

**MOLÉCULAS DE ÁCIDO NUCLEICO PARA CONFERIR PROPIEDADES
INSECTICIDAS A PLANTAS**

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reivindica la prioridad a la Solicitud de
5 Patente Provisional de Estados Unidos de América Núm.
63/183672, presentada el 4 de mayo de 2021, los contenidos de
la cual se incorporan como referencia en la presente.

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere en general a secuencias
10 de ácido nucleico que confieren expresión de proteínas
insecticidas cuando se introducen en una célula o planta, así
como a composiciones y métodos relacionados.

LISTADO DE SECUENCIAS

Esta solicitud va acompañada de un listado de secuencias
15 en formato de texto ASCII con título "82347-PCT_ST25.txt",
creado el 14 de abril de 2022, que tiene un tamaño de
aproximadamente 395 kilobytes. Esta lista de secuencias se
incorpora en la presente como referencia en su totalidad.
Esta lista de secuencias se presenta con el presente
20 documento a través de EFS-Web, y cumple con 37 C.F.R. §
1.824(a)(2)-(6) y (b).

ANTECEDENTES

Las plagas de plantas son un factor importante en la
pérdida de importantes cultivos agrícolas en el mundo,
25 incluyendo el maíz. Las plagas de plantas se controlan

principalmente por aplicaciones intensivas de plaguicidas químicos. Por tanto, puede lograrse un buen control de las plagas, pero estos agentes químicos pueden afectar en ocasiones a los organismos beneficiosos. Otro problema

5 resultante del amplio uso de plaguicidas químicos es la aparición de variedades de insectos resistentes. Esto se ha aliviado parcialmente mediante diversas prácticas de tratamiento de la resistencia, pero hay una necesidad creciente de estrategias alternativas de control de plagas.

10 Una de dichas alternativas incluye la expresión de genes exógenos que codifican proteínas insecticidas en plantas transgénicas. Este enfoque ha proporcionado un medio eficiente de protección contra plagas de insectos seleccionadas, y se han comercializado plantas transgénicas

15 que expresan toxinas insecticidas, lo que permite que los agricultores reduzcan las aplicaciones de insecticidas químicos.

Las proteínas Cry de *Bacillus thuringiensis* (Bt) (también llamadas delta-endotoxinas) son proteínas que forman

20 una matriz cristalina en *Bacillus* que se conoce que poseen actividad insecticida cuando se ingieren por ciertos insectos. Los genes que codifican proteínas Cry se han aislado y se ha demostrado que su expresión en plantas de cultivo proporciona otra herramienta para el control de

25 plagas de insectos económicamente importante.

Aunque el uso de plantas transgénicas que expresan proteínas Cry es otra herramienta en el cuadro de herramientas de control de insectos, aún es susceptible al fallo por resistencia. Se conocen plagas de insectos que
5 ahora tienen resistencia contra las proteínas Cry expresadas en determinadas plantas transgénicas. Por ejemplo, el gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda*) ha documentado una resistencia desarrollada en el campo a Cry1F, Cry1A.105 y Cry2Ab2 en algunos países. En consecuencia, se necesitan más
10 proteínas insecticidas para hacer frente a los problemas de resistencia.

Crear nuevos casetes de expresión de proteínas insecticidas para usarse en plantas transgénicas es un esfuerzo desafiante, puesto que el casete de expresión debe
15 expresar suficientes proteínas dentro de la planta transgénica para tener la actividad deseada (por ejemplo, actividad insecticida) sin provocar efectos negativos en la propia planta (por ejemplo, rendimiento reducido, esterilidad, retraso en el crecimiento, etc.).

20 En la presente se proporcionan secuencias de ácido nucleico y composiciones relacionadas y métodos de uso para abordar las necesidades mencionadas anteriormente.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

En algunos aspectos, la divulgación proporciona una
25 molécula de ácido nucleico que expresa una o más proteínas

insecticidas. Como se describe en la presente, se creó un casete de expresión (SEQ ID NO: 1) que codifica una proteína eCry1Gb.1Ig (SEQ ID NO: 4). Este casete de expresión, cuando se transforma en plantas, confiere actividad insecticida contra especies de lepidópteros, por ejemplo, *Spodoptera frugiperda* (gusano cogollero).

Por consiguiente, en algunos aspectos, la divulgación proporciona una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que es al menos 90% idéntica a SEQ ID NO: 1 (por ejemplo, al menos 90% idéntica a SEQ ID NO: 1, idéntica en al menos un 91 % a la SEQ ID NO: 1, idéntica en al menos un 92 % a la SEQ ID NO: 1, idéntica en al menos un 93 % a la SEQ ID NO: 1, idéntica en al menos un 94 % a la SEQ ID NO: 1, idéntica en al menos un 95 % a la SEQ ID NO: 1, idéntica en al menos un 96 % a la SEQ ID NO: 1, al menos 97% idéntica a SEQ ID NO: 1, al menos 98% idéntica a SEQ ID NO: 1, idéntica en al menos el 99 % a SEQ ID NO: 1, o idéntica en al menos un 99.5 % a SEQ ID NO: 1), o el complemento de la misma. En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico codifica la misma o mismas proteínas codificadas por la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico comprende una cualquiera de las SEQ ID NO: 1 u 8 a 31 o una o varias de las variantes en la tabla 3. En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico codifica una o más proteínas que son insecticidas contra una o más

plagas de lepidópteros, por ejemplo, insecticidas contra al menos *Spodoptera frugiperda* (gusano cogollero). En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico codifica proteínas que son insecticidas contra al menos dos (por ejemplo, 2, 3 o 4) de *Spodoptera frugiperda* (gusano cogollero), *Mythimna separata* (gusano cogollero oriental), *Spodoptera litura* (gusano cortador común/gusano foliar oriental) y *Ostrinia furnacalis* (barrenador asiático del maíz). En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico está aislada.

En algunas realizaciones, la divulgación proporciona una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que es al menos 95% idéntica a SEQ ID NO: 1 (por ejemplo, idéntica en al menos un 95 % a la SEQ ID NO: 1, al menos 96% idéntica a SEQ ID NO: 1, al menos 97% idéntica a SEQ ID NO: 1, al menos 98% idéntica a SEQ ID NO: 1, idéntica en al menos el 99 % a SEQ ID NO: 1, o idéntica en al menos un 99.5 % a SEQ ID NO: 1) o el complemento de la misma, en donde la secuencia de ácido nucleico codifica un polipéptido que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 4 o que codifica polipéptidos que comprenden las secuencias de SEQ ID NO: 4 y 6. En algunas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico comprende la SEQ ID NO: 3 o la SEQ ID NO: 3 y 5 o una variante de la misma de cualquiera de los anteriores que comprende una o más mutaciones imperceptibles. En algunas

realizaciones, la secuencia de ácido nucleico comprende una cualquiera de las SEQ ID NO: 1 u 8 a 31 o una o más de las variantes de la tabla 3 o una variante de cualquiera de las anteriores que comprenda una o más mutaciones silenciosas u
5 otras mutaciones que no afecten sustancialmente a la función de la SEQ ID NO: 1.

En algunos aspectos, la divulgación proporciona un vector de ácido nucleico recombinante que comprende la molécula de ácido nucleico de cualquiera de las realizaciones
10 mencionadas anteriormente o cualquier otra realización descrita en el presente documento (por ejemplo, que comprende una cualquiera de las SEQ ID NO: 1 u 8 a 31 o una o varias de las variantes de la tabla 3). En algunas realizaciones, el vector es un vector binario. En algunas realizaciones, el
15 vector es un plásmido. En algunas realizaciones, el vector está presente en una célula hospedadora.

En algunos aspectos, la divulgación proporciona una célula hospedadora transgénica que comprende la molécula de ácido nucleico de cualquiera de las realizaciones mencionadas
20 anteriormente o cualquier otra realización descrita en el presente documento (por ejemplo, que comprende una cualquiera de las SEQ ID NO: 1 u 8 a 31 o una o varias de las variantes de la tabla 3). En algunas realizaciones, la célula es una célula vegetal, una célula de levadura, una célula bacteriana
25 o una célula de insecto. En algunas realizaciones, la célula

es una célula bacteriana o una célula vegetal. En algunas realizaciones, la célula es una célula bacteriana y la célula bacteriana es una célula de *Escherichia coli*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*,
5 *Bacillus cereus*, *Agrobacterium ssp.* o *Pseudomonas ssp.*. En algunas realizaciones, la célula es una célula vegetal y la célula vegetal es una célula de maíz, sorgo, trigo, girasol, tomate, crucíferas, avena, hierba de césped, hierba de pasto, pimientos, papa, algodón, arroz, soya, caña de azúcar,
10 remolacha azucarera, tabaco, cebada, o colza de semillas oleaginosas. En algunas realizaciones, la célula vegetal es una célula de maíz. En algunas realizaciones, la célula vegetal está presente en una planta. En algunas realizaciones, la célula vegetal está aislada. En algunas
15 realizaciones, la célula vegetal es capaz de regenerar una planta. En algunas realizaciones, la célula vegetal es incapaz de regenerar una planta completa.

En algunos aspectos, la divulgación proporciona una planta transgénica que comprende la molécula de ácido
20 nucleico de cualquiera de las realizaciones mencionadas anteriormente o cualquier otra realización descrita en el presente documento (por ejemplo, que comprende cualquiera de las SEQ ID NO: 1 u 8 a 31 o una o varias de las variantes de la tabla 3). En algunas realizaciones, la planta es una
25 planta monocotiledónea. En algunas realizaciones, la planta

es una planta dicotiledónea. En algunas realizaciones, la planta se selecciona del grupo constituido por maíz, sorgo, trigo, girasol, tomate, crucíferas, avena, hierba de césped, hierba de pasto, pimientos, papa, algodón, arroz, soya, caña de azúcar, remolacha azucarera, tabaco, cebada, y colza de semillas oleaginosas. En algunas realizaciones, la planta es una planta de maíz. En algunas realizaciones, la planta es una planta completa. En algunas realizaciones, la planta es una planta de maíz entera transgénica que comprende una molécula de ácido nucleico que comprende una cualquiera de las SEQ ID NO: 1 u 8 a 31 o una o varias de las variantes en la tabla 3. En algunas realizaciones, la planta es insecticida contra, al menos, *Spodoptera frugiperda* (gusano cogollero). En algunas realizaciones, la planta es insecticida contra al menos dos (por ejemplo, 2, 3 o 4) de *Spodoptera frugiperda* (gusano cogollero), *Mythimna separata* (gusano cogollero oriental), *Spodoptera litura* (gusano cortador común/gusano foliar oriental) y *Ostrinia furnacalis* (barrenador asiático del maíz). En algunas realizaciones, la planta tiene propiedades insecticidas mejoradas, por ejemplo, contra al menos *Spodoptera frugiperda* (gusano cogollero), en relación con una planta de control, por ejemplo, que no comprende la molécula de ácido nucleico. En algunos aspectos, la divulgación proporciona una progenie de cualquier generación de la planta, en donde la progenie comprende la

molécula de ácido nucleico. En algunos aspectos, la divulgación proporciona un propágulo de la planta, en donde el propágulo comprende la molécula de ácido nucleico. En algunos aspectos, la divulgación proporciona una parte vegetal de la planta, en donde la parte vegetal comprende la molécula de ácido nucleico. En algunas realizaciones, la parte de la planta es un embrión, polen, óvulo, semilla, hoja, flor, rama, fruto, grano, panícula, mazorca, cáscara, tallo, raíz, punta radicular, antera, tubérculo o rizoma. En algunas realizaciones, la parte de la planta es una semilla.

En algunos aspectos, la divulgación proporciona un método para producir una planta transgénica con propiedades insecticidas mejoradas, que comprende la introducción de la molécula de ácido nucleico de cualquiera de las realizaciones mencionadas anteriormente o cualquier otra realización descrita en el presente documento (por ejemplo, que comprende una cualquiera de las SEQ ID NO: 1 u 8 a 31 o una o más de las variantes de la tabla 3) en una planta produciendo de este modo una planta transgénica, en donde la molécula de ácido nucleico expresa cantidades de proteína eficaces para controlar insectos. En algunas realizaciones, las cantidades efectivas de proteína para el control de insectos son efectivas para el control de al menos *Spodoptera frugiperda* (gusano cogollero). En algunas realizaciones, las cantidades efectivas de proteína para el control de insectos son

efectivas para controlar al menos dos (por ejemplo, 2, 3 o 4) de *Spodoptera frugiperda* (gusano cogollero), *Mythimna separata* (gusano cogollero oriental), *Spodoptera litura* (gusano cortador común/gusano foliar oriental) y *Ostrinia furnacalis* (barrenador asiático del maíz).

En algunos aspectos, la divulgación proporciona un método para producir una planta transgénica con propiedades insecticidas mejoradas, que comprende las etapas de: (a) proporcionar la molécula de ácido nucleico de cualquiera de las realizaciones mencionadas anteriormente o cualquier otra realización descrita en el presente documento (por ejemplo, que comprenda una cualquiera de las SEQ ID NO: 1 u 8 a 31 o una cualquiera o más de las variantes de la tabla 3); (b) introducir en una planta, cultivo de tejido una célula vegetal la molécula de ácido nucleico de la etapa (a), obteniendo una planta transformada, cultivo de tejido transformado o una célula transformada que tiene propiedades insecticidas mejoradas; y (c) cultivar la planta transformada o regenerar una planta transformada a partir del cultivo de tejido transformado o la célula vegetal transformada, de tal forma que se produce una planta transgénica con propiedades insecticidas mejoradas. En algunas realizaciones, las propiedades insecticidas mejoradas son propiedades insecticidas mejoradas contra, al menos, *Spodoptera frugiperda* (gusano cogollero). En algunas realizaciones, las

propiedades insecticidas mejoradas son propiedades insecticidas mejoradas contra al menos dos (por ejemplo, 2, 3 o 4) de *Spodoptera frugiperda* (gusano cogollero), *Mythimna separata* (gusano cogollero oriental), *Spodoptera litura* (gusano cortador común/gusano oriental de la hoja) y *Ostrinia furnacalis* (barrenador asiático del maíz). En algunas realizaciones, la planta transgénica es una planta de maíz transgénica.

En algunos aspectos, la divulgación proporciona un método para producir semilla transgénica, que comprende los pasos de: (a) obtener una planta transgénica fértil de cualquiera de las realizaciones mencionadas anteriormente o de cualquier otra realización descrita en el presente documento (por ejemplo, que comprenda una cualquiera de las SEQ ID NO: 1 u 8 a 31 o una o más de las variantes de la tabla 3); y (b) cultivar la planta en condiciones adecuadas para producir la semilla transgénica. En algunas realizaciones, la semilla transgénica es una semilla de maíz transgénica.

En algunos aspectos, la divulgación proporciona un método para producir progenie de cualquier generación de una planta transgénica fértil con propiedades insecticidas potenciadas, que comprende los pasos de: (a) obtener una planta transgénica fértil con propiedades insecticidas mejoradas que comprenda la molécula de ácido nucleico de

cualquiera de las realizaciones mencionadas anteriormente o cualquier otra realización descrita en el presente documento (por ejemplo, que comprenda una cualquiera de las SEQ ID NO: 1 u 8 a 31 o una cualquiera o más de las variantes de la
5 tabla 3); (b) recolectar la semilla transgénica de la planta transgénica; (c) sembrar la semilla transgénica recolectada; y (d) cultivar las plantas transgénicas de progenie a partir de la semilla, en donde la progenie tiene propiedades insecticidas mejoradas en relación con una planta no transformada. En algunas realizaciones, las plantas de
10 progenie son plantas de maíz.

En algunos aspectos, la divulgación proporciona un método para producir una planta transgénica con propiedades insecticidas mejoradas, que comprende las etapas de cruzar
15 sexualmente una primera planta progenitora con una segunda planta progenitora, en donde la primera o segunda planta progenitora es la planta de cualquiera de las realizaciones mencionadas anteriormente o cualquier otra realización descrita en el presente documento (por ejemplo, que comprende
20 una cualquiera de las SEQ ID NO: 1 u 8 a 31 o una o más de las variantes de la tabla 3), para producir una planta de progenie de primera generación que comprenda la molécula de ácido nucleico. En algunas realizaciones, las propiedades insecticidas mejoradas son propiedades insecticidas mejoradas
25 contra, al menos, *Spodoptera frugiperda* (gusano cogollero).

