC1425, TIC2613 o TIC2613PL
que tiene actividad pesticida tal como se describe en la
presente. En determinadas modalidades, la invención
proporciona fragmentos de cualquiera de SEQ ID NO: 2, 4, 6,
15 8, o 10, que tienen la actividad de la secuencia de
longitud completa. Los métodos para producir dichos
fragmentos a partir de una molécula inicial son conocidos
en la técnica.

En la presente solicitud, la referencia a los términos
20 "activo" o "actividad", "actividad pesticida", "pesticida" o
"actividad insecticida", "inhibidora de insectos" o
"insecticida", se refiere a la eficacia de un agente
tóxico, por ejemplo, una toxina proteica, para inhibir
(inhibir el crecimiento, la alimentación, la fecundidad o
25 la viabilidad), suprimir (suprimir el crecimiento, la
alimentación, la fecundidad o la viabilidad), controlar

(controlar la infestación de plagas, controlar las actividades de alimentación de plagas en un cultivo específico que contiene una cantidad eficaz de la proteína TIC4472, TIC4472PL, TIC1425, TIC2613 o TIC2613PL) o

5 destruir (provocar la morbilidad, la mortalidad o la fecundidad reducida de) una plaga. Estos términos pretenden incluir el resultado de proporcionar una cantidad eficaz como pesticida de una proteína tóxica a una plaga donde la exposición de la plaga a la proteína tóxica produce

10 morbilidad, mortalidad, fecundidad reducida o debilitamiento. Estos términos también incluyen la repulsión de la plaga de la planta, un tejido de la planta, una parte de la planta, semilla, células de la planta o de la ubicación geográfica específica donde la planta puede

15 crecer, como resultado de proporcionar una cantidad eficaz como pesticida de la proteína tóxica en o sobre la planta. En general, la actividad pesticida se refiere a la capacidad de una proteína tóxica de ser eficaz para inhibir el crecimiento, desarrollo, viabilidad, comportamiento

20 alimenticio, comportamiento de apareamiento, fecundidad o cualquier disminución medible de los efectos adversos provocados por la alimentación de un insecto con esta proteína, fragmento de proteína, segmento de proteína o polinucleótido de una plaga diana específica, incluso,

25 entre otros, insectos del orden de lepidópteros. La proteína tóxica puede ser producida por la planta o puede

ser aplicada a la planta o al ambiente dentro de la ubicación donde se encuentra la planta. Los términos "bioactividad", "efectivo", "eficaz" o variaciones de estos, también son términos utilizados de forma intercambiable en la presente solicitud para describir los efectos de las proteínas de la presente invención en plagas de insectos diana.

Una cantidad eficaz como insecticida de un agente tóxico, cuando se proporciona a la dieta de una plaga diana, presente 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 proteína pesticidas o insecticidas se pueden usar solos o en combinaciones entre sí. Los agentes químicos incluyen, de modo no taxativo, moléculas de ARNcd que se dirigen a genes específicos para la supresión en una plaga diana, organocloruros, organofosfatos, carbamatos, piretroides, neonicotinoides y rianoides. Los agentes proteicos pesticidas o insecticidas incluyen las toxinas proteicas que se establecen en la presente solicitud, así como otros agentes tóxicos proteináceos que incluyen los que se dirigen a lepidópteros, así como toxinas proteicas que se usan para controlar otras plagas vegetales, tales como proteínas Cry y Cyt disponibles en la técnica para su uso para controlar

especies de coleópteros, hemípteros y homópteros.

Se pretende que la referencia a una plaga, particularmente una plaga de una planta de cultivo, se refiera a plagas de insectos de plantas de cultivo, particularmente las plagas de insectos lepidópteros que son controladas por la clase de toxinas proteicas TIC4472, TIC4472PL, TIC1425, TIC2613 o TIC2613PL. Sin embargo, la referencia a una plaga también puede incluir plagas de insectos coleópteros, hemípteros y homópteros de plantas, así como nematodos y hongos cuando los agentes tóxicos que se dirigen a estas plagas se colocan o presentan junto con la proteína TIC4472, TIC4472PL o TIC1425 o una proteína que es el 93 a alrededor del 100 por ciento idéntica a TIC4472, TIC4472PL o TIC1425; o la proteína TIC2613 o TIC2613PL o una proteína que es el 73 a alrededor del 100 por ciento idéntica a TIC2613 o TIC2613PL.

Las proteínas TIC4472, TIC4472PL, TIC1425, TIC2613 o TIC2613PL se relacionan por una función común y presentan actividad insecticida hacia plagas de insectos de las especies de insectos de lepidópteros que incluyen adultos, pupas, larvas y neonatos.

Los insectos del orden lepidópteros incluyen, de modo no taxativo, gusanos soldados, gusanos cortadores, falsos medidores, y heliothinaes en la familia Noctuidae, por ejemplo, cogollero del maíz (*Spodoptera frugiperda*), gusano soldado (*Spodoptera exigua*), gusano soldado africano

(*Spodoptera exempta*), gusano meridional (*Spodoptera eridania*), gusano de las crucíferas (*Mamestra configurata*), gusano cortador grasiento (*Agrotis ipsilon*), gusano falso medidor (*Trichoplusia ni*), lagarta verde (*Pseudoplusia*
5 *includens*), oruga del frijol terciopelo (*Anticarsia gemmatalis*), gusano verde de la soya (*Hypena scabra*), oruga del tabaco (*Heliothis virescens*), gusano cortador granulado (*Agrotis subterranea*), gardama (*Pseudaletia unipuncta*), gusano cortador pálido (*Agrotis orthogonia*); barrenadores,
10 polillas del nogal, gusanos telarañeros, gusanos de las bellotas, gusanos de la col y gusanos presidiarios de la familia Pyralidae, por ejemplo, taladro del maíz (*Ostrinia nubilalis*), gusano de la naranja (*Amyelois transitella*), gusano de la raíz del maíz (*Crambus caliginosellus*), gusano
15 tejedor del césped (*Herpetogramma licarsisalis*), polilla del girasol (*Homoeosoma electellum*), gusano saltarín (*Elasmopalpus lignosellus*); enrolladores, larvas de mariposa, gusanos de semilla y gusanos de frutas en la familia Tortricidae, por ejemplo, gusano de la pera y la
20 manzana (*Cydia pomonella*), polilla de la vid (*Endopiza viteana*), polilla oriental de la fruta (*Grapholita molesta*), polilla de capullo de girasol (*Suleima helianthana*); y muchos otros lepidópteros importantes desde el punto de vista económico, por ejemplo, palomilla dorso
25 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 medidor de la hoja del algodón (Alabama argillacea), enrollador de hojas frutales (Archips argyrospila), enrollador de los brotes (Archips rosana) y otras especies de Archips, (Chilo suppressalis, barrenador del arroz o barrenador del tallo del arroz), enrollador de las hojas de arroz (Cnaphalocrocis medinalis), gusano de la raíz del maíz (Crambus caliginosellus), oruga del césped (Crambus teterrellus), barrenador del maíz (Diatraea grandiosella), barrenador de la caña de azúcar (Diatraea saccharalis), oruga espinosa (Earias insulana), gusano moteado (Earias vittella), gusano cogollero (Helicoverpa armigera), gusano elotero (Helicoverpa zea, también conocido como gusano de la soja y gusano de algodón), gusano bellotero (Heliothis virescens), gusano tejedor del césped (Herpetogramma licarsisalis), gusano cortador occidental del frijol (Striacosta albicosta), polilla del racimo de la vid (Lobesia botrana), minador de hojas de los cítricos (Phyllocnistis citrella), blanca de la col (Pieris brassicae), blanquita de la col (Pieris rapae, también conocida como mariposa de la col), gusano soldado (Spodoptera exigua), gusano gris del tabaco (Spodoptera litura, también conocido como gusano defoliador) y polilla de tomate (Tuta absoluta).

Se pretende que la referencia en la presente solicitud a

una "molécula aislada de ADN", o una frase o término equivalente, signifique que la molécula de ADN está presente sola o en combinación con otras composiciones, pero no está en su entorno natural. Por ejemplo, los

5 elementos de ácido nucleico, tales como una secuencia codificante, una secuencia de intrones, una secuencia líder sin traducir, una secuencia promotora, una secuencia de terminación transcripcional y similares, que se encuentran naturalmente dentro del ADN del genoma de un organismo no

10 se consideran "aisladas", siempre y cuando el elemento esté dentro del genoma del organismo y en la ubicación dentro del genoma en el que se encuentra naturalmente. Sin embargo, cada uno de estos elementos, y subpartes de estos elementos, se encuentra "aislado" dentro del alcance de la

15 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 proteína insecticida o cualquier variante insecticida

20 de origen natural de la proteína podría ser una secuencia de nucleótidos aislada siempre que la secuencia de nucleótidos no esté dentro del ADN de la bacteria en la cual la secuencia que codifica la proteína se encuentra naturalmente. Una secuencia sintética de nucleótidos que

25 codifica la secuencia de aminoácidos de la proteína insecticida de origen natural se podría considerar aislada

a 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 considera una secuencia de nucleótidos aislada si está presente dentro de la estructura de plásmido o similar utilizada 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.

Como se describe de manera adicional en la presente solicitud, se descubrió un marco de lectura abierto (ORF) que codifica TIC4747 (SEQ ID NO:1) en el ADN obtenido de la cepa de *Bacillus thuringiensis* EG10742. La secuencia codificante se clonó y expresó en células hospedadoras microbianas para producir proteínas recombinantes usadas en ensayos biológicos. Se descubrió un marco de lectura abierto (ORF) que codifica TIC1425 (SEQ ID NO:5) en el ADN obtenido de la cepa de *Bacillus thuringiensis* EG10731. Se descubrió un marco de lectura abierto (ORF) que codifica TIC2613 (SEQ ID NO:7) en el ADN obtenido de la cepa de *Bacillus thuringiensis* EG5408. El ensayo biológico usando proteínas derivadas de células hospedadoras microbianas de TIC4472 demostró actividad contra las especies de lepidópteros gusano soldado (*Spodoptera exigua*), gusano

elotero (*Helicoverpa zea*), gusano medidor de la hoja del
 algodnero (*Alabama argillacea*), taladro del maíz (*Ostrinia
 nubilalis*), cogollero del maíz (*Spodoptera frugiperda*),
 oruga del viejo mundo (*Helicoverpa armigera*), gusano
 5 defoliador (*Spodoptera litura*), gusano rosado (*Pectinophora
 gossypiella*), gusano rosado resistente a Cry1Ac
 (*Pectinophora gossypiella*), lagarta verde (*Chrysodeixis
 includens*), gusano meridional (*Spodoptera eridania*),
 barrenador del maíz del suroeste (*Diatraea grandiosella*),
 10 gusano moteado (*Earias vittella*), barrenador de la caña de
 azúcar (*Diatraea saccharalis*), oruga del tabaco (*Heliothis
 virescens*) y oruga del frijol terciopelo (*Anticarsia
 gemmatilis*). Además, también se observó actividad contra el
 mosquito de la fiebre amarilla (*Aedes aegypti*). El ensayo
 15 biológico usando proteínas derivadas de células
 hospedadoras microbianas de TIC1425 demostró actividad
 contra las especies de lepidópteros gusano medidor de la
 hoja del algodnero (*Alabama argillacea*), taladro del maíz
 (*Ostrinia nubilalis*), cogollero del maíz (*Spodoptera
 20 frugiperda*), barrenador de la caña de azúcar (*Diatraea
 saccharalis*) y barrenador del maíz del suroeste (*Diatraea
 grandiosella*). El ensayo biológico usando proteínas
 derivadas de células hospedadoras microbianas de TIC2613
 demostró actividad contra las especies de lepidópteros
 25 gusano elotero (*Helicoverpa zea*), gusano medidor de la hoja
 del algodnero (*Alabama argillacea*), taladro del maíz

(*Ostrinia nubilalis*), cogollero del maíz (*Spodoptera frugiperda*), lagarta verde (*Chrysodeixis includens*), barrenador del maíz del suroeste (*Diatraea grandiosella*) y oruga del tabaco (*Heliothis virescens*).