En algunas realizaciones, las propiedades insecticidas mejoradas son propiedades insecticidas mejoradas contra al menos dos (por ejemplo, 2, 3 o 4) de *Spodoptera frugiperda* (gusano cogollero), *Mythimna separata* (gusano cogollero oriental), *Spodoptera litura* (gusano cortador común/gusano oriental de la hoja) y *Ostrinia furnacalis* (barrenador asiático del maíz). En algunas realizaciones, la planta de progenie de primera generación es una planta de maíz.

En algunos aspectos, la divulgación proporciona un método para producir una planta transgénica con propiedades insecticidas mejoradas, que comprende las etapas de: (a) cruzar sexualmente una primera planta madre con una segunda planta madre, en donde la primera o segunda planta madre es la planta de cualquiera de las realizaciones mencionadas anteriormente o cualquier otra realización descrita en el presente documento (por ejemplo, que comprenda una cualquiera de las SEQ ID NO: 1 u 8 a 31 o una o más de las variantes de la tabla 3); y b) seleccionar una planta de progenie de primera generación con propiedades insecticidas mejoradas, en donde la planta progenitora seleccionada comprende la molécula de ácido nucleico. En algunas realizaciones, las propiedades insecticidas mejoradas son propiedades insecticidas mejoradas contra, al menos, *Spodoptera frugiperda* (gusano cogollero). En algunas realizaciones, las propiedades insecticidas mejoradas son propiedades

insecticidas mejoradas contra al menos dos (por ejemplo, 2, 3 o 4) de *Spodoptera frugiperda* (gusano cogollero), *Mythimna separata* (gusano cogollero oriental), *Spodoptera litura* (gusano cortador común/gusano oriental de la hoja) y *Ostrinia furnacalis* (barrenador asiático del maíz). En algunas realizaciones, la planta de progenie de primera generación es una planta de maíz. En algunas realizaciones, el método comprende además las etapas de: (a) autofecundar la planta de progenie de primera generación, produciendo de esta manera una pluralidad de plantas de progenie de segunda generación; y (b) seleccionar de las plantas de progenie de segunda generación una planta con propiedades insecticidas potenciadas, en donde las plantas de progenie de segunda generación seleccionadas comprenden la molécula de ácido nucleico.

En algunos aspectos, la divulgación proporciona un método de control de una plaga de lepidópteros que comprende alimentar a la plaga con una planta o parte de la planta que comprende la molécula de ácido nucleico de cualquiera de las realizaciones mencionadas anteriormente o cualquier otra realización descrita en el presente documento (por ejemplo, que comprende una cualquiera de las SEQ ID NO: 1 u 8 a 31 o una o varias de las variantes de la tabla 3). En algunas realizaciones, la plaga de lepidópteros es *Spodoptera frugiperda* (gusano cogollero). En algunas realizaciones, la

plaga de lepidópteros es al menos dos (por ejemplo, 2, 3 o 4) de *Spodoptera frugiperda* (gusano cogollero), *Mythimna separata* (gusano cogollero oriental), *Spodoptera litura* (gusano cortador común/gusano foliar oriental) y *Ostrinia furnacalis* (barrenador asiático del maíz). En algunas realizaciones, la planta o la parte de la planta es una planta de maíz o una parte de la planta de maíz.

En algunos aspectos, la divulgación proporciona un método de producción de un producto vegetal básico, comprendiendo el método el uso de la planta de cualquiera de las realizaciones mencionadas anteriormente o de cualquier otra realización descrita en el presente documento (por ejemplo, que comprende una cualquiera de las SEQ ID NO: 1 u 8 a 31 o una o varias de las variantes de la tabla 3) para producir dicho producto vegetal básico a partir de esta. En algunas realizaciones, la planta es una planta de maíz. En algunas realizaciones, el producto vegetal básico es un grano, almidón, aceite de semilla, jarabe, harina, sémola, almidón, cereal o proteína.

En algunos aspectos, la divulgación proporciona un método para detectar la presencia de una molécula de ácido nucleico en una muestra, comprendiendo el método: (a) poner en contacto la muestra con un par de cebadores que, cuando se utilizan en una reacción de amplificación de ácido nucleico con el ADN que comprende la molécula de ácido nucleico de

cualquiera de las realizaciones mencionadas anteriormente o cualquier otra realización descrita en el presente documento (por ejemplo, que comprende SEQ ID NO: una cualquiera de las SEQ ID NO: 1 u 8 a 31 o una o más de las variantes de la
5 tabla 3), produce un amplicón que es diagnóstico para la molécula de ácido nucleico; (b) realizar una reacción de amplificación de ácido nucleico, produciendo así el amplicón; y (c) detectar el amplicón. En algunas realizaciones, el par de cebadores es un primer cebador y un segundo cebador, en
10 donde el primer cebador comprende al menos 10 nucleótidos contiguos que son complementarios a una cualquiera de las SEQ ID NO: 1 u 8 a 31 o una o más de las variantes de la tabla 3 y el segundo cebador comprende al menos 10 nucleótidos contiguos que son complementarios al complemento inverso de
15 una cualquiera de los SEQ ID NO: 1 u 8 a 31 o una o varias de las variantes en la tabla 3. En algunas realizaciones, el primer y el segundo cebador tienen una longitud de entre 10 y 30 nucleótidos. En algunas realizaciones, la muestra es una muestra obtenida de una parte o una célula de la planta de
20 maíz.

En algunos aspectos, la divulgación proporciona un método para detectar la presencia de una molécula de ácido nucleico en una muestra, comprendiendo el método: (a) poner en contacto la muestra con una sonda que se hibrida en
25 condiciones de alta rigurosidad con el ADN que comprende la

molécula de ácido nucleico de cualquiera de las realizaciones mencionadas anteriormente o cualquier otra realización descrita en el presente documento (por ejemplo, que comprende una cualquiera de las SEQ ID NO: 1 u 8 a 31 o una o más de las variantes de la tabla 3) y que no hibride en condiciones de alta rigurosidad con el ADN de una planta de maíz de control que no comprenda la molécula de ácido nucleico; (b) someter la muestra y la sonda a condiciones de hibridación de alta rigurosidad; y (c) detectar la hibridación de la sonda con la molécula de ácido nucleico. En algunas realizaciones, la sonda comprende al menos 10 nucleótidos contiguos que son complementarios a una cualquiera de las SEQ ID NO: 1 u 8 a 31 o una o varias de las variantes de la tabla 3 o su complemento inverso. En algunas realizaciones, la sonda tiene una longitud de entre 10 y 50 nucleótidos. En algunas realizaciones, la muestra es una muestra obtenida de una parte o una célula de la planta de maíz.

En algunos aspectos, la divulgación proporciona un par de cebadores de polinucleótido que comprenden un primer cebador de polinucleótido y un segundo cebador de polinucleótido que funcionan juntos en presencia de la molécula de ácido nucleico de cualquiera de las realizaciones mencionadas anteriormente o de cualquier otra realización descrita en el presente documento (por ejemplo, que comprende una cualquiera de las SEQ ID NO: 1 u 8 a 31 o una o más de

las variantes de la tabla 3) en una muestra para producir un amplicón de diagnóstico de la presencia de la molécula de ácido nucleico en una muestra. En algunas realizaciones, la muestra es una muestra obtenida de una parte o una célula de la planta de maíz. En algunas realizaciones, el primer cebador de polinucleótido comprende al menos 10 nucleótidos contiguos que son complementarios a una cualquiera de las SEQ ID NO: 1 u 8 a 31 o una o más de las variantes de la tabla 3 y el segundo cebador de polinucleótido comprende al menos 10 nucleótidos contiguos que son complementarios al complemento inverso de una cualquiera de las SEQ ID NO: 1 u 8 a 31 o una o varias de las variantes en la tabla 3. En algunas realizaciones, el primer y el segundo cebador tienen una longitud de entre 10 y 30 nucleótidos.

En algunos aspectos, la divulgación proporciona un kit para detectar la molécula de ácido nucleico de cualquiera de las realizaciones mencionadas anteriormente o cualquier otra realización descrita en el presente documento (por ejemplo, que comprende una cualquiera de las SEQ ID NO: 1 u 8 o 31 o una cualquiera o más de las variantes de la tabla 3), comprendiendo el kit al menos una molécula de ácido nucleico con una longitud suficiente de nucleótidos contiguos para funcionar como cebador o sonda en un método de detección de ácido nucleico, y que tras la amplificación de, o la hibridación con, una secuencia de ácido nucleico objetivo en

una muestra, seguida de la detección del amplicón o la hibridación con la secuencia objetivo, son diagnósticos de la presencia de la molécula de ácido nucleico. En algunas realizaciones, la al menos una molécula de ácido nucleico comprende al menos 10 nucleótidos contiguos que son complementarios a una cualquiera de las SEQ ID NO: 1 u 8 a 31 o una o varias de las variantes en la tabla 3. En algunas realizaciones, la al menos una molécula de ácido nucleico comprende un par de cebadores, en donde el primer cebador de polinucleótido comprende al menos 10 nucleótidos contiguos que son complementarios a una cualquiera de las SEQ ID NO: 1 u 8 a 31 o una o más de las variantes de la tabla 3 y el segundo cebador de polinucleótido comprende al menos 10 nucleótidos contiguos que son complementarios al complemento inverso de una cualquiera de las SEQ ID NO: 1 u 8 a 31 o una o varias de las variantes en la tabla 3. En algunas realizaciones, el primer y el segundo cebador tienen una longitud de entre 10 y 30 nucleótidos. En algunas realizaciones, la al menos una molécula de ácido nucleico comprende una sonda que comprende al menos 10 nucleótidos contiguos que son complementarios a una cualquiera de las SEQ ID NO: 1 u 8 a 31 o una o varias de las variantes de la tabla 3 o su complemento inverso. En algunas realizaciones, la sonda tiene una longitud de entre 10 y 50 nucleótidos.

En algunos aspectos, la divulgación proporciona un método que comprende introducir una modificación en una molécula de ácido nucleico, una célula hospedadora transgénica o una planta transgénica de una cualquiera de las realizaciones mencionadas anteriormente, produciendo así una molécula de ácido nucleico modificada, una célula hospedadora transgénica o una planta transgénica modificada. En algunas realizaciones, la modificación es una eliminación, una inserción, una sustitución, una duplicación, o inversión o una combinación de las mismas. En algunas realizaciones, la modificación comprende la eliminación de una porción o de la totalidad de una secuencia codificante del marcador de selección presente en la molécula de ácido nucleico (por ejemplo, PMI). En algunas realizaciones, la modificación se introduce utilizando una nucleasa o una recombinación homóloga, o una combinación de las mismas. En algunas realizaciones, la nucleasa es una nucleasa CRISPR-Cas. En algunas realizaciones, el método comprende además producir una planta a partir de la célula hospedadora transgénica modificada y autofecundar o cruzar la planta con otra planta, produciendo de esta manera una planta de progenie transgénica modificada. En algunas realizaciones, el método comprende además autofecundar o cruzar la planta transgénica modificada con otra planta, produciendo así una planta de la progenie transgénica modificada. En algunas realizaciones, el método

comprende además autofecundar o retrocruzar la planta de la progenie transgénica modificada durante al menos una generación adicional.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

5 La figura 1 es un diagrama del vector binario 24795, cuya secuencia de ácido nucleico es SEQ ID NO:2.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS SECUENCIAS DEL LISTADO DE SECUENCIAS

 La SEQ ID NO: 1 es la secuencia de ácido nucleico del casete de expresión que codifica una proteína eCry1Gb.1Ig
10 (SEQ ID NO: 4) así como PMI (SEQ ID NO: 6) como marcador de selección.

 SEQ ID NO: 2 es la secuencia de ácidos nucleicos del vector binario 24795, que incluye el casete de expresión de SEQ ID NO: 1.

15 La SEQ ID NO: 3 es la secuencia de ácido nucleico de una secuencia codificante que codifica eCry1Gb.1Ig.

 SEQ ID NO: 4 es la secuencia de aminoácidos de eCry1Gb.1Ig.

 SEQ ID NO: 5 es la secuencia de ácido nucleico de una
20 secuencia codificante que codifica PMI.

 SEQ ID NO: 6 es la secuencia de aminoácidos de PMI.

 SEQ ID NO: 7 es la secuencia de ácido nucleico de una
 secuencia codificante que codifica PMI que tiene una mutación silenciosa en una posición de nucleótido en relación con la
25 SEQ ID NO: 5.

La SEQ ID NO: 8 es la secuencia de ácido nucleico del casete de expresión que codifica una proteína eCry1Gb.1Ig (SEQ ID NO: 4) así como PMI (SEQ ID NO: 6) como marcador de selección y que contiene la mutación silenciosa de la SEQ ID NO: 7.

La SEQ ID NO: 9 es la secuencia de ácido nucleico del casete de expresión que codifica una proteína eCry1Gb.1Ig (SEQ ID NO: 4) así como PMI (SEQ ID NO: 6) como marcador de selección y que contiene una mutación adicional en relación con la SEQ ID NO: 1.

La SEQ ID NO: 10 es la secuencia de ácido nucleico del casete de expresión que codifica una proteína eCry1Gb.1Ig (SEQ ID NO: 4) así como PMI (SEQ ID NO: 6) como marcador de selección y que contiene mutaciones adicionales en relación con la SEQ ID NO: 1.

La SEQ ID NO: 11 es la secuencia de ácido nucleico del casete de expresión que codifica una proteína eCry1Gb.1Ig (SEQ ID NO: 4) así como PMI (SEQ ID NO: 6) como marcador de selección y que contiene mutaciones adicionales en relación con la SEQ ID NO: 1.

La SEQ ID NO: 12 es la secuencia de ácido nucleico del casete de expresión que codifica una proteína eCry1Gb.1Ig (SEQ ID NO: 4) así como PMI (SEQ ID NO: 6) como marcador de selección y que contiene mutaciones adicionales en relación con la SEQ ID NO: 1.

La SEQ ID NO: 13 es la secuencia de ácido nucleico del casete de expresión que codifica una proteína eCry1Gb.1Ig (SEQ ID NO: 4) así como PMI (SEQ ID NO: 6) como marcador de selección y que contiene mutaciones adicionales en relación con la SEQ ID NO: 1.

La SEQ ID NO: 14 es la secuencia de ácido nucleico del casete de expresión que codifica una proteína eCry1Gb.1Ig (SEQ ID NO: 4) así como PMI (SEQ ID NO: 6) como marcador de selección y que contiene mutaciones adicionales en relación con la SEQ ID NO: 1.

La SEQ ID NO: 15 es la secuencia de ácido nucleico del casete de expresión que codifica una proteína eCry1Gb.1Ig (SEQ ID NO: 4) así como PMI (SEQ ID NO: 6) como marcador de selección y que contiene mutaciones adicionales en relación con la SEQ ID NO: 1.

La SEQ ID NO: 16 es la secuencia de ácido nucleico del casete de expresión que codifica una proteína eCry1Gb.1Ig (SEQ ID NO: 4) así como PMI (SEQ ID NO: 6) como marcador de selección y que contiene mutaciones adicionales en relación con la SEQ ID NO: 1.

La SEQ ID NO: 17 es la secuencia de ácido nucleico del casete de expresión que codifica una proteína eCry1Gb.1Ig (SEQ ID NO: 4) así como PMI (SEQ ID NO: 6) como marcador de selección y que contiene mutaciones adicionales en relación con la SEQ ID NO: 1.

La SEQ ID NO: 18 es la secuencia de ácido nucleico del casete de expresión que codifica una proteína eCry1Gb.1Ig (SEQ ID NO: 4) así como PMI (SEQ ID NO: 6) como marcador de selección y que contiene mutaciones adicionales en relación con la SEQ ID NO: 1.

La SEQ ID NO: 19 es la secuencia de ácido nucleico del casete de expresión que codifica una proteína eCry1Gb.1Ig (SEQ ID NO: 4) así como PMI (SEQ ID NO: 6) como marcador de selección y que contiene mutaciones adicionales en relación con la SEQ ID NO: 1.

La SEQ ID NO: 20 es la secuencia de ácido nucleico del casete de expresión que codifica una proteína eCry1Gb.1Ig (SEQ ID NO: 4) así como PMI (SEQ ID NO: 6) como marcador de selección y que contiene mutaciones adicionales en relación con la SEQ ID NO: 1.

La SEQ ID NO: 21 es la secuencia de ácido nucleico del casete de expresión que codifica una proteína eCry1Gb.1Ig (SEQ ID NO: 4) así como PMI (SEQ ID NO: 6) como marcador de selección y que contiene mutaciones adicionales en relación con la SEQ ID NO: 1.

La SEQ ID NO: 22 es la secuencia de ácido nucleico del casete de expresión que codifica una proteína eCry1Gb.1Ig (SEQ ID NO: 4) así como PMI (SEQ ID NO: 6) como marcador de selección y que contiene mutaciones adicionales en relación con la SEQ ID NO: 1.

La SEQ ID NO: 23 es la secuencia de ácido nucleico del casete de expresión que codifica una proteína eCry1Gb.1Ig (SEQ ID NO: 4) así como PMI (SEQ ID NO: 6) como marcador de selección y que contiene mutaciones adicionales en relación con la SEQ ID NO: 1.

La SEQ ID NO: 24 es la secuencia de ácido nucleico del casete de expresión que codifica una proteína eCry1Gb.1Ig (SEQ ID NO: 4) así como PMI (SEQ ID NO: 6) como marcador de selección y que contiene mutaciones adicionales en relación con la SEQ ID NO: 1.

La SEQ ID NO: 25 es la secuencia de ácido nucleico del casete de expresión que codifica una proteína eCry1Gb.1Ig (SEQ ID NO: 4) así como PMI (SEQ ID NO: 6) como marcador de selección y que contiene mutaciones adicionales en relación con la SEQ ID NO: 1.

La SEQ ID NO: 26 es la secuencia de ácido nucleico del casete de expresión que codifica una proteína eCry1Gb.1Ig (SEQ ID NO: 4) así como PMI (SEQ ID NO: 6) como marcador de selección y que contiene mutaciones adicionales en relación con la SEQ ID NO: 1.

La SEQ ID NO: 27 es la secuencia de ácido nucleico del casete de expresión que codifica una proteína eCry1Gb.1Ig (SEQ ID NO: 4) así como PMI (SEQ ID NO: 6) como marcador de selección y que contiene mutaciones adicionales en relación con la SEQ ID NO: 1.

La SEQ ID NO: 28 es la secuencia de ácido nucleico del casete de expresión que codifica una proteína eCry1Gb.1Ig (SEQ ID NO: 4) así como PMI (SEQ ID NO: 6) como marcador de selección y que contiene mutaciones adicionales en relación con la SEQ ID NO: 1.

La SEQ ID NO: 29 es la secuencia de ácido nucleico del casete de expresión que codifica una proteína eCry1Gb.1Ig (SEQ ID NO: 4) así como PMI (SEQ ID NO: 6) como marcador de selección y que contiene una mutación adicional en relación con la SEQ ID NO: 1.

La SEQ ID NO: 30 es la secuencia de ácido nucleico del casete de expresión que codifica una proteína eCry1Gb.1Ig (SEQ ID NO: 4) así como PMI (SEQ ID NO: 6) como marcador de selección y que contiene mutaciones adicionales en relación con la SEQ ID NO: 1.

La SEQ ID NO: 31 es la secuencia de ácido nucleico del casete de expresión que codifica una proteína eCry1Gb.1Ig (SEQ ID NO: 4) así como PMI (SEQ ID NO: 6) como marcador de selección y que contiene mutaciones adicionales en relación con la SEQ ID NO: 1.

SEQ ID NO: 32-75 están en la tabla 3.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Esta descripción no pretende ser un catálogo detallado de todas las diferentes formas en que se puede implementar la invención, o todas las características que se pueden

adicionar a la presente invención. Por ejemplo, las características ilustradas con respecto a una realización se pueden incorporar en otras realizaciones, y las características ilustradas con respecto a una realización particular se pueden eliminar de esa realización. De este modo, la divulgación contempla que, en algunas realizaciones, se pueda excluir u omitir cualquier característica o combinación de características que se expone en el presente documento. Además, numerosas variaciones y adiciones a las diversas realizaciones sugeridas en la presente serán evidentes para aquellos expertos en la técnica en vista de la presente divulgación, que no se desvían de la presente divulgación. Por lo tanto, se pretende que las siguientes descripciones ilustren algunas realizaciones particulares de la divulgación, pero no se pretende que especifiquen exhaustivamente todas sus permutaciones, combinaciones y variaciones.

Salvo que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente tienen el mismo significado que se comprende comúnmente por un experto en la técnica a la cual pertenece esta invención. La terminología utilizada en la descripción de la invención de la presente tiene únicamente el fin de describir realizaciones particulares y no pretende limitar la invención.

Todas las publicaciones, solicitudes de patente, patentes y otras referencias citadas en la presente se incorporan como referencia en su totalidad para las enseñanzas pertinentes para la oración y/o párrafo en el que se presenta la referencia.

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

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

A menos que el contexto indique lo contrario, se pretende específicamente que las diferentes características de la divulgación descritas en el presente documento se puedan usar en cualquier combinación. Además, la presente

divulgación también contempla que, en algunas realizaciones, se pueda excluir u omitir cualquier característica o combinación de características que se expone en el presente documento. A modo ilustrativo, si la memoria descriptiva indica que una composición comprende los componentes A, B y C, se pretende que pueda omitirse y excluirse de manera individual o en cualquier combinación cualquiera de A, B o C o una combinación de los mismos.

Definiciones

Por claridad, ciertos términos utilizados en la especificación se definen y presentan como sigue:

Como se utiliza en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "uno/a" y "el/la" incluyen las referencias en plural, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por tanto, por ejemplo, la referencia a "una planta" es una referencia a una o más plantas e incluye equivalentes de las mismas conocidos por los expertos en la materia, y así sucesivamente.

Como se utiliza en el presente documento, la palabra "o" también abarca "y/o", a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

En el presente documento, el término "aproximadamente" se utiliza para referirse a de forma aproximada, más o menos, alrededor de, o en la región de. Cuando el término

"aproximadamente" se utiliza en conjunto con un intervalo numérico, modifica ese intervalo al extender los límites por encima y por debajo de los valores numéricos expuestos. En general, en el presente documento, el término

5 "aproximadamente" se utiliza para modificar un valor numérico por encima y por debajo del valor indicado con una varianza del 20 por ciento, preferentemente del 10 por ciento hacia arriba o hacia abajo (superior o inferior). Con respecto a una temperatura, el término "aproximadamente" se refiere a

10 ± 1 °C, preferentemente a ± 0.5 °C. Cuando se utiliza el término "aproximadamente" en el contexto de la presente divulgación (por ejemplo, combinado con valores de temperatura o peso molecular) se prefiere el valor exacto (es decir, sin el término "aproximadamente").

15 Como se utiliza en el presente documento, y a menos que el contexto indique lo contrario, debe interpretarse que expresiones tales como "entre aproximadamente X e Y", "entre aproximadamente X y aproximadamente Y", "de X a Y" y "de aproximadamente X a aproximadamente Y" (y expresiones

20 similares), incluyen X e Y.

Los términos "comprende", "que comprende", "incluye", "que incluye", "que tiene" y sus conjugados significan "que incluye pero no se limita a". La expresión "constituido por" significa "que incluye y se limita a". La expresión

25 "constituido esencialmente por" significa que la composición,

método o estructura podrá incluir ingredientes, etapas y/o partes adicionales, pero solo si los ingredientes, etapas y/o partes adicionales no alteran sustancialmente las características básicas y novedosas de la composición, método
5 o estructura reivindicados.

Las unidades, prefijos y símbolos se pueden denotar en su forma aceptada por el SI. A menos que se indique de otro modo, los ácidos nucleicos se escriben de izquierda a derecha en la orientación de 5' a 3'; las secuencias de aminoácidos
10 se escriben de izquierda a derecha en la orientación de extremo aminoterminal a extremo carboxiterminal, respectivamente. Se puede hacer referencia a los aminoácidos en la presente ya sea por sus símbolos de tres letras comúnmente conocidos o por los símbolos de una letra
15 recomendados por la Comisión de Nomenclatura Bioquímica IUPAC-IUB. De manera similar, se puede hacer referencia a los nucleótidos por sus códigos de una sola letra comúnmente aceptados.

"Actividad" de las proteínas insecticidas de la
20 divulgación significa que las proteínas insecticidas funcionan como agentes de control de plagas activos por vía oral (por ejemplo, insectos), tienen un efecto tóxico (por ejemplo, inhiben la capacidad de la plaga de insectos para sobrevivir, crecer y/o reproducirse) y/o son capaces de
25 alterar o impedir la alimentación de las plagas, que pueden

causar o no la muerte del insecto. Cuando se administra una proteína insecticida de la divulgación a la plaga, el resultado es normalmente la muerte de la plaga, o la plaga no se alimenta de la fuente que hace que la proteína insecticida esté disponible para la plaga.

La expresión "polinucleótido quimérico" o "proteína quimérica" (o expresiones similares), como se utiliza en el presente documento, se refiere a una molécula que comprende dos o más polinucleótidos o proteínas, o fragmentos de los mismos, de diferente origen ensamblados en una única molécula. La expresión "construcción quimérica", "gen quimérico", "polinucleótido quimérico" o "ácido nucleico quimérico" se refiere a cualquier construcción o molécula que contiene, sin carácter limitante, (1) polinucleótidos (por ejemplo, ADN), incluyendo polinucleótidos reguladores y codificantes que no se encuentran juntos en la naturaleza (es decir, al menos uno de los polinucleótidos de la construcción es heterólogo respecto a al menos uno de sus otros polinucleótidos), o (2) polinucleótidos que codifican partes de proteínas que no están unidas de manera natural o (3) partes de promotores que no están unidos de manera natural. Además, una construcción quimérica, gen quimérico, polinucleótido quimérico o ácido nucleico quimérico, puede comprender polinucleótidos reguladores y polinucleótidos codificantes que proceden de fuentes diferentes, o puede

comprender polinucleótidos reguladores y polinucleótidos codificantes que proceden de la misma fuente, pero dispuestos de una manera diferente a la que se encuentra en la naturaleza. En algunas realizaciones de la divulgación, el

5 constructo quimérico, gen quimérico, polinucleótido quimérico o ácido nucleico quimérico comprende un casete de expresión que comprende un polinucleótido de la divulgación bajo el control de polinucleótidos reguladores, particularmente bajo el control de polinucleótidos reguladores funcionales en

10 plantas o bacterias. Las palabras "quimérico" e "híbrido", con respecto a un polinucleótido o una proteína, se usan de indistintamente en el presente documento.

En el contexto de la presente divulgación, una proteína "quimérica" es una proteína creada fusionando la totalidad o

15 una porción de al menos dos proteínas diferentes. Una proteína quimérica también puede modificarse adicionalmente para incluir adiciones, sustituciones y/o eliminaciones de uno o más aminoácidos. En algunas realizaciones de la presente divulgación, la proteína quimérica es una proteína

20 Cry quimérica que comprende la totalidad o una porción de dos proteínas Cry diferentes fusionadas entre sí en un único polipéptido. En algunas realizaciones, la proteína Cry quimérica comprende además modificaciones adicionales tales como adiciones, sustituciones y/o eliminaciones de uno o más

aminoácidos. Una "proteína insecticida quimérica" es una proteína quimérica que tiene actividad insecticida.

Como se utiliza en el presente documento, una secuencia "con codones optimizados" significa una secuencia de nucleótidos en donde los codones se eligen para reflejar la preferencia codónica particular que pueda tener una célula u organismo hospedador. Normalmente, esto se lleva a cabo de modo que se conserve la secuencia de aminoácidos del polipéptido codificado por la secuencia de nucleótidos que se va a optimizar. En ciertas realizaciones, la secuencia de ADN del constructo de ADN recombinante incluye una secuencia que se ha optimizado por codones para la célula (por ejemplo, un animal, planta, o célula micótica) en la que se va a expresar el constructo. Por ejemplo, un constructo que se va a expresar en una célula vegetal puede tener toda o partes de su secuencia (por ejemplo, el primer elemento de supresión génica o el elemento de expresión génica) con codones optimizados para la expresión en una planta. Véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 6,121,014, que se incorpora al presente documento por referencia. En algunas realizaciones, los polinucleótidos de la divulgación tienen codones optimizados para la expresión en una célula vegetal (por ejemplo, una célula de dicotiledóneas o de monocotiledóneas) o una célula bacteriana.

La expresión "controlar" insectos significa inhibir, a través de un efecto tóxico, la capacidad de las plagas de insectos para sobrevivir, crecer, alimentarse, y/o reproducirse, y/o limitar las pérdidas o los daños relacionados con los insectos en las plantas de cultivo y/o proteger el rendimiento potencial de un cultivo cuando se cultiva en presencia de plagas de insectos. "Controlar" insectos puede significar o no aniquilar a los insectos, aunque en algunas realizaciones de la divulgación, "control" del insecto significa aniquilar a los insectos.

Una "planta de control" o "control", como se utiliza en el presente documento, puede ser una planta no transgénica de la línea progenitora utilizada para generar una planta transgénica del presente documento. Una planta de control puede ser, en algunos casos, una línea vegetal transgénica que incluye un vector vacío o un gen marcador, pero no contiene el polinucleótido recombinante de la presente divulgación que se expresa en la planta transgénica que se está evaluando. En general, una planta de control es una planta de la misma línea o variedad que la planta transgénica que se está probando, que carece del ADN recombinante que confiere el rasgo específico que caracteriza a la planta transgénica. Esta planta progenitora que carece de ese ADN recombinante que confiere un rasgo específico puede ser una planta natural, tipo silvestre, una planta de élite, no

transgénica, o una planta transgénica sin el ADN recombinante que confiere un rasgo específico que caracteriza a la planta transgénica. La planta progenitora que carece del ADN recombinante que confiere el rasgo específico puede ser una
5 planta hermana de una planta transgénica que tenga el ADN recombinante que confiere el rasgo específico. Esta planta hermana progenitora puede incluir otro ADN recombinante.

En el contexto de la divulgación, "correspondiente a" o "corresponde a" significa que cuando las secuencias de
10 aminoácidos de una secuencia de referencia se alinean con una segunda secuencia de aminoácidos (por ejemplo, secuencias variantes u homólogas), que difieren de la secuencia de referencia, los aminoácidos que "corresponden a" ciertas posiciones enumeradas en la secuencia de aminoácidos son
15 aquellas que se alinean con estas posiciones en la secuencia de aminoácidos de referencia pero que no están necesariamente en las posiciones numéricas exactas en relación con la secuencia de aminoácidos de referencia particular de la divulgación.

20 Como se utiliza en el presente documento, la expresión "proteína Cry" significa una proteína insecticida de un tipo de endotoxina delta cristalina de *Bacillus thuringiensis*. La expresión "proteína Cry" se puede referir a la forma de protoxina o cualquier toxina o fragmento activo como
25 insecticida de la misma, incluyendo la forma de la toxina

parcialmente procesada y madura (por ejemplo, sin el fragmento peptidilo aminoterminal ni/o la cola de la protoxina carboxiterminal).

5 Las expresiones "suministrar" o "que suministra" una composición o una toxina se refieren a que la composición o la toxina entra en contacto con un insecto, lo que produce un efecto tóxico y el control del insecto. La composición o toxina se puede administrar de muchas maneras reconocidas, por ejemplo, por vía oral por ingestión por el insecto
10 mediante la expresión de plantas transgénicas.

El término "dominio" se refiere a un conjunto de aminoácidos conservado en posiciones específicas a lo largo de una alineación de secuencias de proteínas relacionadas desde un punto de vista evolutivo. En tanto que los
15 aminoácidos en otras posiciones pueden variar entre homólogos, los aminoácidos que se conservan altamente en posiciones específicas indican aminoácidos que son probablemente esenciales en la estructura, estabilidad o función de una proteína. Identificados por su alto grado de
20 conservación en secuencias alineadas de una familia de proteínas homólogas, pueden usarse como identificadores para determinar si cualquier polipéptido en cuestión pertenece a un grupo de polipéptidos identificado previamente.

Una proteína "modificada" de la divulgación se refiere a
25 una proteína que tiene una secuencia que es diferente en al

menos una posición de aminoácidos en comparación al menos una proteína original correspondiente. Una proteína genotecnológica puede ser una proteína mutante que contiene, por ejemplo, una o más modificaciones tales como eliminaciones, adiciones y/o sustituciones de una o más posiciones de aminoácidos con respecto a una proteína original. Una proteína modificada puede ser una proteína quimérica y contener, por ejemplo, uno o más dominios intercambiados o reordenados o fragmentos de al menos dos proteínas originales.

"Cantidad efectiva para el control de insectos" significa la concentración de toxina o toxinas que inhibe, a través de un efecto tóxico, la capacidad de los insectos para sobrevivir, crecer, alimentarse, y/o reproducirse, o para limitar el daño o la pérdida relacionados con insectos en las plantas de cultivo. "Cantidad efectiva para el control de insectos" puede significar o no aniquilar a los insectos, aunque preferentemente significa aniquilar a los insectos. "Insecticida" se define como una actividad biológica tóxica capaz de controlar insectos, preferentemente al aniquilarlos. Una planta transgénica con "propiedades insecticidas mejoradas" es una planta que expresa una proteína o proteínas en cantidades efectivas para el control de insectos, de modo que, en algunas realizaciones, la planta es insecticida para una mayor variedad de especies de insectos, en relación con

una planta del mismo tipo que no está transformada. Esta mayor variedad de especies de insectos incluye plagas de plantas de insectos, tales como plagas de insectos lepidópteros, por ejemplo, *Spodoptera frugiperda* (gusano cogollero).