5 Para la expresión en las células vegetales, las proteínas TIC4472, TIC4472PL, TIC1425, TIC2613 o TIC2613PL se pueden expresar para que residan en el citosol o dirigirse a diversos organelos de la célula vegetal. Por ejemplo, dirigir una proteína hacia el cloroplasto puede dar como

10 resultado un aumento en los niveles de proteína expresada en una planta transgénica, a la vez que previene la aparición de elementos fuera del fenotipo. El direccionamiento también puede dar como resultado la eficacia de resistencia a las plagas en el evento

15 transgénico. Un péptido diana o péptido de tránsito es una cadena peptídica corta (3-70 aminoácidos de longitud) que dirige el transporte de una proteína hacia una región específica en la célula, inclusive el núcleo, mitocondria, retículo endoplásmico (RE), cloroplasto, apoplasto,

20 peroxisoma y membrana plasmática. Algunos péptidos diana se escinden de la proteína mediante peptidasas de señal luego de que las proteínas son transportadas. Para dirigirse hacia el cloroplasto, las proteínas contienen péptidos de tránsito que tienen alrededor de 40-50 aminoácidos. Por

25 descripciones del uso de péptidos de tránsito a cloroplastos, véanse las patentes estadounidenses n.º

5,188,642 y 5,728,925. Muchas de las proteínas localizadas en cloroplastos se expresan a partir de genes nucleares como precursores y se dirigen al cloroplasto mediante un péptido de tránsito a cloroplastos (CTP). Los ejemplos de
5 dichas proteínas de cloroplastos aislados incluyen, de modo no taxativo, las asociadas con la subunidad pequeña (SSU) de ribulosa-1,5,-bisfosfato carboxilasa, ferredoxina, ferredoxina oxidoreductasa, la proteína I y proteína II del complejo captador de luz, tioredoxina F, enolpiruvil
10 shikimato fosfato sintasa (EPSPS), y los péptidos de tránsito descritos en la patente estadounidense n.º 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 fusiones de proteínas con un
15 CTP heterólogo, y que el CTP es suficiente para dirigir una proteína hacia el cloroplasto. Se ha observado que la incorporación de un péptido de tránsito a cloroplastos adecuado, tal como *Arabidopsis thaliana* EPSPS CTP (CTP2) (véase, Klee et ál., *Mol. Gen. Genet.* 210:437-442, 1987) o
20 *Petunia hybrida* EPSPS CTP (CTP4) (véase della-Cioppa et ál., *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* 83:6873-6877, 1986) dirige secuencias de proteína de EPSPS heteróloga a cloroplastos en plantas transgénicas (veánse las patentes estadounidenses n.º 5,627,061; 5,633,435; y 5,312,910; y EP
25 0218571; EP 189707; EP 508909; y EP 924299). Para dirigir la toxina proteica TIC6757 o TIC6757PL al cloroplasto, una

secuencia que codifica un péptido de tránsito a cloroplastos se coloca en la posición 5', unido de manera operativa y en el marco de una secuencia codificante sintética que codifica la toxina proteica TIC6757 o
5 TIC6757PL que se diseñó para su expresión óptima en células vegetales.

Se contempla que se pueden crear otras secuencias de proteínas de toxinas relacionadas con TIC4472, TIC1425 o TIC2613 mediante el uso de la secuencia de aminoácidos de
10 TIC4472, TIC1425 o TIC2613 para crear proteínas novedosas con propiedades novedosas. Las proteínas de toxinas TIC4472, TIC1425 o TIC2613 se pueden alinear para combinar las diferencias en el nivel de la secuencia de aminoácidos en variantes de secuencias de aminoácidos novedosas y
15 realizar cambios apropiados a la secuencia de ácido nucleico recombinante que codifica las variantes.

La presente descripción además contempla que variantes mejoradas de la clase de toxinas proteicas TIC4472 se pueden modificar genéticamente *in planta* mediante el uso de
20 diversos métodos de edición génica conocidos en la técnica. Las tecnologías utilizadas para la edición genómica incluyen, entre otros, ZFN (nucleasa de dedos de zinc), meganucleasas, TALEN (nucleasas efectoras similares al activador de la transcripción) y sistemas CRISPR
25 (repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente espaciadas)/Cas (asociado a CRISPR). Estos métodos de

edición genómica se pueden utilizar para modificar la secuencia de codificación de proteína 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 modifican para modificar genéticamente una secuencia de aminoácidos de una proteína nueva. Alternativamente, se reemplaza o se elimina un fragmento dentro de la secuencia de codificación, o se insertan fragmentos de ADN adicionales en la secuencia codificante, para modificar genéticamente una secuencia codificante de toxina nueva. La secuencia codificante nueva puede codificar una proteína de toxina con nuevas propiedades tales como mayor actividad o espectro contra plagas de insectos, así como proporcionar actividad contra una especie de plaga de insecto en donde se ha desarrollado resistencia contra la proteína de toxina de insecto original. La célula vegetal que comprende la secuencia codificante de toxina editada por el gen se puede utilizar a través de métodos conocidos en la técnica para generar plantas enteras que expresan la proteína de toxina nueva. También se considera que los fragmentos de TIC4472, TIC1425 o TIC2613 o las variantes de proteína de estos pueden ser formas truncadas, donde uno o más aminoácidos se eliminan del extremo N, extremo C, la mitad de la proteína, o combinaciones de estos, en donde los fragmentos y las

variantes conservan la actividad inhibidora de insectos. Estos fragmentos pueden ser de origen natural o variantes sintéticas de TIC4472, TIC1425 o TIC2613 o variantes de proteína derivadas, pero deberían conservar la actividad inhibidora de insectos de al menos TIC4472, TIC1425 o TIC2613. Un fragmento o una variante descrita en la presente además puede comprender un dominio identificado en la presente que es responsable de la actividad pesticida de una proteína.

10 Las proteínas que se asemejan a las proteínas TIC4472, TIC4472PL, TIC1425, TIC2613 y TIC2613PL pueden identificarse y compararse entre sí usando varios algoritmos informáticos conocidos en la técnica (véanse las tablas 1 y 2). Las identidades de secuencia de aminoácidos indicados en la presente solicitud son el resultado de una alineación Clustal W utilizando estos parámetros por defecto: Matriz de peso: blosum, penalización por abertura de hueco: 10.0, Penalización por extensión de hueco: 0.05, Huecos hidrofílicos: Activado, Residuos hidrofílicos: GPSNDQERK, Penalizaciones por huecos específicos de residuos: Activado (Thompson et ál. (1994) Nucleic Acids Research, 22:4673-4680). El porcentaje de identidad de aminoácidos se calcula adicionalmente mediante el producto de 100 % multiplicado por (identidades de aminoácidos/longitud de la proteína de la invención). También se encuentran disponibles otros algoritmos de

alineación en la técnica, y proporcionan resultados similares a los obtenidos usando una alineación Clustal W y se contemplan en la presente.

Se pretende que una proteína que presenta actividad
5 inhibidora de insectos contra una especie de insectos lepidópteros se relacione con TIC4472, TIC4472PL o TIC1425 si la proteína se usa en una consulta, por ejemplo, en una alineación Clustal W, y las proteínas de la presente invención que se establecen en la SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4
10 o SEQ ID NO:6 se identifican como aciertos en dicha alineación donde la proteína de consulta presenta de al menos el 93% a alrededor del 100% de identidad de aminoácidos a lo largo de la longitud de la proteína de consulta que es de alrededor de 93%, 94%, 95%, 96%, 97%,
15 98%, 99%, 100%, o cualquier fracción de porcentaje en este intervalo. También se pretende que una proteína que presenta actividad inhibidora de insectos contra una especie de insectos lepidópteros se relacione con TIC2613 o TIC2613PL si la proteína se usa en una consulta, por
20 ejemplo, en una alineación Clustal W, y las proteínas de la presente invención que se establecen en la SEQ ID NO:8 o SEQ ID NO:10 se identifican como aciertos en dicha alineación donde la proteína de consulta presenta de al menos el 73% a alrededor del 100% de identidad de
25 aminoácidos a lo largo de la longitud de la proteína de consulta que es de alrededor de 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%, o cualquier fracción de porcentaje en este intervalo.

Las proteínas ejemplares TIC4472, TIC4472PL, TIC1425, TIC2613 y TIC2613PL se alinearon entre sí utilizando un algoritmo Clustal W. Se creó una matriz de pares de identidades de secuencia de aminoácidos porcentuales para cada una de las proteínas de longitud completa, tal como se indica en la tabla 1.

Tabla 1. Representación de la matriz de pares de las proteínas ejemplares TIC4472, TIC4472PL, TIC1425, TIC2613 y TIC2613PL.

Toxina	TIC4472 (SEQ ID NO:2)	TIC4472PL (SEQ ID NO:4)	TIC1425 (SEQ ID NO:6)	TIC2613 (SEQ ID NO:8)	TIC2613PL (SEQ ID NO:10)
TIC4472 (SEQ ID NO:2)	-	99.9 (1186)	99.9 (1186)	68.1 (808)	68 (807)
TIC4472PL (SEQ ID NO:4)	99.8 (1186)	-	99.7 (1185)	67.9 (807)	68.1 (809)
TIC1425 (SEQ ID NO:6)	99.9 (1186)	99.8 (1185)	-	68.2 (809)	68.1 (808)
TIC2613 (SEQ ID NO:8)	68.6 (808)	68.5 (807)	68.7 (809)	-	99.9 (1177)
TIC2613PL (SEQ ID NO:10)	68.4 (807)	68.6 (809)	68.5 (808)	99.8 (1177)	-

Descripción de la tabla: la alineación Clustal W entre (X) e (Y) se indica en una matriz de pares. El porcentaje de identidad de aminoácidos entre todos los pares se calcula y se representa mediante el primer número en cada casilla. El segundo número (entre paréntesis) en cada casilla

representa la cantidad de aminoácidos idénticos entre el par.

Además del porcentaje de identidad, TIC4472, TIC4472PL, TIC1425, TIC2613 y TIC2613PL y las proteínas relacionadas también pueden estar relacionadas por estructura principal (motivos de aminoácidos conservados), por longitud (alrededor de 1187 aminoácidos) y por otras características. Las características de las toxinas proteicas TIC4472, TIC4472PL, TIC1425, TIC2613 y TIC2613PL se registran en la Tabla 2.

Tabla 2. Características seleccionadas de las proteínas TIC4472, TIC4472PL, TIC1425, TIC2613 y TIC2613PL.

<u>Proteína</u>	<u>Peso molecular (en daltones)</u>	<u>Longitud de aminoácido</u>	<u>Punto isoelectrico</u>	<u>Carga a PH 7.0</u>	<u>N.º de aminoácidos fuertemente básicos (-)</u>	<u>N.º de aminoácidos fuertemente ácidos</u>	<u>N.º de aminoácidos hidrófobos</u>	<u>N.º de aminoácidos polares</u>
TIC4472	134446.86	1187	4.7545	-36	137	162	611	576
TIC4472PL	134517.94	1188	4.7545	-36	137	162	612	576
TIC1425	134460.88	1187	4.7545	-36	137	162	611	576
TIC2613	134636.07	1178	4.6653	-42	132	162	588	590
TIC2613PL	134707.15	1179	4.6653	-42	132	162	589	590

Tal como se describe adicionalmente en los ejemplos de la presente solicitud, se diseñaron las secuencias de las moléculas de ácidos nucleicos sintéticas codificantes de una variante de TIC4472, TIC4472PL, y una variante de TIC2613, TIC2613PL para utilizar en las plantas. Un ejemplo de secuencia de molécula de ácido nucleico recombinante que

se diseñó para su uso en plantas que codifica la proteína TIC4472PL se presenta como la SEQ ID NO:3. Un ejemplo de secuencia de molécula de ácido nucleico recombinante que se diseñó para su uso en plantas que codifica la proteína

5 TIC2613PL se presenta como la SEQ ID NO:9. Las proteínas TIC4472PL y TIC2613PL tienen un aminoácido de alanina adicional inmediatamente después de la metionina de inicio con respecto a las proteínas TIC4472 y TIC2613, respectivamente. Se cree que el residuo de alanina

10 adicional insertado en las secuencias de aminoácidos de TIC4472 y TIC2613 mejora la expresión de la proteína *in planta*. Asimismo, las secuencias de las moléculas de ácidos nucleicos sintéticas codificantes de variantes de TIC1425 y se pueden diseñar para su uso en plantas.

15 El ensayo de disco de hoja utilizando la proteína TIC4472PL que expresa tejido de hoja de algodón R₀ demostró actividad alta contra la lagarta verde (*Chrysodeixis includens*) y la oruga del tabaco (*Heliothis virescens*) y actividad baja contra el gusano bellotero del algodón (*Helicoverpa zea*) y

20 el cogollero del maíz (*Spodoptera frugiperda*). El ensayo de disco de hoja utilizando la proteína TIC4472PL que expresa tejido de hoja de soja R₀ demostró actividad contra el gusano meridional (*Spodoptera eridania*) y la lagarta verde (*Chrysodeixis includens*).

25 Las muestras de hojas de las plantas de soja R₀ que expresan las proteínas TIC4472PL y TIC2613PL demostraron

actividad contra el gusano meridional (*Spodoptera eridania*) y la lagarta verde (*Chrysodeixis includens*).

Los vectores y casetes de expresión que contienen una secuencia de molécula de ácido nucleico recombinante se pueden construir e introducir en células vegetales de maíz, soja, algodón o de otra planta de acuerdo con métodos y técnicas de transformación conocidos 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), patente estadounidense n.º 5,750,871 (canola), 7,026,528 (trigo), y 6,365,807 (arroz) y en Arencibia et ál. (1998) Transgenic Res. 7:213-222 (caña de azúcar), que se incorporan a la presente en su totalidad mediante esta referencia. Las células transformadas se pueden regenerar y convertirse en plantas transformadas que expresan las proteínas TIC4472, TIC4472PL, TIC1425, TIC2613 y TIC2613PL y demuestran actividad pesticida a través de ensayos biológicos realizados en presencia de larvas de plagas de lepidópteros usando discos de hojas de planta obtenidos de las plantas transformadas. Las plantas pueden derivarse de células vegetales mediante técnicas de regeneración y transformación de semillas, polen o meristemo. Se conocen

en la técnica métodos para transformar plantas.

Como alternativa a los métodos de transformación tradicionales, una secuencia de ADN, tal como un transgen, casetes de expresión, etc., se pueden insertar o integrar

5 en un sitio o locus específico dentro del genoma de una planta o una célula vegetal a través de integración dirigida al sitio. Las moléculas y las construcciones de ADN recombinante de la presente descripción pueden incluir, por ende, una secuencia de plantilla donante que comprende

10 al menos un transgen, un casete de expresión u otra secuencia de ADN para la inserción en el genoma de la planta o la célula vegetal. Dicha plantilla donante para la integración dirigida al sitio además puede incluir uno o dos grupos de homología que flanquean una secuencia de

15 inserción (es decir, la secuencia, el transgen, el casete, etc., que se va a insertar en el genoma de planta). Las construcciones de ADN recombinantes de la presente descripción pueden comprender además un casete de expresión que codifica una nucleasa específica de sitio y/o cualquier

20 proteína asociada para llevar a cabo la integración dirigida al sitio. Estos casetes de expresión de nucleasa pueden estar presentes en la misma molécula o vector que la plantilla donante (en cis) o en una molécula o vector separados (en trans). En la técnica se conocen diversos

25 métodos para la integración dirigida al sitio que comprenden diferentes proteínas (o complejos de proteínas

y/o ARN guía) que cortan el ADN genómico para producir una interrupción de cadena doble (DSB) o mella en un sitio o locus genómico deseado. En resumen, tal como se entiende en la técnica, durante el proceso de la reparación de la DSB o la mella introducida por la enzima nucleasa, el ADN de
5 la plantilla donante se puede integrar en el genoma en el sitio de la DSB o la mella. La presencia de los grupos de homología en la plantilla donante puede promover la adopción y el direccionamiento de la secuencia de inserción en el genoma de planta durante el proceso de reparación a
10 través de recombinación homóloga, aunque se puede producir un evento de inserción a través de la unión de extremos no homólogos (NHEJ). Ejemplos de nucleasas específicas del sitio que se pueden utilizar incluyen nucleasas de dedos de
15 zinc, meganucleasas modificadas genéticamente o naturales, endonucleasas TALE, y endonucleasas guiadas por ARN (p. ej., Cas9 o Cpf1). Para los métodos que utilizan las nucleasas específicas del sitio guiadas por ARN (p. ej., Cas9 o Cpf1), las construcciones de ADN recombinantes
20 también comprenderán una secuencia codificante de uno o más ARN guía para dirigir la nucleasa al sitio deseado dentro del genoma de planta.

Según se utiliza en la presente, una "molécula de ADN recombinante" es una molécula de ADN que comprende una
25 combinación de moléculas de ADN que no se produciría de forma natural sin la intervención humana. Por ejemplo, una

molécula de ADN recombinante puede ser una molécula de ADN que está compuesta por al menos dos moléculas de ADN heterólogas entre sí, una molécula de ADN que comprende una secuencia de ADN que se desvía de las secuencias de ADN que existen en la naturaleza, o una molécula de ADN que se ha incorporado en el ADN de una célula hospedadora mediante transformación genética o edición génica. De modo similar, una "molécula de proteína recombinante" es una molécula de proteína que comprende una combinación de aminoácidos que no se produciría de forma natural sin la intervención humana. Por ejemplo, una molécula de proteína recombinante puede ser una molécula de proteína que está compuesta por al menos dos moléculas de aminoácidos heterólogas entre sí, una molécula de proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que se desvía de las secuencias de aminoácidos que existen en la naturaleza, o una molécula de proteína que se expresa en una célula hospedadora como resultado de la transformación genética de la célula hospedadora o mediante edición génica del genoma de la célula hospedadora.

Se contemplan composiciones de moléculas de ácido nucleico recombinante que codifican TIC4472, TIC4472PL, TIC1425, TIC2613 y TIC2613PL. Por ejemplo, las proteínas TIC4472, TIC4472PL, TIC1425, TIC2613 y TIC2613PL 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, tales como un promotor, y cualquier otro elemento regulador necesario para la expresión en el sistema para el cual está destinada la construcción. Los

5 ejemplos no taxativos incluyen un promotor funcional vegetal unido de manera operativa a la secuencia que codifica la proteína TIC4472, TIC4472PL, TIC1425, TIC2613 o TIC2613PL para la expresión de la proteína en plantas o un promotor funcional de *Bt* unido de manera operativa a una

10 secuencia que codifica una proteína TIC4472, TIC4472PL, TIC1425, TIC2613 o TIC2613PL para la expresión de la proteína en una bacteria *Bt* u otra especie *Bacillus*. Otros elementos pueden estar unidos de manera operativa a la secuencia que codifica la proteína TIC4472, TIC4472PL,

15 TIC1425, TIC2613 o TIC2613PL, inclusive, 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 a plástidos, péptidos de señal),

20 secuencias de polipéptidos para enzimas de modificación postraducciona, sitios de unión a ribosomas y sitios de direccionamiento a iARN. Las moléculas de polinucleótidos recombinantes ilustrativas que se proporcionan en la presente incluyen, de modo no taxativo, un promotor

25 heterólogo unido de manera operativa a un polinucleótido tal como las SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:5, SEQ ID

NO:7 y SEQ ID NO:9 que codifica los respectivos polipéptidos o proteínas que tienen la secuencia de aminoácidos que se establece en la SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8 y SEQ ID NO:10. Un promotor
5 heterólogo también puede estar unido de manera operativa a secuencias sintéticas codificantes de ADN que codifican una TIC4472PL o TIC2613PL dirigida a plástidos; o una TIC4472PL o TIC2613PL no dirigida. Los codones de una molécula de ácido nucleico recombinante que codifica las proteínas
10 descritas en la presente pueden sustituirse por codones sinónimos (lo que se conoce en la técnica como sustitución silenciosa).