El término "evento" se refiere al transformante original y/o progenie del transformante que incluye el ADN heterólogo. El término "evento" también se refiere a la progenie producida por un cruce sexual entre el transformante y otra línea de maíz. Incluso después del retrocruzamiento repetido con un progenitor recurrente, el ADN insertado y el ADN flanqueante del progenitor transformado están presentes en la progenie del cruce en la misma ubicación cromosómica. El término "evento" también se refiere al ADN del transformante original que comprende el ADN insertado y la secuencia genómica flanqueante inmediatamente adyacente al ADN insertado que se esperaría que se transfiera a una descendencia como resultado del cruce sexual de una línea progenitora que incluya el ADN insertado (por ejemplo, el transformante original y la descendencia resultante de la autofecundación) y una línea progenitora que no contenga el ADN insertado. Normalmente, la transformación de tejido vegetal produce múltiples eventos, cada uno de los cuales representa la inserción de una construcción de ADN en una ubicación diferente en el genoma de una célula vegetal.

"Casete de expresión", como se utiliza en el presente documento, significa una secuencia de ácido nucleico capaz de dirigir la expresión de una o más secuencias de nucleótidos particulares en una célula hospedadora adecuada, que comprende uno o más transgenes, comprendiendo cada transgén un promotor unido operativamente a una secuencia de nucleótidos de interés que está unida operativamente a señales de terminación. Normalmente, cada transgén también comprende las secuencias necesarias para la traducción correcta de la secuencia de nucleótidos. El casete de expresión que comprende las secuencias de nucleótidos de interés puede tener al menos uno de sus componentes heterólogo con respecto a al menos uno de sus otros componentes. El casete de expresión también puede ser uno que se presenta naturalmente pero se ha obtenido en una forma recombinante útil para la expresión heteróloga. Habitualmente, sin embargo, el casete de expresión es heterólogo con respecto al hospedador, es decir, la secuencia de ácido nucleico particular del casete de expresión que no se presenta naturalmente en la célula hospedadora y se debe haber introducido en la célula hospedadora o un ancestro de la célula hospedadora por un evento de transformación. La expresión de la secuencia de nucleótidos en el casete de expresión puede estar bajo el control de un promotor constitutivo o de un promotor inducible que inicia la

transcripción sólo cuando la célula hospedadora se expone a algún estímulo externo particular. En el caso de un organismo multicelular, tal como una planta, el promotor también puede ser específico de un tejido o un órgano o una etapa de desarrollo particular.

Un casete de expresión que comprende una o más secuencias de nucleótidos de interés puede ser quimérico, lo que significa que al menos uno de sus componentes es heterólogo con respecto a al menos uno de sus otros componentes. Un casete de expresión también puede ser uno que comprende un promotor natural que dirige su gen natural, aunque se ha obtenido en una forma recombinante útil para la expresión heteróloga. Dicho uso de un casete de expresión hace que no tenga un origen natural en la célula en la que se ha introducido.

Un casete de expresión también puede incluir opcionalmente una o más regiones de terminación transcripcional y/o traduccional que es/son funcionales en plantas. Se dispone de una variedad de terminadores de la transcripción que se pueden utilizar en casetes de expresión y que son responsables de la terminación de la transcripción más allá de la secuencia de nucleótidos heteróloga de interés y la correcta poliadenilación del ARNm. La región de terminación puede ser nativa con respecto a la región de inicio transcripcional, puede ser nativa con respecto a la

secuencia de nucleótidos de interés unida operativamente, puede ser nativa con respecto al hospedador vegetal o puede proceder de otra fuente (es decir, ser exógena o heteróloga con respecto al promotor, la secuencia de nucleótidos de
5 interés, el hospedador vegetal o cualquiera de sus combinaciones).

Un "gen" comprende una secuencia de ácido nucleico codificante y normalmente también comprende otros ácidos nucleicos, principalmente reguladores, responsables del
10 control de la expresión, es decir, la transcripción y la traducción, de la porción codificante. Un gen también puede comprender otras secuencias 5' y 3' no traducidas y secuencias de terminación. Otros elementos que pueden estar presentes son, por ejemplo, intrones. La secuencia de ácido
15 nucleico reguladora del gen puede no estar normalmente unida operativamente a la secuencia de ácido nucleico asociada como se encuentra en la naturaleza y por tanto podría ser un gen quimérico.

El término "germoplasma" se refiere a material genético
20 de o procedente de un individuo (por ejemplo, una planta), un grupo de individuos (por ejemplo, una línea, variedad o familia vegetal) o un clon procedente de una línea, variedad especie o cultivo. El germoplasma puede ser parte de un organismo o célula o se puede separar del organismo o célula.
25 En general, el germoplasma proporciona material genético con

una composición molecular específica que proporciona una base física para algunas o todas las cualidades hereditarias de un organismo o un cultivo celular. Como se usa en el presente documento, el germoplasma incluye células, semillas o tejidos a partir de los que pueden cultivarse nuevas plantas, o partes de plantas, tales como hojas, tallos, polen o células, que pueden cultivarse para obtener una planta completa.

El término "heterólogo", cuando se utiliza haciendo referencia a un gen o un polinucleótido o un polipéptido, se refiere a un gen o un polinucleótido o un polipéptido que es o contiene una parte del mismo que no está en su entorno natural (es decir, que ha sido alterada mediante intervención humana). Por ejemplo, un gen heterólogo puede incluir un polinucleótido de una especie que se ha introducido en otra especie. Un gen heterólogo también puede incluir un polinucleótido nativo de un organismo que se ha alterado de alguna manera (por ejemplo, mutado, adicionado en múltiples copias, vinculado a un promotor no nativo o polinucleótido de potenciador, etc.). Los genes heterólogos pueden comprender, además, polinucleótidos de genes vegetales que comprenden formas de ADNc de un gen vegetal; los ADNc se pueden expresar en una orientación sentido (para producir ARNm) o antisentido (para producir un transcrito de ARN antisentido que sea complementario del transcrito de ARNm). En un aspecto de la divulgación, los genes heterólogos se distinguen de los genes

vegetales endógenos en que los polinucleótidos de genes heterólogos normalmente están unidos a polinucleótidos que comprenden elementos reguladores tales como promotores que no se encuentran asociados de forma natural al gen para la proteína codificada por el gen heterólogo o con polinucleótidos de genes vegetales en el cromosoma, o están asociados a porciones del cromosoma que no se encuentran en la naturaleza (por ejemplo, genes expresados en *loci* donde el gen no se expresa normalmente). Además, un polinucleótido "heterólogo" se refiere a un polinucleótido que no está asociado de forma natural con una célula hospedadora en la cual se introduce, incluyendo múltiples copias no naturales de un polinucleótido natural.

Los términos y expresiones "aumentar", "que aumenta", "aumentado", "potenciar", "potenciado", "que potencia" y "potenciación" y términos similares, como se utilizan en el presente documento, describen una elevación en control de una plaga de plantas, por ejemplo, poniendo en contacto una plaga con una planta de la divulgación (tal como, por ejemplo, mediante métodos de expresión transgénica o mediante aplicación tópica). El aumento en el control puede referirse al nivel de control de la plaga de plantas en ausencia de una molécula de ácido nucleico de la divulgación (por ejemplo, una planta que no comprende la molécula de ácido nucleico). Por tanto, en las realizaciones, los términos "aumentar",

"que aumenta", "aumentado", "potenciar", "potenciado", "que potencia", y "potenciación" y términos similares pueden indicar una elevación de al menos aproximadamente un 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 5 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 100 %, 125 %, 150 %, 200 %, 300 %, 400 %, 500 % o más en comparación con un control adecuado (por ejemplo, una planta, una parte de una planta, una célula vegetal que no comprende la molécula de ácido nucleico).

10 El término "identidad" o "idéntico", en el contexto de dos secuencias de ácido nucleico o de aminoácidos, se refiere al porcentaje de nucleótidos o de aminoácidos idénticos en una secuencia lineal del polinucleótido o de aminoácidos de una secuencia de referencia ("consulta") (o su hebra 15 complementaria), en comparación con una secuencia de prueba ("de interés"), cuando se alinean globalmente las dos secuencias. A menos que se indique lo contrario, como se utiliza en el presente documento, la identidad de secuencia se refiere al valor obtenido usando el algoritmo de Needleman y Wunsch ((1970) J. Mol. Biol. 48:443-453) implementado en la 20 herramienta de alineamiento EMBOSS Needle usando archivos de matriz por defecto EBLOSUM62 para la proteína con los parámetros por defecto (Apertura de hueco = 10, Extensión de hueco = 0.5, Penalización por hueco final = Falso, Apertura de hueco final = 10, Extensión de hueco final = 0.5) o 25

DNAfull para ácidos nucleicos con los parámetros por defecto (Abertura de hueco = 10, Extensión de hueco = 0.5, Penalización por hueco final = Falso, Apertura de hueco final = 10, Extensión de hueco final = 0.5); o cualquier programa
5 equivalente de los mismos. EMBOSS Needle está disponible, por ejemplo, en EMBL-EBI, por ejemplo, en el siguiente sitio web: ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/ y como se describe en la siguiente publicación: "The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019." Madeira et al. Nucleic Acids
10 Research, junio de 2019, 47 (W1): W636-W641. Como se utiliza en el presente documento, la expresión "programa equivalente" se refiere a cualquier programa para la comparación de secuencias que, para dos secuencias cualesquiera en cuestión, genera un alineamiento con emparejamientos de nucleótidos o
15 residuos aminoacídicos idénticos y un porcentaje de identidad entre secuencias idéntico en comparación con el alineamiento correspondiente generado por EMBOSS Needle. En algunas realizaciones, las secuencias de ácidos nucleicos o de aminoácidos sustancialmente idénticas pueden realizar
20 sustancialmente la misma función.

En algunas realizaciones, los polinucleótidos o los polipéptidos de la divulgación están "aislados". La expresión polinucleótido o polipéptido "aislado" es un polinucleótido o un polipéptido que ya no existe en su ambiente natural. Un
25 polinucleótido o polipéptido aislado de la divulgación puede

existir en una forma purificada o puede existir en un
hospedador recombinante tal como en una bacteria transgénica
o una planta transgénica. Por lo tanto, en algunas
realizaciones, una molécula de ácido nucleico "aislada"
5 abarca una molécula de ácido nucleico cuando la molécula de
ácido nucleico está comprendida dentro del genoma de una
planta transgénica.

El término "aislado", cuando se utiliza en el contexto
de las moléculas de ácido nucleico o polinucleótidos de la
10 presente divulgación, se refiere a un polinucleótido que se
identifica en su contexto polinucleotídico cromosómico y se
aisla/separa de éste dentro del respectivo organismo fuente.
Un ácido nucleico o polinucleótido aislado no es un ácido
nucleico tal y como se presenta en su contexto natural, si
15 bien sí que tiene un equivalente natural. Por el contrario,
los ácidos nucleicos no aislados son ácidos nucleicos tales
como ADN y ARN, que se encuentran en el estado en el que
existen en la naturaleza. Por ejemplo, un polinucleótido
determinado (por ejemplo, un gen) se encuentra en el
20 cromosoma de célula hospedadora en proximidad a genes
vecinos. La molécula de ácido nucleico aislado podrá estar
presente en una forma monocatenaria o bicatenaria.
Alternativamente, puede contener las hebras homsentido y
antisentido (es decir, la molécula de ácido nucleico puede

ser de doble hebra). En algunas realizaciones, las moléculas de ácido nucleico de la presente divulgación están aisladas.

Como se utiliza en la presente, el término "maíz" incluye *Zea mays* y todas las variedades de plantas que se pueden criar con *Zea mays*, incluyendo especies de maíz silvestres. El término "maíz" y "choclo" se usan de manera intercambiable en el presente documento.

El término "motivo" o "secuencia de consenso" o "firma" se refiere a una región conservada corta en la secuencia de proteínas relacionadas evolutivamente. Los motivos son con frecuencia partes altamente conservadas de dominios, pero también pueden incluir sólo parte del dominio, o ubicarse fuera del dominio conservado (si todos los aminoácidos del motivo caen fuera de un dominio definido).

Un ácido nucleico, polinucleótido, secuencia de nucleótidos, polipéptido o secuencia de aminoácidos "nativa" o "de tipo silvestre" se refiere a un ácido nucleico, polinucleótido, secuencia de nucleótidos, polipéptido o secuencia de aminoácidos de origen natural o endógena.

Una "molécula de ácido nucleico" o "ácido nucleico" o "polinucleótido" (que se usan indistintamente en el presente documento) es un segmento de ADN o ARN monocatenario, bicatenario o parcialmente bicatenario, o un híbrido de los mismos, que puede aislarse o sintetizarse a partir de cualquier fuente. En el contexto de la presente divulgación,

la molécula de ácido nucleico es normalmente un segmento de ADN. En algunas realizaciones, las moléculas de ácido nucleico de la divulgación son moléculas de ácido nucleico aisladas. En algunas realizaciones, las moléculas de ácido nucleico de la divulgación están comprendidas dentro de un vector, una planta, una célula vegetal o una célula bacteriana. Los términos también incluyen referencia a un desoxirribopolinucleótido, ribopolinucleótido o análogos de los mismos que tienen la naturaleza esencial de un ribonucleótido natural en que se hibridan, en condiciones de hibridación rigurosas, a sustancialmente la misma secuencia de nucleótidos que los nucleótidos que se presentan naturalmente y/o permiten la traducción en los mismos aminoácidos que los nucleótidos que se presentan naturalmente. Una molécula de ácido nucleico puede estar completa o ser una subsecuencia de un gen natural o heterólogo estructural o regulador. Salvo que se indique lo contrario, el término incluye la referencia a la secuencia especificada, así como la secuencia complementaria de la misma. De este modo, los ADN o ARN con cadenas modificadas para obtener estabilidad o por otras razones son "polinucleótidos" según el sentido que se le da al término en el presente documento. Además, los ADN o ARN que comprenden bases inusuales, tal como inosina o bases modificadas, tal como bases tritiladas, por nombrar sólo dos ejemplos, son

polinucleótidos como se utiliza el término en la presente. Se debe tener en cuenta que se han realizado una gran variedad de modificaciones en el ADN y ARN que tienen muchos propósitos útiles conocidos por los expertos en la técnica.

5 El término polinucleótido, tal como se emplea en la presente, abarca estas formas de manera química, enzimáticamente o de manera metabólica modificadas de polinucleótidos, así como las formas químicas de ADN y ARN características de virus y células, que incluyen, inter alia, células simples y
10 complejas.

La expresión "unido operativamente" se refiere a la asociación de polinucleótidos en una única molécula de ácido nucleico de modo que la función de uno afecte a la función del otro. Por ejemplo, un promotor se vincula operativamente
15 con un polinucleótido de codificación cuando es capaz de afectar la expresión de ese polinucleótido de codificación (es decir, que el polinucleótido de codificación está bajo el control transcripcional del promotor). Un polinucleótido codificante en una orientación sentido o antisentido puede
20 estar unido operativamente a polinucleótidos reguladores.

El término "planta" incluye referencia a plantas enteras, órganos vegetales, tejidos vegetales (por ejemplo, hojas, tallos, raíces, etc.), semillas y células vegetales y progenie de las mismas. La expresión "célula vegetal", tal
25 como se utiliza en el presente documento, incluye, sin

carácter limitante, semillas, cultivos en suspensión, embriones, regiones meristemáticas, tejido calloso, hojas, raíces, brotes, gametofitos, esporofitos, polen y microsporas. La clase de plantas que se pueden utilizar en los métodos de la divulgación es generalmente tan amplia como la clase de plantas superiores que se pueden someter a las técnicas de transformación, incluidas las plantas tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas, que incluyen especies de los géneros: Cucurbita, Rosa, Vitis, Juglans, Fragaria, Lotus, Medicago, Onobrychis, Trifolium, Trigonella, Vigna, Cítricos, Linum, Geranio, Manihot, Daucus, Arabidopsis, Brassica, Raphanus, Sinapis, Atropa, Capsicum, Datura, Hyoscyamus, Lycopersicon, Nicotiana, Solanum, Petunia, Digitalis, Majorana, Cichorium, Helianthus, Lactuca, Bromus, Espárragos, Antirrhinum, Heterocallis, Némesis, Pelargonium, Panicleum, Pennisetum, Ranunculus, Senecio, Salpiglossis, Cucumis, Browallia, Glicina, Pisum, Phaseolus, Lolium, Oryza, Avena, Hordeum, Secale, Allium y Triticum. Una planta particularmente preferida es maíz.