Una construcción de ADN recombinante que comprende secuencias que codifican la proteína TIC4472, TIC4472PL,
15 TIC1425, TIC2613 o TIC2613PL puede comprender además una región de ADN que codifica uno o más agentes inhibidores de insectos que pueden configurarse para expresar o coexpresar simultáneamente con una secuencia de ADN que codifica una proteína TIC4472, TIC4472PL, TIC1425, TIC2613 o TIC2613PL,
20 una proteína diferente a la proteína TIC4472, TIC4472PL, TIC1425, TIC2613 o TIC2613PL, 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
25 que funcionan para contribuir a la eficacia de un agente inhibidor de insectos, por ejemplo, al contribuir a su

expresión, influenciar su estabilidad en plantas, optimizar energía libre para la oligomerización, aumentar su toxicidad y su espectro de actividad. Una proteína auxiliar puede facilitar la absorción de uno o más agentes
5 inhibidores de insectos, por ejemplo, o potenciar los efectos tóxicos del agente tóxico.

Una construcción de ADN recombinante puede disponerse de forma que todas las proteínas o moléculas de ARNcd se expresen desde un promotor o cada proteína o molécula de
10 ARNcd esté bajo el control de promotores separados, o una combinación de estos. Las proteínas de la presente invención se pueden expresar a partir de un sistema de expresión de múltiples genes en el cual una o más proteínas de TIC4472, TIC4472PL, TIC1425, TIC2613 o TIC2613PL se
15 expresan a partir de un segmento de nucleótidos común que también contiene otros marcos de lectura abiertos y promotores, según el tipo de sistema de expresión seleccionado. Por ejemplo, un sistema de expresión multigénico bacteriano puede utilizar un único promotor
20 para dirigir la expresión de marcos de lectura abiertos en conjunto/unidos de forma múltiple del interior de un único operón (es decir, expresión policistrónica). En otro ejemplo, un sistema de expresión multigénico vegetal puede utilizar casetes de expresión no unidos o unidos por unión
25 múltiple, donde cada casete expresa una proteína diferente u otro agente, tal como una o más moléculas de ARNcd.

Las construcciones de ADN recombinante o de polinucleótidos recombinantes que comprenden una secuencia que codifica una proteína TIC4472, TIC4472PL, TIC1425, TIC2613 o TIC2613PL pueden administrarse a las células hospedadoras mediante
5 vectores, por ejemplo, un plásmido, un baculovirus, un cromosoma sintético, un virión, un cósmido, un fagémido, un fago o un vector viral. Dichos vectores pueden utilizarse para lograr una expresión estable o transitoria de una secuencia codificante de proteína TIC4472, TIC4472PL,
10 TIC1425, TIC2613 o TIC2613PL en una célula hospedadora, o expresión posterior del polipéptido codificado. También se hace referencia en la presente a una construcción de ADN recombinante o de polinucleótido recombinante exógeno que comprende una secuencia codificante de proteína TIC4472,
15 TIC4472PL, TIC1425, TIC2613 o TIC2613PL y que se introduce en una célula hospedadora como "transgen".

Se proporcionan en la presente bacterias transgénicas, células vegetales transgénicas, plantas transgénicas y partes de plantas transgénicas que contienen un
20 polinucleótido recombinante que expresa una o más de TIC4472 o una secuencia codificante de proteína de toxina de una familia relacionada. El término "célula bacteriana" o "bacteria" puede incluir, de modo no taxativo, una célula de *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Escherichia*, *Salmonella*,
25 *Pseudomonas*, *Brevibacillus*, *Klebsiella*, *Erwinia* o *Rhizobium*. La expresión "célula vegetal" o "planta" puede

incluir, de modo no taxativo, una planta dicotiledónea o monocotiledónea. El término "célula vegetal" o "planta" puede incluir, de modo no taxativo, una célula vegetal o planta de alfalfa, banana, cebada, poroto, brócoli, repollo, brassica, zanahoria, mandioca, ricino, coliflor, apio, garbanzo, repollo chino, cítricos, coco, café, maíz, trébol, algodón, una cucurbitácea, pepino, abeto de Douglas, berenjena, eucaliptus, lino, ajo, uva, lúpulo, puerro, lechuga, pino taeda, mijo, melón, nuez, avena, aceituna, cebolla, plantas ornamentales, palmera, pasto forrajero, arveja, maní, morrón, gandul, pino, papa, álamo, calabaza, pino insigne, rábano, colza, arroz, rizomas, centeno, cártamo, arbusto, sorgo, pino del sur, soja, espinaca, calabacín, frutilla, remolacha azucarera, caña de azúcar, girasol, maíz dulce, liquidámbar, boniato, pasto varilla, té, tabaco, tomate, triticale, césped, sandía y trigo. En determinadas modalidades, se proporcionan plantas transgénicas y partes de plantas transgénicas regeneradas de una célula vegetal transgénica. En determinadas modalidades, las plantas transgénicas se pueden obtener de una semilla transgénica cortando, quebrando, moliendo o separando de otro modo la parte de la planta. En determinadas modalidades, la parte de 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. Como se usa

en este contexto, una parte "no regenerable" de una parte de planta transgénica es una parte que no se puede inducir para formar una planta entera o que no se puede inducir para formar una planta entera que sea capaz de reproducción sexual y/o asexual. En determinadas modalidades, una parte no regenerable de una parte de planta es una parte de una semilla, cápsula, hoja, flor, tallo o raíz transgénica.

Se proporcionan métodos para generar plantas transgénicas que comprenden cantidades inhibitoras de insectos

lepidópteros de una proteína TIC4472, TIC4472PL, TIC1425, TIC2613 o TIC2613PL. Dichas plantas pueden generarse mediante la introducción de un polinucleótido recombinante que codifica cualquiera de las proteínas proporcionadas en la presente solicitud a una célula vegetal, y la selección

de una planta derivada de dicha célula vegetal que expresa una cantidad inhibitora de insectos lepidópteros de las proteínas. Las plantas pueden derivarse de células vegetales mediante técnicas de regeneración y transformación de semillas, polen o meristemo. Se conocen

en la técnica métodos para transformar plantas.

También se describen en la presente productos vegetales procesados, donde el producto procesado comprende una cantidad detectable de una proteína TIC4472, TIC4472PL, TIC1425, TIC2613 o TIC2613PL, un segmento inhibidor de insectos o fragmento de este, o cualquier parte distinguible en la presente. En determinadas modalidades,

el producto procesado se selecciona del grupo que consiste en partes de plantas, biomasa vegetal, aceite, alimento, azúcar, pienso, harina, copos, salvado, hebras, vainas, semillas y semillas procesadas. En determinadas
5 modalidades, el producto procesado no es regenerable. El producto vegetal puede comprender productos básicos u otros productos comerciales derivados de una planta transgénica o parte de planta transgénica, donde los productos básicos u otros productos pueden rastrearse comercialmente mediante
10 la detección de segmentos de nucleótidos o proteínas o ARN expresados que codifican o comprenden partes distinguibles de una proteína TIC4472, TIC4472PL, TIC1425, TIC2613 o TIC2613PL.

Las plantas que expresan las proteínas TIC4472, TIC4472PL,
15 TIC1425, TIC2613 o TIC2613PL pueden cruzarse mediante la reproducción con eventos transgénicos que expresan otras toxinas proteicas y/o que expresan otros rasgos transgénicos, tales como genes de tolerancia a herbicidas, genes que confieren rasgos de tolerancia al estrés o
20 resistencia y similares, o dichos rasgos pueden combinarse en un único vector, de forma que se unan estos rasgos.

Se pretende que la referencia en la presente solicitud a una molécula de ADN o una molécula de aminoácido "aislada", o una frase o término equivalente, signifiquen que la
25 molécula de ADN o la molécula de aminoácido está presente sola o en combinación con otras composiciones, pero no está

en su entorno natural. Por ejemplo, una molécula de ADN o una molécula de aminoácido podrían estar "aisladas" dentro del alcance de la descripción, siempre que el elemento no esté dentro del genoma del organismo ni en la ubicación dentro del genoma en la cual se encuentra naturalmente. 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 considera una secuencia de nucleótidos aislada si está presente dentro de la estructura de plásmido o similar utilizada 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.

Tal como se describe adicionalmente en los ejemplos, las secuencias codificantes de proteínas TIC4472, TIC4472PL, TIC1425, TIC2613 o TIC2613PL y las secuencias que tienen un porcentaje sustancial de identidad con TIC4472, TIC4472PL, TIC1425, TIC2613 o TIC2613PL pueden identificarse mediante el uso de métodos conocidos por los expertos en la técnica, tales como reacción en cadena de la polimerasa (PCR), hibridación y amplificación térmica. Por ejemplo, las proteínas TIC4472, TIC4472PL, TIC1425, TIC2613 o TIC2613PL pueden utilizarse para producir anticuerpos que se unen

específicamente a proteínas relacionadas, y pueden utilizarse para buscar y hallar otros miembros proteicos muy relacionados.

Además, las secuencias de nucleótidos que codifican las
5 proteínas de toxinas TIC4472, TIC4472PL, TIC1425, TIC2613 y
TIC2613PL pueden utilizarse como sondas y cebadores para
analizar e identificar otros miembros de la clase mediante
el uso de métodos de hibridación y amplificación isotérmica
o de ciclo térmico. Por ejemplo, los oligonucleótidos
10 derivados de la secuencia tal como se establece en la SEQ
ID NO:3 pueden utilizarse para determinar la presencia o
ausencia de un transgen de TIC4472PL en una muestra de
ácido desoxirribonucleico derivada de un producto de
materia prima. Los oligonucleótidos derivados de la
15 secuencia tal como se establece en la SEQ ID NO:7 pueden
utilizarse para determinar la presencia o ausencia de un
transgen de TIC2613PL en una muestra de ácido
desoxirribonucleico derivada de un producto de materia
prima. Dada la sensibilidad de determinados métodos de
20 detección de ácido nucleico que emplean oligonucleótidos,
se anticipa que los oligonucleótidos derivados de
secuencias tal como se establecen en la SEQ ID NO:3 o SEQ
ID NO:9 pueden utilizarse para detectar un transgen de
TIC4472PL o TIC2613PL en productos de materia prima
25 derivados de fuentes acumuladas donde solamente una parte
del producto de materia prima se deriva de una planta

transgénica que contiene cualquiera de los transgenes. Se reconoce además que dichos oligonucleótidos se pueden usar para introducir variaciones de secuencia en cada SEQ ID NO:3 y SEQ ID NO:9. Dichos oligonucleótidos de "mutagénesis" son útiles para la identificación de las variantes de secuencia de aminoácidos TIC4472PL y TIC2613PL que presentan un intervalo de actividad inhibidora o expresión variada de insectos en células hospedadoras de plantas transgénicas.