Una "célula vegetal" es una unidad estructural y fisiológica de una planta, que comprende un protoplasto y una pared celular. La célula vegetal puede estar en forma de una célula individual aislada o una célula cultivada, o como parte de una unidad más organizada, tal como, por ejemplo, tejido vegetal, un órgano vegetal o una planta completa.

La expresión "cultivo de células vegetales" se refiere a los cultivos de unidades vegetales tales como, por ejemplo, protoplastos, células de cultivo celular, células de tejidos vegetales, polen, tubos polínicos, óvulos, sacos embrionarios, cigotos y embriones en diferentes fases de desarrollo.

"Material vegetal" se refiere a hojas, tallos, raíces, flores o partes de flores, frutos, polen, óvulos, cigotos, semillas, esquejes, cultivos de células o tejidos, o cualquier otra parte o producto de una planta.

Un "órgano vegetal" es una parte distinta y visiblemente estructurada y diferenciada de una planta, tal como una raíz, un tallo, una hoja, un botón floral o un embrión.

Como se usa en la presente, "material de planta", "parte de planta" o "tejido de planta" significa células de planta, protoplastos de planta, cultivos de tejido de célula vegetal a partir de los cuales se pueden regenerar plantas, callos de planta, matas de plantas, y células de planta que están intactas en plantas o partes de plantas tal como embriones, polen, óvulos, semillas, hojas, flores, ramas, fruta, granos, elotes, mazorcas, cáscaras, tallos, raíces, puntas de raíz, anteras, tubérculos, rizomas y similares. Cualquier tejido de una planta en planta o en cultivo está incluido en el término "tejido vegetal".

Las expresiones "muestra vegetal" o "muestra biológica", tal como se utilizan en el presente documento, se refieren a tejido vegetal tanto intacto como no intacto (por ejemplo, semillas o tejido vegetal molidos, tejido vegetal troceado, tejido liofilizado). También puede ser un extracto que comprenda semillas o tejido vegetal intactos o no intactos. La muestra o extracto biológico se puede seleccionar del grupo constituido por harina de maíz, semola de maíz, jarabe de maíz, aceite de maíz, almidón de maíz, y cereales fabricados en su totalidad o en parte para contener subproductos de maíz.

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

Una "porción" o un "fragmento" de un polipéptido de la divulgación se entenderán que significan una secuencia de aminoácidos o una secuencia de ácido nucleico de longitud reducida en relación con una secuencia de aminoácidos o una

secuencia de ácido nucleico de referencia de la divulgación. Dicha porción o fragmento de acuerdo con la divulgación puede incluirse, cuando sea apropiado, en un polipéptido o ácido nucleico más grande del cual es un constituyente (por ejemplo, una proteína marcada o de fusión o un casete de expresión). En realizaciones, la "porción" o el "fragmento" conserva sustancialmente la actividad, tal como actividad insecticida (por ejemplo, al menos un 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o incluso un 100 % de la actividad) de la proteína o el ácido nucleico completos, o tiene una actividad incluso mayor, por ejemplo, actividad insecticida, que la proteína completa).

Como se usa en el presente documento, "propágulo" se refiere a cualquier material que se usa para propagar una planta, preferentemente una planta transgénica. Un propágulo puede ser una semilla, esqueje o pluralidad de células de una planta transgénica, que se puede utilizar para producir un cultivo de plantas transgénicas.

Los términos "proteína", "péptido" y "polipéptido" se utilizan indistintamente en el presente documento.

El término "promotor", como se utiliza en la presente, se refiere a un polinucleótido, usualmente en dirección (5') del sitio de inicio de la traducción de una secuencia de codificación, que controla la expresión de la secuencia de codificación al proporcionar el reconocimiento de la ARN

polimerasa y otros factores requeridos para la transcripción adecuada. Por ejemplo, un promotor puede contener una región que contiene elementos promotores basales reconocidos por la ARN polimerasa, una región que contiene la región no traducida (UTR) en 5' de una secuencia codificante y, 5 opcionalmente, un intrón.

Un "promotor sin polen" es un promotor que dirige una expresión génica baja o no detectable en el polen de la especie vegetal objetivo. La cuantificación de los 10 transcritos de ARNm de una proteína de interés en el polen podría medirse mediante varios métodos que incluyen qRT-PCR/RNA-Seq; la proteína se puede medir mediante la metodología ELISA y la inmunoelectrotransferencia habitualmente utilizadas. Un promotor se considera sin polen 15 en esta divulgación si el promotor dirige la expresión de una proteína de la divulgación a <10 ng/mg de TSP (proteína soluble total) en el polen.

Como se utiliza en el presente documento, el término "recombinante" se refiere a una forma de ácido nucleico (por 20 ejemplo, ADN o ARN), proteína, célula, tejido, organismo y similares que normalmente no se encontraría en la naturaleza y, como tal, fue creado por intervención humana. Como se utiliza en el presente documento, una "molécula de ácido nucleico recombinante" es una molécula de ácido nucleico que 25 comprende una combinación de polinucleótidos que no se

presentarían juntos de forma natural y es el resultado de la intervención humana, por ejemplo, una molécula de ácido nucleico que está formada por una combinación de al menos dos polinucleótidos heterólogos entre sí, o una molécula de ácido nucleico sintetizada artificialmente, por ejemplo, un polinucleótido sintetizado utilizando una secuencia de nucleótidos ensamblada, y comprende un polinucleótido que se desvía del polinucleótido que normalmente existiría en la naturaleza, o una molécula de ácido nucleico que comprende un transgén incorporado artificialmente en un ADN genómico de una célula hospedadora y el ADN flanqueante asociado del genoma de la célula hospedadora. Otro ejemplo de una molécula de ácido nucleico recombinante es una molécula de ADN que es el resultado de la inserción de un transgén en el ADN genómico de una planta, que en última instancia puede dar como resultado la expresión de un ARN recombinante o una molécula de proteína en ese organismo. Como se utiliza en el presente documento, una "planta recombinante" es una planta que normalmente no existiría en la naturaleza, que es el resultado de la intervención humana y que contiene un transgén o una molécula de ácido nucleico heterólogo que puede incorporarse en su genoma. Como resultado de dicha alteración genómica, la planta recombinante es claramente diferente de la planta natural relacionada. Una bacteria "recombinante" es una bacteria que no se encuentra en la

naturaleza que comprende una molécula de ácido nucleico heterólogo. Dicha bacteria puede crearse transformando la bacteria con la molécula de ácido o mediante una transferencia de tipo conjugación de un plásmido de una cepa de bacteria a otra, mediante lo cual el plásmido comprende la molécula de ácido nucleico.

Los términos "reducir", "reducido", "reduciendo", "reducción", "disminuir" y "suprimir" (y las variaciones gramaticales de los mismos) y términos similares, como se usan en el presente documento, se refieren a una disminución en la supervivencia, el crecimiento y/o la reproducción de una plaga de plantas, por ejemplo, poniendo en contacto una plaga con una planta de la divulgación. Esta disminución en la supervivencia, el crecimiento y/o la reproducción puede ser en referencia al nivel observado en ausencia de una molécula de ácido nucleico de la divulgación (por ejemplo, una planta que no comprende la molécula de ácido nucleico). Por lo tanto, en las realizaciones, los términos "reducir", "reducido", "que reduce", "reducción", "disminuir" y "suprimir" (y variaciones gramaticales de estos) y términos similares se refieren a una disminución de al menos aproximadamente un 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o más en comparación con una planta que no se pone en contacto con una molécula de ácido nucleico de la

divulgación (por ejemplo, una planta que no comprende la molécula de ácido nucleico). En realizaciones representativas, la reducción da como resultado un nivel nulo o esencialmente nulo (es decir, una cantidad insignificante, por ejemplo, menos de aproximadamente un 10 %, menos de aproximadamente un 5 % o incluso menos de aproximadamente un 1 %) de supervivencia, crecimiento y/o reproducción detectable de la plaga de plantas.

"Elementos reguladores" se refieren a secuencias de nucleótidos situadas secuencia arriba (secuencias no codificantes en 5'), dentro de o secuencia abajo (secuencias no codificantes en 3') de una secuencia codificante y que afectan a la transcripción, el procesamiento o a la estabilidad del ARN o a la traducción de la secuencia codificante asociada. Las secuencias reguladoras incluyen potenciadores, promotores, secuencias potenciadoras de la traducción, intrones, terminadores y secuencias de señal de poliadenilación. Incluyen secuencias naturales y sintéticas, así como secuencias que pueden ser una combinación de secuencias naturales y sintéticas. Las secuencias reguladoras pueden determinar el nivel de expresión, el patrón de expresión espacial y temporal y, para un subconjunto de promotores, la expresión en condiciones de inducción (regulación por parte de factores externos tales como luz, temperatura, sustancias químicas y hormonas).

Como se utiliza en el presente documento, "marcador de selección" significa una secuencia de nucleótidos que, cuando se expresa, confiere un fenotipo distintivo a la planta, parte de planta y/o célula vegetal que expresa el marcador, y permite así diferenciar dichas plantas, partes de planta y/o células vegetales transformadas de aquellas que no tienen el marcador. Dicha secuencia de nucleótidos puede codificar un marcador de selección o de cribado, dependiendo de si el marcador confiere un rasgo que se puede seleccionar de un modo químico, tal como utilizando un agente selectivo (por ejemplo, un antibiótico, herbicida o similares) o de si el marcador es simplemente un rasgo que se puede identificar mediante observación o análisis, tal como mediante un cribado (por ejemplo, el rasgo del locus R).

Las expresiones "condiciones rigurosas" o "condiciones de hibridación rigurosas" incluyen la referencia a condiciones en las que un ácido nucleico hibridará selectivamente con una secuencia objetivo, en un grado detectablemente mayor que otras secuencias (por ejemplo, al menos 2 veces con respecto a una secuencia no objetivo) y opcionalmente podrá excluir sustancialmente la unión a secuencias no objetivo. Las condiciones rigurosas dependen de la secuencia y variarán en diferentes circunstancias. Controlando la rigurosidad de las condiciones de hibridación y/o de lavado, se pueden identificar secuencias objetivo que

pueden presentar hasta un 100 % de complementariedad con respecto a la secuencia de nucleótidos de referencia. Como alternativa, se pueden emplear condiciones de rigurosidad moderada o incluso baja para permitir ciertas discordancias en las secuencias, de forma que se detecten grados de similitud de secuencia menores. Por ejemplo, los expertos en la técnica apreciarán que para actuar como un cebador o una sonda, una secuencia de ácido nucleico únicamente necesita ser lo suficientemente complementaria con la secuencia objetivo para unirse sustancialmente a la misma de modo que forme una estructura bicatenaria estable en las condiciones empleadas. Por lo tanto, se pueden utilizar cebadores o sondas en condiciones de rigurosidad elevada, moderada o incluso baja. De manera similar, las condiciones de rigurosidad baja o moderada pueden ser ventajosas para detectar secuencias homólogas, ortólogas y/o parálogas que tengan grados más bajos de identidad de secuencia que los que se identificarían en condiciones altamente rigurosas. Habitualmente, las condiciones rigurosas son aquellas en las que la concentración de sal es menor que aproximadamente 1.5 M de ion de Na, de manera habitual aproximadamente 0.01 a 1.0 M de concentración de ion de Na (u otras sales) a aproximadamente pH 7.0 a pH 8.3 y la temperatura es al menos aproximadamente 30°C para sondas cortas (por ejemplo, 10 a 50 nucleótidos) y al menos aproximadamente 60°C para sondas más

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

alternativa con un lavado en 0.1X SSC, 0.1% de SDS a 50 °C, o incluso con un lavado en 0.1X SSC, 0.1% de SDS a 65°C. Los expertos en la técnica apreciarán que la especificidad normalmente es una función de los lavados poshibridación, siendo factores relevantes la fuerza iónica y la temperatura de la solución de lavado final.

"Transformación estable" o "transformado de forma estable", como se usa en el presente documento, significa que un ácido nucleico se introduce en una célula y se integra en el genoma de la célula. Como tal, el ácido nucleico integrado puede ser heredado por su progenie, más particularmente, por la progenie de múltiples generaciones sucesivas. "Genoma", como se usa en el presente documento, también incluye el genoma nuclear y el del plastidio y, por lo tanto, incluye la integración del ácido nucleico en, por ejemplo, el genoma del cloroplasto. La transformación estable, como se usa en el presente documento, también puede referirse a un transgén que se mantiene de manera extracromosómica, por ejemplo, como un minicromosoma.

Como se usa en el presente documento, un "apilamiento" de genes o rasgos es la combinación de genes o rasgos deseados en una línea vegetal transgénica. Como un enfoque, los fitogenetistas apilan rasgos transgénicos al hacer cruces entre los padres que cada uno tiene un rasgo deseado y entonces identificando la descendencia que tiene ambas de

estos rasgos deseados (los llamados "apilamientos de reproducción"). Otra forma de apilar genes es por la transferencia de dos o más genes en el núcleo de célula de una planta al mismo tiempo durante la transformación. Otro modo de apilar genes consiste en retransformar una planta transgénica con otro gen de interés. Por ejemplo, se puede utilizar el apilamiento génico para combinar dos rasgos de resistencia a insectos diferentes, un rasgo de resistencia a insectos y un rasgo de resistencia enfermedades, o un rasgo de resistencia a herbicidas (tal como, por ejemplo, Bt11). El uso de un marcador seleccionable además de un gen de interés también se consideraría apilamiento de genes.

"Sintético" se refiere a una secuencia de nucleótidos que comprende bases o una característica estructural que no está presentes en la secuencia natural. Por ejemplo, se dice que una secuencia artificial que codifica una proteína de la divulgación que se parece más al contenido de G+C y la distribución normal de codones de genes de plantas dicotiledóneas o monocotiledóneas es sintética.

Como se usa en este documento, una proteína de la divulgación que es "tóxica" para una plaga de insectos significa que la proteína actúa como un agente de control de insectos activo por vía oral para exterminar la plaga de insectos, o que la proteína es capaz de alterar o deteriorar la alimentación de los insectos, o que provoca la inhibición

del crecimiento de la plaga de insectos, ambos de los cuales pueden o no provocar la muerte del insecto. Cuando una proteína tóxica de la divulgación se suministra a un insecto o un insecto entra en contacto oral con la proteína tóxica, el resultado es normalmente la muerte del insecto, o el crecimiento del insecto se ralentiza, o el insecto deja de alimentarse de la fuente que hace que la proteína tóxica esté disponible para el insecto.

Las expresiones "fragmento de toxina" y "porción de toxina" se utilizan indistintamente en el presente documento para referirse a un fragmento o porción de una proteína insecticida más larga (por ejemplo, completa) de la divulgación, donde el "fragmento de toxina" o "la porción de toxina" mantiene la actividad insecticida. Por ejemplo, en la técnica se sabe que las proteínas Cry naturales se expresan como protoxinas que son procesadas en los extremos aminoterminal y carboxiterminal para producir una toxina madura. En algunas realizaciones, el "fragmento de toxina" o la "porción de toxina" de una proteína insecticida quimérica de la divulgación está truncado en el aminoterminal y/o carboxiterminal. En algunas realizaciones, el "fragmento de toxina" o la "porción de toxina" se trunca en el aminoterminal para eliminar parte o la totalidad del fragmento peptídico aminoterminal y, opcionalmente, comprende al menos aproximadamente 400, 425, 450, 475, 500, 510, 520,

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

2, y el dominio de núcleo 3. En las realizaciones, el "fragmento de toxina" o "porción de toxina" es la toxina madura (es decir, procesada) (por ejemplo, toxina Cry).

"Transformación" es un proceso para introducir ácido nucleico heterólogo en una célula u organismo hospedador. En realizaciones particulares, "transformación" significa la integración estable de una molécula de ADN en el genoma (nuclear o plastídico) de un organismo de interés. En algunas realizaciones particulares, la introducción en una planta, parte de planta y/o célula vegetal se realiza mediante una transformación mediada por bacterias, transformación por bombardeo de partículas, transformación mediada por fosfato de calcio, transformación mediada por ciclodextrinas, electroporación, transformación mediada por liposomas, transformación mediada por nanopartículas, transformación mediada por polímeros, suministro de ácidos nucleicos mediado por virus, suministro de ácidos nucleicos mediado por filamentos finos, microinyección, aplicación de ultrasonidos, infiltración, transformación mediada por polietilenglicol, transformación del protoplasto o cualquier otro mecanismo eléctrico, químico, físico y/o biológico que dé como resultado la introducción de ácido nucleico en la planta, parte de la planta y/o célula de la misma, o una combinación de los mismos. Los procedimientos para transformar plantas son bien conocidos y rutinarios en la técnica y se describen

por toda la bibliografía. Los ejemplos no limitativos de métodos para transformar plantas incluyen la transformación mediante el suministro de ácidos nucleicos mediado por bacterias (por ejemplo, mediante bacterias del género Agrobacterium), suministro de ácidos nucleicos mediado por virus, suministro de ácidos nucleicos mediado por carburo de silicio o filamentos finos, suministro de ácidos nucleicos mediado por liposomas, microinyección, bombardeo de micropartículas, transformación mediada por fosfato de calcio, transformación mediada por ciclodextrinas, electroporación, transformación mediada por nanopartículas, aplicación de ultrasonidos, infiltración, captación de ácidos nucleicos mediada por PEG, así como también cualquier otro mecanismo eléctrico, químico, físico (mecánico) y/o biológico que dé como resultado la introducción de ácido nucleico en la célula vegetal, incluyendo cualquier combinación de los mismos. Algunas guías generales sobre varios métodos de transformación de plantas conocidos en la técnica incluyen Miki et al. ("Procedures for Introducing Foreign DNA into Plants" en Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology, Glick, B. R. y Thompson, J. E., Eds. (CRC Press, Inc., Boca Ratón, 1993), páginas 67-88) y Rakowoczy-Trojanowska (2002, Cell Mol Biol Lett 7:849-858 (2002)).

"Transformado" y "transgénico" se refieren a un organismo hospedador tal como una bacteria o una planta en la

que se ha introducido una molécula de ácido nucleico heterólogo. La molécula de ácido nucleico se puede integrar de forma estable en el genoma del hospedador o la molécula de ácido nucleico también puede estar presente como una molécula extracromosómica. Una molécula extracromosómica de este tipo puede autorreplicarse. Se entiende que las células, tejidos o plantas transformadas abarcan no sólo el producto final de un proceso de transformación, sino también la progenie transgénica de este. Un hospedador "no transformado", "no transgénico" o "no recombinante" se refiere a un organismo tipo silvestre, por ejemplo, una bacteria o planta, que no contiene la molécula de ácido nucleico heterólogo.

El término "planta transgénica" incluye la referencia a una planta en la que se ha introducido una molécula de ácido nucleico heterólogo. Generalmente, la secuencia de ácido nucleico heterólogo se integra de forma estable en el genoma, de manera que la secuencia de ácido nucleico se transmite a las sucesivas generaciones. La secuencia de ácido nucleico heterólogo se puede integrar en el genoma sola o como parte de un casete de expresión recombinante. "Transgénico" se utiliza en la presente para incluir cualquier célula, línea celular, callo, tejido, parte de planta o planta, cuyo genotipo se ha alterado por la presencia de una secuencia de ácido nucleico heterólogo, que incluye aquellos transgénicos inicialmente alterados de esta manera, así como aquellos

creados por cruces sexuales o propagación asexual a partir del transgénico inicial.

El término "vector" se refiere a una composición para transferir, administrar o introducir un ácido nucleico (o ácidos nucleicos) en una célula. Un vector comprende una molécula de ácido nucleico que comprende las secuencias de nucleótidos que se van a transferir, administrar o introducir. Los vectores ilustrativos incluyen un plásmido, cósmido, fagémido, cromosoma artificial, fago o vector vírico.

El término "rendimiento" podrá incluir la referencia a busheles por acre de un cultivo de grano en la recolección, que se ajusta para tener en cuenta la humedad del grano (habitualmente un 15 % para el maíz, por ejemplo) y el volumen de biomasa generado (para cultivos forrajeros tales como alfalfa y el tamaño de la raíz de las plantas para múltiples cultivos). La humedad del grano se mide en el grano en el momento de la recolección. Se determina que el peso de prueba ajustado del grano es el peso en libras por fanega, ajustado para el nivel de humedad de grano en la recolección. La biomasa se mide como el peso del material vegetal cosechable generado. El rendimiento se puede ver afectado por muchas propiedades que incluyen, sin limitación, la altura de planta, el número de vainas, la posición de vaina en la planta, el número de entrenudos, la incidencia de rotura de

vainas, el tamaño de grano, la eficiencia de nodulación y fijación de nitrógeno, la eficiencia de asimilación de nutrientes, la asimilación de carbono, la arquitectura de planta, el porcentaje de germinación de semillas, el vigor de plántulas, y los rasgos juveniles. El rendimiento también se puede ver afectado por la eficiencia de la germinación (incluyendo la germinación en condiciones de estrés), la tasa de crecimiento (incluyendo la tasa de crecimiento en condiciones estresadas), el número de elotes, el número de semillas por mazorca, el tamaño de semillas, la composición de semillas (almidón, aceite, proteína) y las características del relleno de semillas. El rendimiento de una planta se puede medir de distintas maneras, incluyendo el peso de ensayo, el número de semillas por planta, el peso de las semillas, el número de semillas por unidad de área (es decir, las semillas o el peso de las semillas por acre), fanegas por acre, toneladas por acre o kilo por hectárea. Por ejemplo, el rendimiento del maíz puede medirse como la producción de granos de maíz descascarados por unidad de área de producción, por ejemplo, en fanegas por acre o toneladas métricas por hectárea, que se indica a menudo de un modo ajustado teniendo en cuenta la humedad, por ejemplo, con una humedad de un 15.5 por ciento. Además, un bushel de maíz se define por ley en el Estado de Iowa como 56 libras en peso, un factor de conversión útil para el rendimiento del maíz es:

100 fanegas por acre (1 acre = 0.404686 hectáreas) es
equivalente a 6.272 toneladas métricas por hectárea. Otras
medidas para el rendimiento son una práctica habitual en la
técnica. En ciertas realizaciones de la divulgación, el
5 rendimiento se puede incrementar en condiciones estresadas
y/o no estresadas.

Moléculas de ácido nucleico

La presente divulgación proporciona composiciones y
métodos para controlar plagas de plantas dañinas. En
10 particular, la presente divulgación proporciona una molécula
de ácido nucleico que, cuando se expresa en una célula,
confiere propiedades insecticidas a la célula, por ejemplo,
actividad insecticida contra plagas de lepidópteros tales
como *Spodoptera frugiperda* (gusano cogollero).

15 Se produjeron múltiples construcciones diferentes para
determinar la eficacia y el impacto agronómico de la una o
más proteínas expresadas en el contexto de diferentes casetes
de expresión. Sorprendentemente, un vector, SEQ ID NO: 2,
cuando se transforma en plantas de maíz confirió excelentes
20 propiedades insecticidas sin o con efectos negativos mínimos
sobre el desarrollo vegetativo o la fertilidad de la planta
transgénica. El casete de expresión a partir del vector es
SEQ ID NO: 1.

Un experto reconocería que durante la inserción de una
25 molécula de ácido nucleico, tal como SEQ ID NO: 1, en una

célula, los extremos 5' y/o 3' de la molécula insertada se podrán eliminar o reorganizar. Puede que dichas eliminaciones o reorganizaciones no afecten a la función de la molécula insertada y estos cambios relativamente pequeños dan como resultado una molécula insertada que se puede considerar que es sustancialmente idéntica a la SEQ ID NO: 1. Un experto también reconocería que la molécula de ácido nucleico, tal como una que comprende SEQ ID NO: 1, puede experimentar rearmiento o duplicación total o parcial durante el evento de inserción, tal que la molécula insertada sea un rearmiento o duplicación total o parcial de la molécula de ácido nucleico de inicio. Un experto en la materia reconocería que esta molécula insertada puede tener aún las mismas características y/o rasgos que la molécula de partida, de modo que la molécula insertada es sustancialmente idéntica a la SEQ ID NO: 1, y la célula transformada o la planta transformada resultante aún puede ser deseable.

Un experto en la técnica reconocería que un transgén para uso comercial, tal como una molécula de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 1, puede necesitar modificaciones relativamente menores en la secuencia de ácido nucleico para cumplir las normas reglamentarias gubernamentales. Dichas modificaciones no deben afectar la función de la molécula resultante, que sería sustancialmente idéntica a la SEQ ID NO: 1. Un experto reconocería que la

molécula de ácido nucleico modificada sería esencialmente la misma que la molécula de inicio.

Por lo tanto, la divulgación también abarca una molécula de ácido nucleico sustancialmente idéntica a SEQ ID NO: 1, donde ciertos nucleótidos de la SEQ ID NO: 1 se eliminan, sustituyen o rearreglan, dando por resultado una SEQ ID NO:1 mutada y en donde la funcionalidad de la SEQ ID NO:1 mutada es la misma que la molécula de inicio. Por consiguiente, en algunos aspectos, la divulgación proporciona una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que es idéntica en al menos un 90 % a la SEQ ID NO: 1 (por ejemplo, idéntica en al menos un 90 % a la SEQ ID NO: 1, idéntica en al menos un 91 % a la SEQ ID NO: 1, idéntica en al menos un 92 % a la SEQ ID NO: 1, idéntica en al menos un 93 % a la SEQ ID NO: 1, idéntica en al menos un 94 % a la SEQ ID NO: 1, idéntica en al menos un 95 % a la SEQ ID NO: 1, idéntica en al menos un 96 % a la SEQ ID NO: 1, al menos 97% idéntica a SEQ ID NO: 1, al menos 98% idéntica a SEQ ID NO: 1, idéntica en al menos el 99 % a SEQ ID NO: 1, o idéntica en al menos un 99.5 % a SEQ ID NO: 1), o el complemento de la misma. En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico codifica la misma o mismas proteínas codificadas por la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico comprende una cualquiera de las SEQ ID NO: 1 u 8 a 31 o una o varias de las variantes en la tabla 3. En

algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico produce una o más proteínas que son insecticidas contra una o más plagas de lepidópteros, por ejemplo, insecticidas contra al menos *Spodoptera frugiperda* (gusano cogollero). En algunas

5 realizaciones, la molécula de ácido nucleico produce proteínas que son insecticidas contra al menos dos (por ejemplo, 2, 3 o 4) de *Spodoptera frugiperda* (gusano cogollero), *Mythimna separata* (gusano cogollero oriental), *Spodoptera litura* (gusano cortador común/gusano foliar

10 oriental) y *Ostrinia furnacalis* (barrenador asiático del maíz). En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico está aislada. En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico está presente en una planta.

Las una o más proteínas insecticidas codificadas por una

15 molécula de ácido nucleico de la divulgación (por ejemplo, una cualquiera de las SEQ ID NO: 1 u 8 a 31 o una o varias de las variantes de la tabla 3) tienen actividad insecticida contra plagas de lepidópteros. En algunas realizaciones, las una o más proteínas insecticidas tienen actividad frente a

20 uno o más de los siguientes ejemplos no limitantes de una plaga de lepidópteros: *Spodoptera* spp. tal como *S. frugiperda* (gusano cogollero), *S. littoralis* (gusano foliar egipcio del algodón), *S. ornithogalli* (cogollero de bandas amarillas), *S. praefica* (cogollero de bandas amarillas del oeste), *S.*

25 *eridania* (gusano soldado del sur), *S. litura* (Gusano cortador

común/Gusano de la hoja oriental), *S. cosmioides* (gusano cogollero negro), *S. exempta* (gusano cogollero africano), *S. mauritia* (gusano cogollero del césped) y/o *S. exigua* (gusano militar de la remolacha); *Ostrinia* spp. tal como *O. nubilalis* (barrenador europeo del maíz) y/o *O. furnacalis* (barrenador asiático del maíz); *Plutella* spp. tal como *P. xylostella* (polilla de espalda de diamante); *Agrotis* spp. tal como *A. ipsilon* (gusano cortador negro), *A. segetum* (gusano cortador común), *A. gladiaria* (gusano cortador granuloso), y/o *A. orthogonia* (gusano cortador del oeste pálido); *Striacosta* spp. tal como *S. albicosta* (gusano cortador del oeste del frijol); *Helicoverpa* spp. tal como *H. zea* (gusano cogollero del maíz/gusano de la vaina de la soya), *H. punctigera* (gusano nativo de los frutos), y/o *H. armigera* (oruga del algodón); *Heliothis* spp. tal como *H. virescens* (gusano del tabaco); *Diatraea* spp. tal como *D. grandiosella* (barrenador del maíz del suroeste) y/o *D. saccharalis* (barrenador de la caña de azúcar); *Trichoplusia* spp. tal como *T. ni* (oruga de la col); *Sesamia* spp. tal como *S. nonagroides* (Barrenador mediterráneo del maíz), *S. inferens* (Barrenador rosado del tallo) y/o *S. calamistis* (barrenador rosado del tallo); *Pectinophora* spp. tal como *P. gossypiella* (oruga rosa); *Cochylis* spp. tal como *C. hospes* (polilla del girasol rayada); *Manduca* spp. tal como *M. sexta* (gusano del tabaco) y/o *M. quinquemaculata* (gusano cornudo del tomate);

Elasmopalpus spp. tal como *E. lignosellus* (barrenador menor del tallo de maíz); *Pseudoplusia* spp. tal como *P. includens* (oruga de la soya); *Anticarsia* spp. tal como *A. gemmatalis* (gusano de terciopelo del frijol); *Plathypena* spp. tal como
5 *P. scabra* (gusano del trébol verde); *Pieris* spp. tal como *P. brassicae* (mariposa de la col), *Papaipema* spp. tal como *P. nebris* (barrenador de tallo); *Pseudaletia* spp. tal como *P. unipuncta* (cogollero común); *Peridroma* spp. tal como *P. saucia* (gusano cortador abigarrado); *Keiferia* spp. tal como
10 *K. lycopersicella* (gusano del tomate); *Artogeia* spp. tal como *A. rapae* (gusano de la col importado); *Phthorimaea* spp. tal como *P. operculella* (gusano tubérculo de la papa); *Chrysodeixis* spp. tal como *C. includens* (oruga de la soya); *Feltia* spp. tal como *F. ducens* (gusano cortador sucio); *Chilo*
15 spp. tal como *C. suppressalis* (barrenador rayado del tallo), *C. Agamemnon* (barrenador oriental del maíz), y *C. partellus* (barrenador manchado del tallo), *Cnaphalocrocis* spp. tal como *C. medinalis* (enrulador de las hojas del arroz), *Conogethes* spp. tal como *C. punctiferalis* (polilla amarilla del
20 melocotón), *Mythimna* spp. tal como *M. separata* (gusano cogollero oriental), *Athetis* spp. tal como *A. lepigone* (gusano cogollero de dos puntos), *Busseola* spp. tal como *B. fusca* (barrenador del tallo del maíz), *Etiella* spp. tal como *E. zinckenella* (barrenador de la vaina del pulso),
25 *Leguminivora* spp. tal como *L. glycinivorella* (barrenador de

la vaina de soya), *Matsumuraeses spp.* tal como *M. phaseoli* (gusano de la vaina adzuki), *Omiodes spp.* tal como *O. indicata* (enrulador de las hojas de soya/Gusano de hoja de frijol), *Rachiplusia spp.* tal como *R. nu* (oruga de girasol),
5 o cualquier combinación de lo anterior. En algunas realizaciones, al menos una de las una o más proteínas insecticidas codificadas por la molécula de ácido nucleico tienen actividad insecticida frente al gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda*). En algunas realizaciones, al menos
10 una de las una o más proteínas insecticidas codificadas por la molécula de ácido nucleico tiene actividad insecticida frente a al menos dos (por ejemplo, 2, 3, o 4) de *Spodoptera frugiperda* (gusano cogollero), *Mythimna separata* (gusano cogollero oriental), *Spodoptera litura* (gusano cortador
15 común/gusano foliar oriental) y *Ostrinia furnacalis* (barrenador asiático del maíz). En algunas realizaciones, las una o más proteínas insecticidas pueden tener opcionalmente actividad insecticida contra una colonia o plaga de insectos que son cogolleros del maíz que tiene resistencia frente a
20 otro agente insecticida, incluida otra proteína insecticida (tal como, por ejemplo, una proteína de *Bt*). En algunas realizaciones, las una o más proteínas insecticidas tienen actividad insecticida frente a una colonia de gusano cogollero que es resistente a una proteína Vip3A (por
25 ejemplo, una Vip3Aa, que incluye sin limitación el evento de

maíz MIR162), una proteína Cry1F (por que incluye sin limitación el evento de maíz TC1507 o DP-4114), una proteína Cry1A (por ejemplo, Cry1A.105, que incluye sin limitación el evento de maíz MON89034)/o una proteína Cry2 (por ejemplo, Cry2Ab, que incluye sin limitación el evento de maíz MON89034).