- 10 Los homólogos de secuencia de nucleótidos, por ejemplo, proteínas insecticidas codificadas por secuencias de nucleótidos que se hibridan con cada una o cualquiera de las secuencias descritas en la presente solicitud en condiciones de hibridación rigurosas, también son una
- 15 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 complementaria inversa) codifica una proteína
- 20 pesticida o fragmento pesticida de esta y se hibrida con la segunda secuencia de nucleótidos. En dicho caso, la segunda secuencia de nucleótidos puede ser cualquiera de las secuencias de nucleótidos que se presentan en la SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7 o SEQ ID NO:9
- 25 en condiciones de hibridación rigurosas. Las secuencias codificantes de nucleótidos se hibridan entre sí en

condiciones de hibridación apropiadas, como condiciones de hibridación rigurosas, y las proteínas codificadas por estas secuencias de nucleótidos reaccionan de manera cruzada con antisuero generado contra cualquiera de las

5 otras proteínas. Las condiciones de hibridación rigurosas, como se definen en la presente, comprenden al menos hibridación a 42 °C seguido de dos lavados durante cinco minutos a temperatura ambiente con SSC 2X, SDS al 0.1 %, seguido de dos lavados durante treinta minutos cada uno a

10 65°C en SSC 0.5X, SDS al 0.1 %. Los lavados a temperaturas aun mayores constituyen condiciones incluso más exigentes, por ejemplo, las condiciones de hibridación de 68 °C, seguidas por lavado a 68 °C, en 2xSSC que contiene SDS al 0.1 %.

15 Un experto en la técnica reconocerá que, debido a la redundancia del código genético, muchas otras secuencias pueden codificar dichas proteínas relacionadas, y estas secuencias, en la medida en que funcionen para expresar proteínas pesticidas en cepas de *Bacillus* o en células

20 vegetales, son modalidades de la presente invención, reconociendo obviamente que muchas de dichas secuencias de codificación redundantes no se hibridarán en estas condiciones con las secuencias naturales de *Bacillus* que codifican TIC4472, TIC4472PL, TIC1425, TIC2613 y TIC2613PL.

25 La presente solicitud contempla el uso de estos y otros métodos de identificación conocidos por los expertos en la

técnica para identificar secuencias que codifican proteínas TIC4472, TIC1425 y TIC2613 y secuencias con un porcentaje de identidad sustancial con respecto a las secuencias que codifican las proteínas TIC4472, TIC1425 y TIC2613.

5 La presente descripción también contempla el uso de métodos moleculares conocidos en la técnica para modificar genéticamente y clonar proteínas útiles a nivel comercial que comprenden quimeras de proteínas de proteínas pesticidas; por ejemplo, las quimeras se pueden ensamblar

10 de segmentos de proteínas TIC4472, TIC4472PL, TIC1425, TIC2613 o TIC2613PL para derivar modalidades útiles adicionales que incluyen ensamblaje de segmentos de proteínas TIC4472, TIC4472PL, TIC1425, TIC2613 y TIC2613PL con segmentos de diversas proteínas diferentes de TIC4472,

15 TIC4472PL, TIC1425, TIC2613 y TIC2613PL y proteínas relacionadas. Las proteínas TIC4472, TIC4472PL, TIC1425, TIC2613 y TIC2613PL se pueden someter a alineación entre sí y con otras proteínas de *Bacillus thuringiensis* u otras proteínas pesticidas (ya sea que estén muy o poco

20 relacionadas de forma filogenética) y se pueden identificar segmentos de cada proteína útiles para la sustitución entre las proteínas alineadas, provocando la construcción de proteínas quiméricas. Dichas proteínas quiméricas se pueden someter a análisis de ensayo biológico de plagas y

25 caracterizarse según la presencia o ausencia de un aumento de la bioactividad o un espectro de plagas diana expandido

en comparación con las proteínas de origen de las cuales deriva cada segmento en la quimera. La actividad pesticida de los polipéptidos se puede modificar genéticamente de forma adicional para la actividad para una plaga específica o para un amplio espectro de plagas mediante el intercambio de dominios o segmentos con otras proteínas o mediante el uso de métodos de evolución dirigidos conocidos en la técnica.

También se describen en la presente solicitud métodos para controlar insectos, en particular, infestaciones de lepidópteros de plantas de cultivo, con las proteínas TIC4472, TIC4472PL, TIC1425, TIC2613 y TIC2613PL. Dichos métodos pueden comprender cultivar una planta que comprende una cantidad inhibidora de lepidópteros o insectos de una proteína de toxina TIC4472, TIC4472PL, TIC1425, TIC2613 y TIC2613PL. En determinadas modalidades, dichos métodos pueden comprender además uno o más de: (i) aplicar cualquier composición que comprende o codifica una proteína de toxina TIC4472, TIC4472PL, TIC1425, TIC2613 y TIC2613PL a una planta o una semilla que produce una planta; y (ii) transformar una planta o una célula vegetal que produce una planta con un polinucleótido que codifica una proteína de toxina TIC4472, TIC4472PL, TIC1425, TIC2613 y TIC2613PL. En general, se contempla que una proteína de toxina TIC4472, TIC4472PL, TIC1425, TIC2613 y TIC2613PL puede proporcionarse en una composición, en un microorganismo o

en una planta transgénica, para conferir una actividad inhibidora de insectos contra insectos lepidópteros.

En determinadas modalidades, una molécula de ácido nucleico recombinante de las proteínas de toxina TIC4472, TIC4472PL,

5 TIC1425, TIC2613 y TIC2613PL es el ingrediente activo como insecticida de una composición inhibidora de insectos preparada mediante el cultivo de *Bacillus* recombinante o cualquier otra célula bacteriana recombinante transformada para expresar una proteína de toxina TIC4472, TIC4472PL,

10 TIC1425, TIC2613 y TIC2613PL en condiciones adecuadas para expresar la proteína de toxina TIC4472, TIC4472PL, TIC1425, TIC2613 y TIC2613PL. Dicha composición puede prepararse mediante desecación, liofilizado, homogenización, extracción, filtrado, centrifugado, sedimentación o

15 concentración de un cultivo de dichas células recombinantes que expresan/producen dicho polipéptido recombinante. Dicho proceso puede producir un *Bacillus* u otro extracto de célula bacteriana entomopatógena, suspensión celular, homogenato celular, lisado celular, sobrenadante celular,

20 filtrado celular o sedimento celular. Al obtener los polipéptidos recombinantes así producidos, una composición que incluye los polipéptidos recombinantes pueden incluir células bacterianas, esporas bacterianas y cuerpos de inclusión parasporales y se pueden formular para varios

25 usos, incluyendo productos en spray inhibidores de insectos agrícolas o como formulaciones inhibidoras de insectos en

bioensayos dietarios.

En una modalidad, para reducir la posibilidad de desarrollo de resistencia, una composición inhibidora de insectos que comprende TIC4472, TIC4472PL, TIC1425, TIC2613 y TIC2613PL

5 además puede comprender al menos un polipéptido adicional que presenta actividad inhibidora de insectos contra la misma especie de insectos lepidópteros, pero que es diferente de la proteína de toxina TIC4472, TIC4472PL, TIC1425, TIC2613 y TIC2613PL. Algunos polipéptidos

10 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

15 estadounidense 2006/0021087 A1). Dicho polipéptido adicional para el control de plagas de lepidópteros puede seleccionarse del grupo que consiste en una proteína inhibidora de insectos, tal como, entre otras, Cry1A (patente estadounidense n.º 5,880,275), Cry1Ab, Cry1Ac,

20 Cry1A.105, Cry1Ae, Cry1B (publicación de patente estadounidense n.º 10/525,318), Cry1C (patente estadounidense n.º 6,033,874), Cry1D, Cry1Da y variantes de estas, Cry1E, Cry1F, y quimeras Cry1A/F (patentes estadounidenses n.º 7,070,982; 6,962,705; y 6,713,063),

25 Cry1G, Cry1H, Cry1I, Cry1J, Cry1K, Cry1L, quimeras tipo Cry1 tales como, entre otras, 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.º 7,064,249), Cry2Ae, Cry4B, Cry6, Cry7,
 5 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
 10 (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),
 15 AXMI-184 (publicación de patente estadounidense 2010-
 0004176 A1), AXMI-196, AXMI-204, AXMI-207, axmi209
 (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-
 20 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),
 25 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 esta (publicación de patente
5 estadounidense 2014-0033361 A1), AfIP-1B y derivados de
esta (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
10 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 esta
15 (publicación de patente estadounidense 2012-0233726 A1),
GS153 y derivados de esta (publicación de patente
estadounidense 2012-0192310 A1), GS154 y derivados de esta
(publicación de patente estadounidense 2012-0192310 A1),
GS155 y derivados de esta (publicación de patente
20 estadounidense 2012-0192310 A1), SEQ ID NO:2 y derivados de
esta tal como se describen en la publicación de patente
estadounidense 2012-0167259 A1, SEQ ID NO:2 y derivados de
esta tal como se describen en la publicación de patente
estadounidense 2012-0047606 A1, SEQ ID NO:2 y derivados de
25 esta tal como se describen en la publicación de patente
estadounidense 2011-0154536 A1, SEQ ID NO:2 y derivados de

esta tal como se describen en la publicación de patente
estadounidense 2011-0112013 A1, SEQ ID NO:2 y 4 y derivados
de esta tal como se describen en la publicación de patente
estadounidense 2010-0192256 A1, SEQ ID NO:2 y derivados de
5 esta tal como se describen en la publicación de patente
estadounidense 2010-0077507 A1, SEQ ID NO:2 y derivados de
esta tal como se describen en la publicación de patente
estadounidense 2010-0077508 A1, SEQ ID NO:2 y derivados de
esta tal como se describen en la publicación de patente
10 estadounidense 2009-0313721 A1, SEQ ID NO:2 o 4 y derivados
de esta tal como se describen en la publicación de patente
estadounidense 2010-0269221 A1, SEQ ID NO:2 y derivados de
esta tal como se describen en la patente estadounidense n.º
7,772,465 (B2), CF161_0085 y derivados de esta tal como se
15 describen en WO2014/008054 A2, proteínas tóxicas de
lepidópteros y derivados de estas tal como se describen en
las publicaciones de patentes estadounidenses US2008-
0172762 A1, US2011-0055968 A1 y US2012-0117690 A1; SEQ ID
NO:2 y derivados de esta tal como se describen en
20 US7510878(B2), SEQ ID NO:2 y derivados de esta tal como se
describen en la patente estadounidense n.º 7812129(B1), y
similares.

En otras modalidades, dicha composición/formulación puede
comprender adicionalmente al menos un polipéptido adicional
25 que exhibe la actividad inhibidora de insectos que no se
inhibe por una proteína de otra forma inhibidora de

insectos de la presente invención para expandir el espectro de la inhibición de insectos obtenida. Por ejemplo, para el control de plagas de hemípteros, se pueden utilizar combinaciones de proteínas inhibidoras de insectos de la presente invención con proteínas activas de hemípteros tales como TIC1415 (publicación de patente estadounidense 2013-0097735 A1), TIC807 (patente estadounidense n.º 8609936), TIC834 (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). Además, un polipéptido para el control de plagas de coleópteros puede seleccionarse del grupo que consiste en una proteína inhibidora de insectos, tal como, de modo no taxativo, Cry3Bb (patente estadounidense n.º 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), axmi207 (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.º 2010/0017914), IP3
5 y variantes de este (publicación de patente estadounidense 2012-0210462 A1) y ω -Hexatoxin-Hv1a (publicación de solicitud de patente estadounidense US2014-0366227 A1).