Las una o más proteínas insecticidas divulgadas también pueden tener actividad insecticida frente a coleópteros, hemípteros, dípteros, *Lygus* spp. y/u otros insectos perforadores y chupadores, por ejemplo, del orden Orthoptera o Thysanoptera. En algunas realizaciones, las una o más proteínas insecticidas tienen actividad frente a uno o más de los siguientes ejemplos no limitantes de una plaga de coleópteros: *Diabrotica* spp. (tales como, *D. barberi* (gusano de la raíz del maíz del norte), *D. virgifera virgifera* (gusano de la raíz del maíz del oeste), *D. undecimpunctata howardii* (gusano de la raíz del maíz del sur), *D. balteata* (escarabajo de pepino congregado), *D. undecimpunctata undecimpunctata* (escarabajo del pepino moteado occidental), *D. significata* (escarabajo de hoja con 3 manchas), *D. speciosa* (escarabajo cucurbitáceo), *D. virgifera zea* (gusano de la raíz del maíz mexicano), *D. beniensis*, *D. cristata*, *D. curviplustalata*, *D. dissimilis*, *D. elegantula*, *D. emorsitans*, *D. graminea*, *D. hispanloe*, *D. lemniscata*, *D. linsleyi*, *D. milleri*, *D. nummularis*, *D. occlusal*, *D. porrecea*, *D.*

scutellata, *D. tibialis*, *D. trifasciata* y/o *D. viridula*,
Leptinotarsa spp. tales como *L. decemlineata* (escarabajo de
 la papa); *Chrysomela* spp. tales como *C. scripta* (escarabajo
 de la hoja de álamo); *Hypothenemus* spp. tales como *H. hampei*
 5 (barrenador del café); *Sitophilus* spp. tales como *S. zeamais*
 (gorgojo del maíz); *Epitrix* spp. tales como *E. hirtipennis*
 (escarabajo de pulga de tabaco) y *E. cucumeris* (escarabajo de
 la pulga de papa); *Phyllotreta* spp. tales como *P. cruciferae*
 (escarabajo de pulgas crucífero) y/o *P. pusilla* (escarabajo
 10 negro de la pulga); *Anthonomus* spp. tales como *A. eugenii*
 (gorgojo de la pimienta); *Hemicrepidus* spp. tales como *H.*
memnonius (gusanos de alambre); *Melanotus* spp. tales como *M.*
communis (gusanos de alambre); *Ceutorhynchus* spp. tales como
C. assimilis (gorgojo de la semilla de col); *Phyllotreta* spp.
 15 tales como *P. cruciferae* (escarabajo de pulgas crucífero);
Aeolus spp. tales como *A. mellillus* (gusanos de alambre);
Aeolus spp. Tales como *A. mancus* (gusano de alambre de
 trigo); *Horistonotus* spp. tales como *H. uhlerii* (gusano de
 alambre de arena); *Sphenophorus* spp. tales como *S. maidis*
 20 (chinche de maíz), *S. zea* (chinche de la alfalfa), *S.*
parvulus (chinche azul), y *S. callosus* (chinche del sur);
Phyllophaga spp. (gusanos blancos); *Chaetocnema* spp. tales
 como *C. pulicaria* (escarabajo de pulga de maíz); *Popillia*
 spp. tales como *P. japonica* (escarabajo japonés); *Epilachna*
 25 spp. tales como *E. varivestis* (escarabajo mexicano); *Cerotoma*

spp. tales como *C. trifurcate* (escarabajo de hoja de frijol);
Epicauta spp. tales como *E. pestifera* y *E. lemniscata*
 (escarabajos de la ampolla); o cualquier combinación de lo
 anterior. Los insectos del orden Hemiptera incluyen pero sin
 5 limitación, *Chinavia hilaris* (chinche verde); *Anasa tristis*
De Geer (chinche de calabaza); *Blissus leucopterus* (chinche);
Corythuca gossypii Fabricius (chinche de encaje del algodón);
Cyrtopeltis modesta Distant (insecto del tomate); *Dysdercus*
suturellus Hern ch- Schaffer (teñidor de algodón); *Euschistus*
 10 *servus Say* ('chinche apestoso marrón); *E. variolarius Palisot*
de Beauvois (chinche apestosa de una sola mancha);
Graptostethus spp. (complejo de insectos de semillas);
Leptoglossus corculus Say (chinche de la semilla del pino de
 patas de hoja); *Lygus lineolaris Palisot de Beauvois* (insecto
 15 de la planta empañado); *L. Hesperus Knight* (Insecto de planta
 empañado occidental); *L. pratensis Linnaeus* (chinche común
 del prado); *L. rugulipennis Poppius* (Chinche europea de la
 planta empañada); *Lygocoris pabulinus Linnaeus* (cápside verde
 común); *Nezara viridula Linnaeus* (chinche hedionda verde del
 20 sur); *Oebalus pugnax Fabricius* (insecto apestoso del arroz);
Oncopeltus fasciatus Dallas (chinche grande del
 algodoncillo); *Pseudatomoscelis seriatus Reuter* (saltamontes
 de algodón), *Calocoris norvegicus Gmelin* (bicho de fresa);
Orthops campestris Linnaeus; *Plesiocoris rugicollis Fallen*
 25 (cápside de manzana); *Cyrtopeltis modestus Distant* (insecto

del tomate); *Cyrtopeltis notatus* Distant (mosca chupadora);
Spanagonicus albofasciatus Reuter (saltamontes de marcas
blancas); *Diaphnocoris chlorionis* Say (insecto de la planta
de langosta de miel); *Labopidicola allii* Knight (insecto de
5 la planta de cebolla); *Pseudatomoscelis seriatus* Reuter
(saltamontes de algodón); *Adelphocoris rapidus* Say (insecto
rápido de la planta); *Poecilocapsus lineatus* Fabricius
(insecto de planta de cuatro líneas); *Nysius ericae* Schilling
(chinche falso); *Nysius raphanus* Howard (chinchw falso);
10 *Nezara viridula* Linnaeus (chinche apestosa verde del sur);
Eurygaster spp.; *Coreidae* spp.; *Pyrrhocoridae* spp.; *Tinidae*
spp.; *Blotomatidae* spp.; *Reduviidae* spp. y *Cimicidae* spp.
Los insectos en el orden Diptera incluyen pero sin
limitación, *Liriomyza* spp. tal como *L. trifolii* (minador de
15 hojas) y *L. sativae* (minador de vegetales); *Scrobipalpula*
spp. Tal como *S. absoluta* (minador de tomate); *Delia* spp. Tal
como *D. platura* (gusano de la semilla de maíz), *D. brassicae*
(gusano de la col) y *D. radicum* (mosca de la raíz del
repollo); *Psilia* spp. Tal como *P. rosae* (mosca de la roya de
20 la zanahoria); *Tetanops* spp. Tal como *T. myopaeformis* (gusano
de la raíz de la remolacha azucarera); y cualquier
combinación de lo anterior. Los insectos del orden *Orthoptera*
incluyen, pero sin limitación, *Melanoplus* spp. tal como *M.*
differentialis (saltamontes diferencial), *M. femurrubrum*
25 (saltamontes de patas rojas), *M. bivittatus* (saltamontes de

dos rayas); y cualquier combinación de estos. Los insectos del orden Thysanoptera incluyen pero sin limitación, *Frankliniella* spp. tal como *F. occidentalis* (arañuelas occidentales de las flores) y *F. fusca* (arañuelas del tabaco); y *Thrips* spp. tal como *T. tabaci* (arañuelas de la cebolla), *T. palmi* (arañuelas de la sandía); y cualquier combinación de los anteriores.

La(s) proteína(s) insecticida(s) divulgada(s) también puede(n) tener actividad insecticida contra uno o más de los siguientes: *Phyllophaga* spp., *Rhopalosiphum maidis*, *Pratylenchus penetrans*, *Melanotus cribulosus*, *Cyclocephala lurida*, *Limonius californicus*, *Tetranychus urticae*, *Haplothrips aculeatus*, *Tetranychus truncates*, *Anomala corpulenta*, *Oedaleus infernalis*, *Frankliniella tenuicornis*, *Tetranychus cinnabarinus*, *Aiolopus thalassinus tamulus*, *Trachea tokionis*, *Laodelphax striatellus*, *Holotrichia oblita*, *Dichelops furcatus*, *Diloboderus abderu*, *Dalbulus maidis*, *Astylus variegathus*, *Scaptocoris castanea*, *Locusta migratoria manilensis*, *Agriotes lineatus*, *Peregrinus maidis*, *Oscinella frit*, *Frankliniella williamsi*, *Zyginidia manaliensis*, *Atherigona soccata*, *Nicentrites testaceipes*, *Mylocerus undecimpustulatus*, *Atherigona naquii*, *Amsecta albistriga*, *Plodia interpunctella*, *Melanotus caudex*, *Microtermes* spp., *Atherigona oryzae*, *Tanymecus dilaticollis*, *Delphacodes kuschelli*, *Lepidiota stigma*, *Phyllophaga hellery*, *Tribolium*

castaneum, *Pelopidas mathias*, *Oxya chinensis* (Thunberg),
Stenocranus pacificus, *Scutigeraella immaculata*, *Chrysodeixis*
chalcites, *Euproctis* sp. (Lymantriidae), *Phyllotreta*
spp. (undulata), *Reptalus panzer*, *Cyrtacanthacris tartarica*
5 *Linnaeus*, *Orgyia postica*, *Dactylispa lameyi*, *Patanga*
succincta Johanson, *Tetranychus spp.*, *Calomycterus sp.*,
Adoretus compressus Weber, y *Paratetranychus stickney*.

En algunos aspectos, la divulgación proporciona vectores
que comprenden las moléculas de ácido nucleico de la
10 divulgación. Los ejemplos de un vector incluyen un plásmido,
cósmido, fagémido, cromosoma artificial, fago o vector viral.
En las realizaciones, el vector es un vector vegetal, por
ejemplo, para su uso en la transformación de plantas. En las
realizaciones, el vector es un vector bacteriano, por
15 ejemplo, para su uso en la transformación de bacterias. Los
vectores adecuados para plantas, bacterias y otros organismos
son conocidos en la técnica.

En algunas realizaciones, una molécula de ácido nucleico
o vector de la divulgación también puede incluir secuencias
20 que codifican otros rasgos deseados además de la proteína o
proteínas insecticidas. Dichos casetes de expresión que
comprenden los rasgos apilados se pueden utilizar para crear
plantas, partes de plantas o células vegetales que tengan un
fenotipo deseado con los rasgos apilados (es decir,
25 apilamiento molecular). Estas combinaciones apiladas en

plantas también se pueden crear por otros métodos incluyendo, pero no limitado a, plantas de retrocruzamiento por cualquier metodología convencional. Si se apilan mediante transformación genética de las plantas, las secuencias de nucleótidos de interés se pueden combinar en cualquier momento y en cualquier orden. Por ejemplo, una planta transgénica que comprende uno o más rasgos deseados se puede utilizar como la diana para introducir rasgos adicionales por transformación posterior. Las secuencias de nucleótidos adicionales se pueden introducir simultáneamente en un protocolo de cotransformación con una molécula de ácido nucleico o vector de esta divulgación. Por ejemplo, si se introducen dos secuencias de nucleótidos, se pueden incorporar en casetes individuales (trans) o se pueden incorporar en el mismo casete (cis). La expresión de los polinucleótidos puede estar dirigida por el mismo promotor o por promotores diferentes. Se reconoce además que los polinucleótidos pueden apilarse en una ubicación genómica deseada utilizando una nucleasa específica del sitio o un sistema de recombinación (por ejemplo, FRT/Flp, Cre/Lox, endonucleasas TALE, nucleasas con dedos de cinc, CRISPR/Cas y tecnologías relacionadas). Ver las Patentes de Estados Unidos de América Núm. US7214536, US8921332, US8765448, US5527695, US5744336, US5910415, US6110736, US6175058, US6720475, US6455315, US6458594 y las Publicaciones de Patente de

Estados Unidos de América Núm. US2019093090, US2019264218, US2018327785, US2017240911, US2016208272, US2019062765.

En algunas realizaciones, una molécula de ácido nucleico o vector de la divulgación puede incluir una secuencia
5 codificante adicional para uno o más polipéptidos o moléculas de ARN bicatenario (ARNbc) de interés para rasgos agronómicos que principalmente son beneficiosos para una empresa de semillas, un cultivador o un procesador de grano. Un polipéptido de interés puede ser cualquier polipéptido
10 codificado por una secuencia de nucleótidos de interés. Los ejemplos no limitantes de polipéptidos de interés que son adecuados para la producción en plantas incluyen aquellos que dan por resultado rasgos agronómicamente importantes tal como resistencia a herbicidas (también a veces conocida como
15 "tolerancia a herbicidas"), resistencia a virus, resistencia a patógenos bacterianos, resistencia a insectos, resistencia a nematodos, o resistencia a hongos. Véanse, por ejemplo, las Patentes de EE. UU. n.º 5,569,823; 5,304,730; 5,495,071; 6,329,504; y 6,337,431. El polipéptido también puede ser uno
20 que incrementa el vigor o rendimiento de planta (incluyendo rasgos que permiten que una planta crezca a diferentes temperaturas, condiciones de suelo y niveles de luz solar y precipitación), o uno que permite la identificación de una planta que exhibe un rasgo de interés (por ejemplo, un
25 marcador seleccionable, color de cubierta de semilla, etc.).

Se describen diversos polipéptidos de interés, así como métodos para introducir estos polipéptidos en una planta, por ejemplo, en las patentes de EE. UU. n.º 4,761,373; 4,769,061; 4,810,648; 4,940,835; 4,975,374; 5,013,659; 5,162,602; 5,276,268; 5,304,730; 5,495,071; 5,554,798; 5,561,236; 5,569,823; 5,767,366; 5,879,903, 5,928,937; 6,084,155; 6,329,504 y 6,337,431; así como la publicación de patente de EE. UU. n.º 2001/0016956.

En algunas realizaciones también pueden ser adecuados los polinucleótidos que confieren resistencia/tolerancia a un herbicida que inhibe el punto de crecimiento o meristemo, tal como una imidazolinona o una sulfonilurea. Los ejemplos de polinucleótidos de esta categoría codifican enzimas ALS y AHAS mutantes, según se describe, por ejemplo, en las patentes de EE. UU. n.º 5,767,366 y 5,928,937. Las patentes de EE. UU. n.º 4,761,373 y 5,013,659 se refieren a plantas resistentes a diversos herbicidas de imidazolinona o sulfonamida. La patente de EE. UU. n.º 4,975,374 se refiere a células vegetales y plantas que contienen un ácido nucleico que codifica una glutamina sintasa (GS) mutante resistente a la inhibición por parte de herbicidas conocidos por inhibir la GS, por ejemplo, fosfinotricina y metionina-sulfoximina. La patente de EE. UU. n.º 5,162,602 divulga plantas resistentes a la inhibición por herbicidas de ciclohexanodiona y ácido ariloxifenoxipropanoico. La

resistencia es conferida por una acetil-coenzima A carboxilasa (ACCase) alterada.

Los polipéptidos codificados por secuencias de nucleótidos que confieren resistencia al glifosato también son adecuados para la divulgación. Ver, por ejemplo, Patente de Estados Unidos de América Núm. 4,940,835 y Patente de Estados Unidos de América Núm. 4,769,061. La patente de EE. UU. n.º 5,554,798 divulga plantas de maíz transgénicas resistentes al glifosato, cuya resistencia es conferida por un gen alterado de la 5-enolpiruvil-3-fosfoshikimato (EPSP) sintasa.

También son adecuados polinucleótidos que codifican resistencia a compuestos de tipo fosfono, tales como glufosinato amónico o fosfinotricina, y ácidos piridinoxi- o fenoxipropiónicos, y ciclohexonas. Véase la solicitud de patente europea n.º 0 242 246. Ver también, las Patentes de Estados Unidos de América Núm. 5,879,903, 5,276,268 y 5,561,236.