Otros polipéptidos para el control de plagas de insectos coleópteros, lepidópteros y hemípteros pueden encontrarse
10 en el sitio web de nomenclatura de toxinas de *Bacillus thuringiensis* mantenido por Neil Crickmore (en la web, en btnomenclature.info).

En la técnica se ha documentado la posibilidad de que de los insectos desarrollen resistencia a determinados
15 insecticidas. Una estrategia de manejo de 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, cualesquiera insectos con resistencia a uno de los agentes
20 inhibidores de insectos pueden ser controlados por el otro agente inhibidor de insectos. Otra estrategia de manejo de resistencia a insectos emplea el uso de plantas que no están protegidas contra la especie de plaga de lepidópteros diana para proporcionar un refugio para dichas plantas
25 desprotegidas. Un ejemplo específico se describe en la patente estadounidense N.º 6.551.962, el cual se incorpora

mediante referencia en su totalidad.

Otras modalidades tales como las sustancias químicas
pesticidas aplicadas tópicamente que se diseñan para
controlar plagas que también se controlan por las proteínas
5 descritas en la presente que se utilizan con las proteínas
en tratamientos de semillas, formulaciones de rociado,
goteo, limpieza que se pueden aplicar directamente al suelo
(suelo empapado), se pueden aplicar a plantas en
crecimiento que expresan las proteínas descritas en la
10 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 su uso en
tratamientos de semillas se pueden aplicar con varios
adhesivos y adherentes conocidos en la técnica. Dichas
15 formulaciones pueden contener pesticidas con un modo de
acción sinérgico con las proteínas descritas, de modo que
los pesticidas de la formulación actúan a través de un modo
de acción diferente para controlar las mismas plagas o
plagas similares que se pueden controlar mediante las
20 proteínas descritas, o que dichos pesticidas actúan para
controlar las plagas dentro de un rango de hospedadores más
amplio o especies de plagas de plantas que no se controlan
de manera eficaz mediante las proteínas pesticidas TIC4472,
TIC4472PL, TIC1425, TIC2613 y TIC2613PL.

25 La composición/formulación mencionada anteriormente puede
comprender además un portador aceptable desde el punto de

vista agrícola, por ejemplo, un cebo, un polvo, arena, sedimento, gránulo, aerosol, emulsión, una suspensión coloidal, una solución acuosa, una preparación de esporas/cristal de *Bacillus*, un tratamiento de semillas, una célula vegetal/tejido vegetal/semilla/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 de inhibición de insectos o inhibición insecticida inherente en el polipéptido recombinante y el nivel de formulación que se debe aplicar a un ensayo de dieta o planta, la composición/formulación puede incluir diversas 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.

En virtud de lo anterior, los entendidos en la técnica reconocerán que pueden realizarse muchos cambios a los aspectos específicos descritos y aun así obtener un resultado parecido o similar sin apartarse del espíritu y alcance de la invención. Por ende, los detalles estructurales y funcionales específicos descritos en la presente no deben interpretarse como limitantes. Debería entenderse que la divulgación completa de cada referencia citada en la presente se incorpora a la divulgación de la presente solicitud.

EJEMPLOS**Ejemplo 1****Descubrimiento, clonación y expresión de TIC4472, TIC1425 y
TIC2613**

5 Se identificaron, clonaron, se confirmó la secuencia y se analizaron en ensayo biológico de insectos secuencias codificantes de tres proteínas pesticidas de *Bacillus thuringiensis* novedosas. Las proteínas pesticidas, TIC4472, TIC1425 y TIC2613, aisladas de las cepas de *Bacillus*
10 *thuringiensis* EG10742, EG10731 y EG5408, respectivamente, representan proteínas tipo Cry1Ca novedosas.

Los cebadores de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se diseñaron para amplificar una copia de longitud completa de la región codificante para TIC4472, TIC1425 y
15 TIC2613 de ADN genómico total aislado de las cepas de *Bacillus thuringiensis* EG10742, EG10731 y EG5408, respectivamente. Los amplicones de PCR también incluyen codones de inicio y terminación de la traducción de cada secuencia codificante.

20 Se clonó cada uno de los amplicones utilizando métodos conocidos en la técnica en vectores de expresión de *Bt* (*Bacillus thuringiensis*) en unión operativa con un promotor de expresión de *Bt*.

Ejemplo 2

TIC4472, TIC1425 y TIC2613 demuestran actividad de lepidópteros en ensayo biológico de insectos

Se evaluó la bioactividad de las proteínas pesticidas
5 TIC4472, TIC1425 y TIC2613 mediante la producción de la
proteína en un hospedador de expresión de *Bt*. Se cultivó
una cepa de *Bt* que expresa TIC4472, TIC1425 y TIC2613
durante veinticuatro (24) horas y después se le añadió una
preparación de cristal de esporas o proteínas solubilizada
10 a la dieta de los insectos. Se evaluó la mortalidad y el
debilitamiento comparando el crecimiento y desarrollo de
insectos con una dieta del cultivo de la cepa de *Bt* que
expresa TIC4472, TIC1425 y TIC2613 con insectos con una
dieta de un cultivo de control no tratado.

15 Se analizaron las preparaciones de TIC4472 contra las
especies de lepidópteros gusano elotero (dos colonias (CEW
y CEWUC), *Helicoverpa zea*, también denominado en la
presente gusano de algodón y gusano de la soja), gusano
medidor de la hoja del algodonero (CLW, *Alabama*
20 *argillacea*), taladro del maíz (ECB, *Ostrinia nubilalis*),
cogollero del maíz (FAW, *Spodoptera frugiperda*), lagarta
verde (SBL, *Chrysodeixis includens*), gusano meridional
(SAW, *Spodoptera eridania*), barrenador del maíz del
suroeste (SWCB, *Diatraea grandiosella*), barrenador de la
25 caña de azúcar (SCB, *Diatraea saccharalis*), una colonia
resistente a Cry2Ab de barrenador de la caña de azúcar

(SCB2R), oruga del tabaco (TBW, *Heliothis virescens*) y oruga del frijol terciopelo (VBW, *Anticarsia gemmatalis*); las especies de coleópteros escarabajo de patata de Colorado (CPB, *Leptinotarsa decemlineata*) y gusano de la

5 raíz del maíz (WCB, *Diabrotica virgifera virgifera*); y las especies de hemípteros chinche de la hoja (TPB, *Lygus lineolaris*), chinche de la hoja occidental (WTP, *Lygus hesperus*); y la especie de dípteros mosquito de la fiebre amarilla (*Aedes aegypti*). Se analizaron las preparaciones

10 de TIC1425 contra las especies de lepidópteros gusano cortador grasiento (BCW, *Agrotis ipsilon*), gusano medidor de la hoja del algodnero (CLW, *Alabama argillacea*), taladro del maíz (ECB, *Ostrinia nubilalis*), cogollero del maíz (FAW, *Spodoptera frugiperda*), gusano cortador grasiento

15 (BCW, *Agrotis ipsilon*), barrenador del maíz del suroeste (SWCB, *Diatraea grandiosella*) y barrenador de la caña de azúcar (SCB, *Diatraea saccharalis*); y las especies de coleópteros gusano de la raíz del maíz (WCB, *Diabrotica virgifera virgifera*) y gusano de la raíz del maíz del sur

20 (*Diabrotica undecimpunctata howardi*). Se analizaron las preparaciones de TIC2613 contra las especies de lepidópteros gusano elotero (dos colonias (CEW y CEWUC), *Helicoverpa zea*, también denominado en la presente gusano de algodón y gusano de la soja), gusano medidor de la hoja

25 del algodnero (CLW, *Alabama argillacea*), taladro del maíz (ECB, *Ostrinia nubilalis*), cogollero del maíz (FAW,

Spodoptera frugiperda), lagarta verde (SBL, *Chrysodeixis*
includens), gusano meridional (SAW, *Spodoptera eridania*),
 gusano cortador grasiento (BCW, *Agrotis ipsilon*),
 barrenador del maíz del suroeste (SWCB, *Diatraea*
 5 *grandiosella*), oruga del tabaco (TBW, *Heliothis virescens*)
 y oruga del frijol terciopelo (VBW, *Anticarsia gemmatalis*);
 las especies de coleópteros escarabajo de patata de
 Colorado (CPB, *Leptinotarsa decemlineata*); gusano de la
 raíz del maíz (WCB, *Diabrotica virgifera virgifera*) y
 10 gusano de la raíz del maíz del sur (*Diabrotica*
undecimpunctata howardi); y las especies de hemípteros
 chinche de la hoja (TPB, *Lygus lineolaris*), chinche de la
 hoja occidental (WTP, *Lygus hesperus*).

La actividad de ensayo biológico observada para cada
 15 proteína cultivada en el hospedador de *Bt* se presenta en
 las tablas 3 y 4 abajo, en donde "+" indica actividad, "NT"
 indica que la toxina no se evaluó contra esa plaga de
 insectos específica, "S" indica debilitamiento y "M" indica
 mortalidad. Las preparaciones de TIC4472, TIC1425 y TIC2613
 20 no demostraron actividad contra las plagas de insectos
 coleópteros o hemípteros evaluadas para cada proteína.
 TIC4472 también demostró actividad contra el mosquito de la
 fiebre amarilla (*Aedes aegypti*). Las tres toxinas
 demostraron resistencia a múltiples plagas de insectos
 25 lepidópteros tal como se muestra en las tablas 3 y 4.

Tabla 3. Actividad en ensayo biológico de TIC4472, TIC1425 y TIC2613 contra plagas de insectos.

Toxina	CEW		CEWUC		CLW		ECB		FAW		SBL		SAW	
	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M
TIC4472	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+
TIC1425	NT	NT				+	+	+	+		NT	NT		
TIC2613	+				+	+	+	+	+	+	+	+	+	

Tabla 4. Actividad en ensayo biológico de TIC4472, TIC1425 y TIC2613 contra plagas de insectos.

Toxina	BCW		SCB		SCB2R		SWCB		TBW		VBC		YFM	
	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M
TIC4472	NT	NT	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+
TIC1425				+	NT	NT		+	NT	NT	NT	NT	NT	NT
TIC2613			+	+	NT	NT	+	+	+		+		NT	NT

Tal como se puede observar en las tablas 3 y 4 arriba, la toxina de insectos TIC4472 demostró actividad contra todas las plagas de insectos lepidópteros evaluadas (CEW, CEWUC, CLW, ECB, FAW, SBL, SAW, SCB, SCB2R, SWCB, TBW y VBC); así como YFM. La toxina de insectos TIC1425 demostró actividad contra CLW, ECB, FAW, SCB y SWCB. La toxina de insectos TIC2613 demostró actividad contra CEW, CLW, ECB, FAW, SBL, SAW, SCB, SWCB, TBW y VBC. No se observó actividad para TIC1425 y TIC2613 cuando se evaluaron contra BCW.

En una serie de experimentos separada, se evaluaron preparaciones de proteína de TIC4472 utilizando un ensayo de dieta superpuesta contra las plagas de insectos lepidópteros gusano soldado (BAW, *Spodoptera exigua*), gusano rosado (PBW, *Pectinophora gossypiella*), gusano

rosado resistente a Cry1Ac (PBW_Cry1Ac^r, *Pectinophora gossypiella*), oruga del viejo mundo (OWB, *Helicoverpa armigera*), gusano defoliador (OLW, *Spodoptera litura*) y gusano moteado (SBW, *Earias vittella*). La tabla 5 muestra la actividad observada contra cada una de estas plagas de insectos lepidópteros evaluada en el ensayo de dieta superpuesta, en donde "+" indica actividad.

Tabla 5. Actividad en ensayo biológico de TIC4472 contra plagas de insectos lepidópteros.

Plaga de insectos lepidópteros					
BAW	PBW	PBW_Cry1Ac ^r	OWB	OLW	SBW
+	+	+	+	+	+

Tal como se puede observar en la tabla 5 arriba, TIC4472 demostró actividad contra todas las plagas de insectos lepidópteros evaluadas en el ensayo biológico de dieta superpuesta, incluida la colonia resistente a Cry1Ac de gusano rosado.

Tal como se demuestra en las tablas 3-5, TIC4472, TIC1425 y TIC2613 demostró actividad en un intervalo amplio de especies de plagas de insectos lepidópteros.

Ejemplo 3

Diseño de secuencias de codificación sintéticas que codifican TIC4472PL y TIC2613PL para la expresión en células vegetales

Las secuencias codificantes sintéticas se construyeron para su uso en la expresión de la proteína codificada en

plantas, se clonaron en vectores de transformación de planta binarios y se utilizaron para transformar células vegetales. Las secuencias sintéticas se sintetizaron de acuerdo con métodos descritos generalmente en la patente estadounidense 5,500,365, evitando determinadas secuencias problemáticas perjudiciales, tales como secuencias de poliadenilación de plantas ricas en A/T y ATTTA. Las secuencias de codificación sintéticas codifican las proteínas TIC4472PL y TIC2613PL que comprenden un residuo de alanina adicional inmediatamente después de la metionina de inicio con respecto a las proteínas TIC4472 y TIC2613, respectivamente. El residuo de alanina adicional se incorpora en la secuencia de codificación sintética para mejorar la expresión de la proteína de toxina de insectos.

La secuencia de codificación sintética que codifica TIC4472PL (SEQ ID NO:4) se presenta en la presente como SEQ ID NO:3. La secuencia de codificación sintética que codifica TIC2613PL (SEQ ID NO:10) se presenta como SEQ ID NO:9. Las secuencias de codificación sintéticas se utilizaron en los vectores de transformación de plantas binarios para generar plantas transgénicas que expresan las proteínas TIC4472PL y TIC2613PL y se evaluaron en cuanto a la actividad contra las plagas de insectos lepidópteros.

Ejemplo 4**Ensayo de actividad de TIC4472PL contra plagas de lepidópteros en plantas de algodón transformadas de manera estable**

5 Los vectores de transformación de plantas binarios que comprenden casetes de transgen diseñados para expresar la proteína pesticida TIC4472PL no dirigida se clonaron usando métodos conocidos en la técnica. Los vectores resultantes se utilizaron para transformar las plantas de algodón de
10 manera estable. Los tejidos se cosecharon a partir de los transformantes y se utilizaron en ensayo biológico de insectos contra varias plagas de insectos lepidópteros. Las secuencias codificantes sintéticas se construyeron para su uso en la expresión de la proteína codificada en
15 plantas, se clonaron en un vector de transformación de planta binario y se utilizaron para transformar células vegetales de algodón. Los vectores de transformación de plantas resultantes comprendían un primer casete de transgen para la expresión de la proteína pesticida
20 TIC4472PL que comprendía un promotor constitutivo, unido operativamente 5' con un líder, unido operativamente 5' con una secuencia codificante sintética que codifica una proteína TIC4472PL no dirigida, que a su vez estaba unida operativamente 5' a 3' UTR; y un segundo casete de transgen
25 para la selección de células vegetales transformadas usando selección de espectinomicina.

Se construyeron tres construcciones de vectores de transformación de planta binarios tal como se describió arriba y comprendían diferentes promotores constitutivos. Dos construcciones, la construcción 1 y la construcción 3 también comprendían una secuencia de intrones que estaba unida operativamente 3' al líder y 5' a la secuencia de codificación sintética que codifica una proteína TIC4472PL no dirigida. La construcción 2 carecía de intrones. Se transformaron plantas de algodón con los tres vectores de transformación binarios diferentes utilizando un método de transformación mediado por *Agrobacterium*. Se indujeron las células transformadas para formar plantas por métodos conocidos en la técnica. Los ensayos biológicos que utilizan discos de hojas vegetales se llevaron a cabo de forma análoga a aquellos descritos en la patente estadounidense n.º 8,344,207. Se colocó una única larva neonata recién eclosionada de menos de un día de edad en cada muestra de disco de hoja y se dejó que se alimente durante aproximadamente cuatro días. Se utilizó una planta de algodón no transformada para obtener tejido que se usará como control negativo. Se evaluaron múltiples eventos de inserción de copia única R₀ de transformación de cada vector binario contra el gusano de algodón (CBW, *Helicoverpa zea*), cogollero del maíz (FAW, *Spodoptera frugiperda*), lagarta verde (SBL, *Chrysodeixis includens*) y oruga del tabaco (TBW, *Heliothis virescens*). Se aplicaron

al evento los puntajes de calificación de daño de la hoja (LDR) que oscilaban entre uno (1) y cuatro (4). Los puntajes de LDR se basan en el porcentaje de daño observado para cada disco de hoja. La tabla 6 abajo muestra los puntajes de LDR y el intervalo correspondiente de daño porcentual asociado con cada puntaje. Para los puntajes de LDR de uno (1), también se evaluó la penetrancia del rasgo. La penetrancia alta (según lo indicado por "(H)") se define como que más del cincuenta (50) por ciento de los eventos evaluados para cada construcción tiene el diez (10) por ciento o menos de daño de la hoja. La penetrancia baja (según lo indicado por "(L)") se define como que el cincuenta (50) por ciento o menos de los eventos evaluados para cada construcción tiene el diez (10) por ciento o menos de daño de la hoja. La penetrancia no se aplica a los puntajes de LDR mayores que uno (1).

Tabla 6. Puntajes de calificación de daño de la hoja (LDR) de algodón y daño porcentual y penetrancia correspondientes.

Puntaje de LDR	Intervalo de calificación de daño de la hoja (LDR)	Penetrancia
1	LDR $\leq$ 10%	Alta = > 50% de eventos
1		Baja = < 50% de eventos
2	10% < LDR $\leq$ 17.5%	n/a
3	17.5% < LDR $\leq$ 35%	n/a
4	LDR > 35%	n/a

Los puntajes de calificación de daño de la hoja para las

plantas de algodón R₀ transformadas que expresan TIC4472PL se expresan en la tabla 7 abajo. La cantidad de eventos que demuestran el puntaje de LDR de la cantidad total de eventos evaluados se muestra entre paréntesis, seguido de la penetrancia para los puntajes de LDR de uno (1).

Tabla 7. Puntajes de calificación de daño de la hoja (LDR), cantidad de eventos que demuestran la LDR y la penetrancia para las plantas de algodón R₀ transformadas que expresan TIC4472PL.

Construcción	CBW	FAW	SBL	TBW
Construcción 1	3 (1/25)	2 (2/25)	1 (25/25) H	1 (24/25) H
Construcción 2	3 (3/25)	2 (1/25)	1 (24/25) H	1 (16/25) H
Construcción 3	4 (23/23)	1 (1/23) L	1 (21/23) H	1 (6/23) L

Las plantas de algodón R₀ transformadas que expresan TIC4472PL fueron altamente eficaces (definidas como con el diez por ciento de daño de la hoja o menos) contra SBL y TBW tal como se muestra en la tabla 7. También se observó actividad contra CBW y FAW en diversos eventos.

Se seleccionaron eventos de algodón R₁ de las plantas de algodón R₀ transformadas evaluadas arriba y se utilizaron en un ensayo de disco de hoja contra FAW, SBL y TBW. La tabla 8 muestra los puntajes de calificación de daño de la hoja para las plantas de algodón R₁ transformadas que

expresan TIC4472PL.

Tabla 8. Puntajes de calificación de daño de la hoja (LDR), cantidad de eventos que demuestran la LDR y la penetrancia para las plantas de algodón R₁ transformadas que expresan

5 TIC4472PL.

Construcción	FAW	SBL	TBW
Construcción 1	1 (3/4) H	1 (4/4) H	1 (4/4) H
Construcción 2	1 (1/4) L	1 (4/4) H	1 (1/4) L

Tal como se puede observar en la tabla 8 arriba, los

10 eventos seleccionados mostraron eficacia alta contra FAW, SBL y TBW. La penetrancia fue alta para los eventos transformados con la construcción 1 para las tres especies de plagas de insectos. Con respecto a los eventos transformados con la construcción 2, la penetrancia fue

15 alta para SBL.

Lo que antecede demuestra que las plantas de algodón transformadas que expresan la proteína TIC4472PL proporcionan resistencia al cogollero del maíz (FAW, *Spodoptera frugiperda*), la lagarta verde (SBL, *Chrysodeixis*

20 *includens*) y la oruga del tabaco (TBW, *Heliothis virescens*).

Ejemplo 5

Ensayo de actividad de TIC4472PL y TIC2613PL contra plagas de lepidópteros en plantas de soja transformadas de manera

25 estable

Un vector de transformación de planta binario que comprende

un casete de transgen diseñado para expresar una proteína
pesticida no dirigida TIC2613PL o TIC4472PL dirigida a
plástidos se clonó utilizando métodos conocidos en la
técnica. El vector resultante se utilizó para transformar
5 plantas de soja de manera estable. Los tejidos se
cosecharon a partir de los transformantes y se utilizaron
en ensayo biológico de insectos contra varias plagas de
insectos lepidópteros.

Las secuencias codificantes sintéticas diseñadas para la
10 expresión de la planta que se describen en el ejemplo 3 se
clonaron en construcciones de vectores de transformación de
plantas binarios, y se utilizaron para transformar células
vegetales de soja. Se construyeron tres construcciones de
vectores binarios utilizando métodos conocidos en la
15 técnica para expresar TIC4472PL dirigida a plástidos y no
dirigida. La construcción 4 comprendía un primer casete de
transgen para la expresión de TIC4472PL no dirigida que
comprende un promotor constitutivo, unido operativamente 5'
con un líder, unido operativamente 5' con una secuencia
20 codificante sintética que codifica una proteína TIC4472PL
no dirigida, que a su vez estaba unida operativamente 5' a
3' UTR; y un segundo casete de transgen para la selección
de células vegetales transformadas usando selección de
espectinomicina. La construcción 5 comprendía un primer
25 casete de transgen para la expresión de TIC4472PL dirigida
que comprende un promotor constitutivo, unido

operativamente 5' con un líder, unido operativamente 5' con un intrón, unido operativamente 5' con una secuencia codificante sintética que codifica una proteína TIC4472PL dirigida a plástidos, que a su vez estaba unida
5 operativamente 5' a 3' UTR; y un segundo casete de transgen para la selección de células vegetales transformadas usando selección de espectinomicina. La construcción 6 comprendía un primer casete de transgen para la expresión de TIC4472PL no dirigida que comprende un promotor constitutivo, unido
10 operativamente 5' con un líder, unido operativamente 5' con un intrón, unido operativamente 5' con una secuencia codificante sintética que codifica una proteína TIC4472PL no dirigida, que a su vez estaba unida operativamente 5' a 3' UTR; y un segundo casete de transgen para la selección
15 de células vegetales transformadas usando selección de espectinomicina.

Se construyeron dos construcciones de vectores binarios utilizando métodos conocidos en la técnica para expresar TIC2613PL no dirigida. La construcción 7 comprendía un
20 primer casete de transgen para la expresión de TIC2613PL no dirigida que comprende un promotor constitutivo, unido operativamente 5' con un líder, unido operativamente 5' con una secuencia codificante sintética que codifica una proteína TIC2613PL no dirigida, que a su vez estaba unida
25 operativamente 5' a 3' UTR; y un segundo casete de transgen para la selección de células vegetales transformadas usando

selección de espectinomicina. La construcción 8 comprendía un primer casete de transgen para la expresión de TIC2613PL no dirigida que comprende un promotor constitutivo, unido operativamente 5' con un líder, unido operativamente 5' con un intrón, unido operativamente 5' con una secuencia codificante sintética que codifica una proteína TIC2613PL no dirigida, que a su vez estaba unida operativamente 5' a 3' UTR; y un segundo casete de transgen para la selección de células vegetales transformadas usando selección de espectinomicina.

Se utilizaron las construcciones de vectores de transformación binarios resultantes para transformar las células de soja utilizando un método de transformación mediada por *Agrobacterium*. Se indujeron las células de soja transformadas para formar plantas por métodos conocidos en la técnica. Los ensayos biológicos que utilizan discos de hojas vegetales se llevaron a cabo de forma análoga a aquellos descritos en la patente estadounidense n.º 8,344,207. Se utilizó una planta de soja no transformada para obtener tejido que se usará como control negativo. Se evaluaron múltiples eventos de transformación de soja R₀ derivados de los vectores binarios contra el gusano meridional (SAW, *Spodoptera eridania*), la lagarta verde (SBL, *Chrysodeixis includens*) y gusano de la soja (SPW, *Helicoverpa zea*). Los puntajes de calificación de daño de la hoja (LDR) fueron similares a aquellos para el algodón,

pero difirieron en el intervalo de daño porcentual utilizado para determinar el puntaje. Los puntajes de calificación de daño de la hoja y su intervalo de calificación de daño de la hoja porcentual correspondiente se presentan en la tabla 9 abajo.

Tabla 9. Puntajes de calificación de daño de la hoja (LDR) de soja e intervalo de daño porcentual correspondiente.

Puntaje de LDR	Intervalo de calificación de daño de la hoja (LDR)
1	$LDR \leq 20\%$
2	$20\% < LDR \leq 35\%$
3	$35\% < LDR \leq 70\%$
4	$LDR > 70\%$

Los puntajes de calificación de daño de la hoja para las plantas de algodón R₀ transformadas que expresan TIC4472PL y TIC2613PL se expresan en la tabla 10 abajo. La cantidad de eventos que demuestran el puntaje de LDR de la cantidad total de eventos evaluados se muestra entre paréntesis.

Tabla 10. Puntajes de calificación de daño de la hoja (LDR) y cantidad de eventos que demuestran la LDR para las plantas de soja R₀ transformadas que expresan TIC4472PL y TIC2613PL.

Toxina	Construcción	SAW	SBL	SPW
TIC4472PL	Construcción 4	1 (23/29)	1 (29/29)	3 (8/29)
TIC4472PL	Construcción 5	1 (20/29)	1 (28/29)	1 (1/29)
TIC4472PL	Construcción 6	1 (10/29)	1 (15/15)	3 (3/15)
TIC2613PL	Construcción 7	1 (22/30)	1 (24/30)	3 (1/30)
TIC2613PL	Construcción 8	1 (14/25)	1 (22/25)	2 (2/25)

Tal como se puede observar en la tabla 10 arriba, la

expresión de TIC4472PL y TIC2613PL demostró eficacia alta contra SAW y SBL. La actividad fue inferior para ambas proteínas contra SPW.

Se seleccionaron eventos de soja R₁ de las plantas de soja R₀ transformadas que expresan TIC4472PL y TIC2613PL evaluados arriba y se utilizaron en un ensayo de disco de hoja contra SAW, SBL y SPW. También se evaluó un evento de soja R₁ que expresa TIC4472PL contra la oruga del frijol terciopelo (VBW, *Anticarsia gemmatalis*). La tabla 11 muestra los puntajes de calificación de daño de la hoja para las plantas de soja R₁ transformadas que expresan TIC4472PL y TIC2613PL.

Tabla 11. Puntajes de calificación de daño de la hoja (LDR) y cantidad de eventos que demuestran la LDR para las plantas de soja R₁ transformadas que expresan TIC4472PL y TIC2613PL.

Toxina	Construcción	SAW	SBL	SPW	VBC
TIC4472PL	Construcción 5	1 (3/8)	1 (5/8)	3 (2/8)	
TIC4472PL	Construcción 6	1 (1/9)	1 (6/9)	3 (1/9)	1 (3/9)
TIC2613PL	Construcción 8	2 (2/10)	1 (9/10)	4 (4/10)	

20

Tal como se puede observar en la tabla 11, una serie de eventos de soja R₁ transformados con TIC4472PL demostró eficacia alta contra SAW y SBL. Además, varios eventos de soja R₁ transformados utilizando la construcción 6 demostraron eficacia alta contra VBC. Los eventos de soja R₁ transformados con TIC2613PL demostraron eficacia alta

25

contra SBL.

Lo que antecede demuestra que las plantas de soja transformadas que expresan TIC4472PL o TIC2613PL proporcionan resistencia a los insectos lepidópteros, en particular el gusano meridional (*Spodoptera eridania*), la lagarta verde (*Chrysodeixis includens*) y la oruga del frijol terciopelo (*Anticarsia gemmatalis*).

Ejemplo 6

Ensayo de actividad de TIC4472PL y TIC2613PL contra plagas de lepidópteros en plantas de maíz transformadas de manera estable

Los vectores de transformación de plantas binarios que comprenden casetes de transgen diseñados para expresar la proteína pesticida TIC4472PL o TIC2613PL tanto dirigida a plástidos como no dirigida se clonan usando métodos conocidos en la técnica. Los vectores resultantes se usan para transformar plantas de maíz de manera estable. Los tejidos se cosechan a partir de los transformantes y se usan en ensayo biológico de insectos contra varias plagas de insectos lepidópteros.

La secuencia codificante sintética que codifica la proteína TIC4472PL (SEQ ID NO:3) o TIC2613 (SEQ ID NO:9) se clonó en vectores de transformación binarios. Para la proteína dirigida a plástidos, la secuencia codificante de proteína pesticida TIC4472PL o TIC2613PL sintética se une operativamente en marco con una secuencia codificante de

péptido señal dirigida al cloroplasto. Los vectores de transformación de plantas resultantes comprenden un primer casete de transgen para expresión de la proteína pesticida TIC4472PL o TIC2613PL que comprende un promotor constitutivo, enlazado operativamente 5' con un líder, enlazado operativamente 5' con un intrón, enlazado operativamente 5' con una secuencia codificante sintética que codifica una proteína TIC4472PL o TIC2613PL dirigida a plástidos o no dirigida, que a su vez está enlazada operativamente 5' a 3' UTR; y un segundo casete de transgen para la selección de células vegetales transformadas usando selección de glifosato.

Las plantas de maíz se transformaron con los vectores de transformación binarios descritos anteriormente usando un método de transformación mediado por *Agrobacterium*. Se inducen las células transformadas para formar plantas por métodos conocidos en la técnica. Los ensayos biológicos que utilizan discos de hoja de planta se realizan de manera análoga a los descritos en la patente estadounidense n.º 8,344,207. Se usa una planta de maíz no transformada para obtener tejido que se usará como control negativo. Se evalúan múltiples eventos de transformación de cada vector binario contra gusano soldado (BAW, *Spodoptera exigua*), gusano cortador grasiento (BCW, *Agrotis ipsilon*), gusano elotero (CEW, *Helicoverpa zea*), gusano medidor de la hoja del algodón (CLW, *Alabama argillacea*), taladro del maíz

(ECB, *Ostrinia nubilalis*), cogollero del maíz (FAW, *Spodoptera frugiperda*), oruga del viejo mundo (OWB, *Helicoverpa armigera*), gusano defoliador (OLW, *Spodoptera litura*), gusano rosado (PBW, *Pectinophora gossypiella*),
5 lagarta verde (SBL, *Chrysodeixis includens*), gusano moteado (SBW, *Earias vittella*), barrenador del maíz del suroeste (SWCB, *Diatraea grandiosella*), barrenador de la caña de azúcar (SCB, *Diatraea saccharalis*), oruga del tabaco (TBW, *Heliothis virescens*) y oruga del frijol terciopelo (VBW, *Anticarsia gemmatalis*), así como otras plagas de insectos
10 lepidópteros.

Las plagas de insectos se observan para determinar la mortalidad y el debilitamiento provocados por la ingestión de los discos de hoja presentados que expresan TIC4472PL o
15 TIC2613PL y en comparación con los discos de hoja derivados de las plantas de maíz no transformadas.

Todas las composiciones descritas y reivindicadas en la presente pueden realizarse y llevarse a cabo sin demasiada experimentación en vista de la presente descripción.
20 Mientras que las composiciones de la presente invención se han descrito en términos de las modalidades ilustrativas que anteceden, será evidente para los expertos en la técnica que podrán aplicarse variaciones, cambios, modificaciones y alteraciones a la composición descrita en
25 la presente, sin alejarse del concepto, espíritu y alcance verdaderos 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
5 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.

Todas las publicaciones y documentos de patente publicados
10 citados en la presente memoria descriptiva se incorporan a la presente a modo de referencia en la misma medida en que si cada publicación o solicitud de patente individual se indicara específica e individualmente como incorporada a la presente mediante esta referencia.