Otros polinucleótidos adecuados incluyen aquellos que codifican resistencia a herbicidas que inhiben la fotosíntesis, tales como una triazina y un benzonitrilo (nitrilasa). Véase la patente de EE. UU. n.º 4,810,648. Los polinucleótidos adecuados adicionales que codifican resistencia a herbicidas incluyen aquellos que codifican resistencia al ácido 2,2-dicloropropiónico, setoxidim,

haloxifop, herbicidas de imidazolinona, herbicidas de sulfonilurea, herbicidas de triazolopirimidina, herbicidas de s-triazina y bromoxinilo. También son adecuados los polinucleótidos que confieren resistencia a una enzima
5 protox, o que proporcionan una mayor resistencia a enfermedades de plantas; una mayor tolerancia a condiciones medioambientales adversas (estrés abiótico), que incluyen, sin limitación, sequía, frío excesivo, calor excesivo, o una acidez o alcalinidad extremas o una salinidad del suelo
10 excesiva; y alteraciones de la estructura o el desarrollo de la planta, incluidos los cambios en el tiempo de desarrollo. Ver, por ejemplo, Publicación de Patente de Estados Unidos de América Núm. 2001/0016956 y Patente de Estados Unidos de América Núm. 6,084,155.

15 Los polinucleótidos adecuados adicionales incluyen aquellos que codifican para polipéptidos insecticidas. Estos polipéptidos se pueden producir en cantidades suficientes para controlar, por ejemplo, plagas de insectos (es decir, cantidades para el control de insectos). Se reconoce que la
20 cantidad de producción de un polipéptido insecticida en una planta necesaria para el control de insectos u otras plagas puede variar dependiendo de la cultivariedad, del tipo de plaga, de factores ambientales, y similares. Los polinucleótidos útiles para la resistencia adicional a
25 insectos o plagas incluyen, por ejemplo, aquellos que

codifican toxinas identificadas en organismos *Bacillus*. Se han clonado polinucleótidos que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican proteínas Cry de *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) de varias subespecies y se ha observado

5 que los clones recombinantes son tóxicos para las larvas de insectos lepidópteros, dípteros y/o coleópteros. Algunos ejemplos de tales proteínas de *Bt* insecticidas incluyen proteínas Cry tales como Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1B, Cry1C, Cry1D, Cry1Ea, Cry1Fa, Cry3A, Cry9A, Cry9B, Cry9C y

10 similares, así como proteínas insecticidas vegetativas tales como Vip1, Vip2, Vip3 y similares. Se puede encontrar una lista completa de proteínas derivadas de *Bt* en la red mundial en la base de datos de nomenclatura de Toxina *Bacillus thuringiensis* mantenida por la Universidad de Sussex (ver

15 también, Crickmore et al. (1998) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:807-813).

En realizaciones, un polipéptido adicional es un polipéptido insecticida derivado de una fuente que no es de *Bt*, que incluye, sin limitación, una alfa-amilasa, una

20 peroxidasa, una colesterol oxidasa, una patatina, una proteasa, un inhibidor de proteasa, una ureasa, un inhibidor de alfa-amilasa, una proteína formadora de poros, una quitinasa, una lectina, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo modificado, una proteína insecticida de *Bacillus cereus*, una proteína insecticida de *Xenorhabdus* spp. (tal

25

como *X. nematophila* o *X. bovienii*), una proteína insecticida de *Photorhabdus* spp. (tal como *P. luminescens* o *P. asymobiotica*), una proteína insecticida de *Brevibacillus* spp. (tal como *B. laterosporous*), una proteína insecticida de *Lysinibacillus* spp. (tal como *L. sphearicus*), una proteína insecticida de *Chromobacterium* spp. (tal como *C. subtsugae* o *C. piscinae*), una proteína insecticida de *Yersinia* spp. (tal como *Y. entomophaga*), una proteína insecticida de *Paenibacillus* spp. (tal como *P. propylaea*), una proteína insecticida de *Clostridium* spp. (tal como *C. bifermentans*), una proteína *Pseudomonas* spp. (Tal como *P. fluorescens*) y una lignina.

Los polipéptidos que son adecuados para la producción en plantas incluyen además aquellos que mejoran o facilitan de otra manera la conversión de plantas recolectadas o partes de plantas en un producto comercialmente útil, que incluye, por ejemplo, contenido o distribución de carbohidrato incrementado o alterado, propiedades de fermentación mejoradas, contenido de aceite incrementado, contenido de proteína incrementado, digestibilidad mejorada, y contenido nutracéutico incrementado, por ejemplo, contenido de fitosterol incrementado, contenido de tocoferol incrementado, contenido de estanol incrementado o contenido de vitamina incrementado. Los polipéptidos de interés también incluyen, por ejemplo, aquellos que dan como resultado o que

contribuyen a obtener un contenido reducido de un componente no deseado en un cultivo recolectado, por ejemplo, ácido fítico o enzimas que degradan azúcares. Se pretende que la expresión "que da como resultado" o "que contribuye a" se refiera a que el polipéptido de interés puede contribuir directa o indirectamente a que exista un rasgo de interés (por ejemplo, un aumento de la degradación de celulosa mediante el uso de una enzima de tipo celulasa heteróloga).

En algunas realizaciones, el polipéptido contribuye a obtener una mejor digestibilidad del alimento o el pienso. Las xilanasas son enzimas hemicelulolíticas que mejoran la degradación de las paredes celulares de las plantas, lo que conduce a una mejor utilización de los nutrientes vegetales por parte de un animal. Esto conduce a una tasa de crecimiento y una conversión del pienso mejoradas. Además, se puede reducir la viscosidad de los piensos que contienen xilano. La producción heteróloga de xilanasas en células vegetales también puede facilitar la conversión lignocelulósica en azúcares fermentables en el procesamiento industrial.

Se han identificado y caracterizado numerosas xilanasas de microorganismos fúngicos y bacterianos (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 5,437,992; Coughlin et al. (1993) "Proceedings of the Second TRICEL Symposium on *Trichoderma reesei* Cellulases and Other Hydrolases" Espoo;

Souminen y Reinikainen, eds. (1993) Foundation for Biotechnical and Industrial Fermentation Research 8:125-135; la publicación de patente de EE. UU. n.º 2005/0208178; y la publicación PCT n.º WO 03/16654). En particular, se han
5 identificado tres xilanasas específicas (XYL-I, XYL-II y XYL-III) en *T. reesei* (Tenkanen et al. (1992) Enzyme Microb. Technol. 14:566; Torronen et al. (1992) Bio/Technology 10:1461; and Xu et al. (1998) Appl. Microbiol. Biotechnol. 49:718).

10 En otras realizaciones, un polipéptido útil para la divulgación puede ser una enzima que degrada polisacáridos. Las plantas de esta divulgación que producen esta enzima pueden ser útiles para generar, por ejemplo, materias primas de fermentación para bioprocesamiento. En algunas
15 realizaciones, las enzimas útiles para un proceso de fermentación incluyen alfa-amilasas, proteasas, pululanastas, isoamilasas, celulasas, hemicelulasas, xilanasas, ciclodextrina glucotransferasas, lipasas, fitasas, lacasas, oxidasas, esterastas, cutinasas, enzima hidrolizante de
20 almidón granular y otras glucoamilasas.

Las enzimas que degradan polisacáridos incluyen: enzimas que degradan almidón, tales como α -amilasas (EC 3.2.1.1), glucuronidasas (E.C. 3.2.1.131); exo-1,4- α -D glucanasas tales como amiloglucosidasas y glucoamilasa (EC 3.2.1.3), β -
25 amilasas (EC 3.2.1.2), α -glucosidasas (EC 3.2.1.20) y otras

exo-amilasas; enzimas que desramifican el almidón tales como a) isoamilasa (EC 3.2.1.68), pululanasa (EC 3.2.1.41) y similares; b) celulasas tales como exo-1,4-3-celobiohidrolasa (EC 3.2.1.91), exo-1,3- β -D-glucanasa (EC 3.2.1.39), β -glucosidasa (EC 3.2.1.21); c) L-arabinasas tales como endo-1,5- α -L-arabinasa (EC 3.2.1.99), α -arabinosidasas (EC 3.2.1.55) y similares; d) galactanasas tales como endo-1,4- β -D-galactanasa (EC 3.2.1.89), endo-1,3- β -D-galactanasa (EC 3.2.1.90), α -galactosidasa (EC 3.2.1.22), β -galactosidasa (EC 3.2.1.23) y similares; e) mananasas tales como endo-1,4- β -D-mananasa (EC 3.2.1.78), β -manosidasa (EC 3.2.1.25), α -manosidasa (EC 3.2.1.24) y similares; f) xilanasas tales como endo-1,4- β -xilanasa (EC 3.2.1.8), β -D-xilosidasa (EC 3.2.1.37), 1,3- β -D-xilanasa y similares; y g) otras enzimas tales como α -L-fucosidasa (EC 3.2.1.51), α -L-ramnosidasa (EC 3.2.1.40), levanasa (EC 3.2.1.65), inulanasa (EC 3.2.1.7), y similares. En una realización, la α -amilasa es la α -amilasa sintética, Amy797E, descrita en la patente de EE. UU. n.º 8,093,453, incorporada al presente documento por referencia en su totalidad.

Otras enzimas que pueden utilizarse con la divulgación incluyen proteasas, tales como proteasas fúngicas y bacterianas. Las proteasas fúngicas incluyen, pero no se limitan a, aquellas obtenidas de *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Mucor* y *Rhizopus*, tal como *A. niger*, *A. awamori*, *A. oryzae* y

M. miehei. En algunas realizaciones, los polipéptidos de esta divulgación pueden ser enzimas celobiohidrolasas (CBH) (EC 3.2.1.91). En una realización, la enzima celobiohidrolasa puede ser CBH1 o CBH2.

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

 Las moléculas de ARN bicatenario útiles con la divulgación incluyen pero no se limitan a aquellas que
15 suprimen genes de insectos diana. Tal como se utilizan en el presente documento, las palabras "supresión de genes", cuando se toman en conjunto, pretenden referirse a cualquiera de los métodos conocidos para reducir los niveles de proteína producida como resultado de la transcripción génica a ARNm y
20 la posterior traducción del ARNm. También se propone que la supresión génica signifique la reducción de la expresión de proteínas de un gen o una secuencia de codificación que incluye la supresión génica postranscripcional y la supresión transcripcional. La supresión génica posterior a la
25 transcripción está mediada por la homología entre la

totalidad o parte de un ARNm transcrito a partir de un gen o secuencia codificante que es la diana en la supresión y el ARN bicatenario correspondiente utilizado para la supresión, y se refiere a la reducción sustancial y medible de la cantidad de ARNm disponible en la célula para unirse a los ribosomas. El ARN transcrito puede estar en la orientación sentido para efectuar lo que se denomina cosupresión, en la orientación antisentido para efectuar lo que se denomina supresión antisentido, o en ambas orientaciones, para producir un ARNbc para efectuar lo que se denomina interferencia por ARN (iARN). La supresión de la transcripción está mediada por la presencia en una célula de un ARNbc, un agente de supresión génica, que muestre una identidad secuencial sustancial respecto a una secuencia de ADN promotora o la complementaria de esta, para efectuar lo que se denomina supresión en trans del promotor. La supresión génica puede ser eficaz frente a un gen vegetal nativo asociado con un rasgo, por ejemplo, para proporcionar a las plantas unos niveles menores de una proteína codificada por el gen nativo o unos niveles menores o mejorados de un metabolito afectado. La supresión génica también puede ser eficaz frente a genes diana en plagas de plantas que pueden ingerir o entrar en contacto con material vegetal que contiene agentes de supresión génica, diseñados específicamente para inhibir o suprimir la expresión de una o

más secuencias complementarias u homólogas en las células de la plaga. Estos genes dirigidos a la supresión pueden codificar para una proteína esencial, cuya función predicha se selecciona del grupo constituido por formación muscular, formación de hormonas juveniles, regulación de hormonas juveniles, regulación y transporte de iones, síntesis de enzimas digestivas, mantenimiento del potencial de membrana celular, biosíntesis de aminoácidos, degradación de aminoácidos, formación de espermatozoides, síntesis de feromonas, detección de feromonas, formación de antenas, formación de alas, formación de patas, desarrollo y diferenciación, formación de huevos, maduración de larvas, formación de enzimas digestivas, síntesis de hemolinfa, mantenimiento de hemolinfa, neurotransmisión, división celular, metabolismo de energía, respiración, y apoptosis.

Células transgénicas, plantas, partes de plantas

En algunos aspectos, la divulgación proporciona además células transgénicas, plantas, partes de plantas y similares que comprenden una molécula de ácido nucleico o vector de la divulgación (por ejemplo, que comprende cualquiera de las SEQ ID NO: 1 u 8 a 31 o una o varias de las variantes de la tabla 3). En algunas realizaciones, la divulgación proporciona una célula hospedadora no humana que comprende una molécula de ácido nucleico o vector de la divulgación. La célula hospedadora transgénica no humana puede incluir, pero sin

limitación, una célula vegetal (incluyendo una célula de monocotiledónea y/o una célula de dicotiledónea), una célula de levadura, una célula bacteriana o una célula de insecto. Por consiguiente, en algunas realizaciones, se proporciona una célula bacteriana que se selecciona de los géneros

5 *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Clostridium*, *Xenorhabdus*,
Photorhabdus, *Pasteuria*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Erwinia*,
Serratia, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Pasteurella*, *Xanthomonas*,
Streptomyces, *Rhizobium*, *Rhodopseudomonas*, *Methylophilus*,

10 *Agrobacterium*, *Acetobacter*, *Lactobacillus*, *Arthrobacter*,
Azotobacter, *Leuconostoc*, o *Alcaligenes*.

En algunas realizaciones, la célula vegetal transgénica es una célula vegetal de dicotiledóneas o una célula vegetal de monocotiledóneas. En realizaciones adicionales, la célula

15 vegetal dicotiledónea es una célula de soya, célula de girasol, célula de tomate, célula de cultivo de col, célula de algodón, célula de remolacha azucarera o una célula de tabaco. En otras realizaciones, la célula monocotiledónea es una célula de cebada, maíz, avena, arroz, sorgo, caña de

20 azúcar o trigo. En realizaciones preferidas, la célula monocotiledónea es una célula de maíz. En algunas realizaciones, la divulgación proporciona una pluralidad de células de dicotiledóneas o células de monocotiledóneas que comprenden una molécula de ácido nucleico o vector de la

25 divulgación (por ejemplo, una pluralidad de células de maíz

que comprenden una molécula de ácido nucleico o vector de la divulgación). En realizaciones, la pluralidad de células está yuxtapuesta para formar un apoplasto y se cultivan con luz solar natural. En realizaciones, la célula vegetal transgénica no puede regenerar una planta entera.

En otras realizaciones de la divulgación, la molécula de ácido nucleico de la divulgación se expresa en un organismo superior, por ejemplo, una planta. Estas plantas transgénicas expresan cantidades efectivas de las proteínas insecticidas codificadas por la molécula de ácido nucleico para controlar plagas de plantas tal como plagas de insectos. Cuando un insecto comienza a alimentarse de una planta transgénica de este tipo, ingiere las una o más proteínas insecticidas expresada(s). Esto puede impedir que el insecto vuelva a morder el tejido de la planta o incluso puede dañar o eliminar al insecto. En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico de la divulgación se integra de manera estable en el genoma de la planta. En otras realizaciones, la molécula de ácido nucleico de la divulgación está incluida en un virus autorreplicante no patógeno.

En algunas realizaciones, la planta transgénica es insecticida contra, al menos, *Spodoptera frugiperda* (gusano cogollero). En algunas realizaciones, la planta transgénica es insecticida contra al menos dos (por ejemplo, 2, 3 o 4) de *Spodoptera frugiperda* (gusano cogollero), *Mythimna separata*

(gusano cogollero oriental), *Spodoptera litura* (gusano cortador común/gusano foliar oriental) y *Ostrinia furnacalis* (barrenador asiático del maíz). En algunas realizaciones, la planta transgénica tiene propiedades insecticidas mejoradas, por ejemplo, contra al menos *Spodoptera frugiperda* (gusano cogollero), en relación con una planta de control, por ejemplo, que no comprende la molécula de ácido nucleico.

En algunas realizaciones de la divulgación, una célula vegetal transgénica que comprende una molécula de ácido nucleico de la divulgación es una célula de una parte de planta, un órgano de planta o un cultivo de planta (cada uno como se describe en la presente) que incluye, pero no se limita a, una raíz, una hoja, una semilla, una flor, un fruto, una célula de polen, un órgano o cultivo de planta, y similares, o una célula o cultivo de callo.

Una planta o célula vegetal transgénica transformada de acuerdo con la descripción puede ser una planta o célula vegetal monocotiledónea o dicotiledónea e incluye, pero no se limita a, maíz, soya, arroz, trigo, cebada, centeno, avena, sorgo, mijo, girasol, cártamo, remolacha azucarera, algodón, caña de azúcar, colza oleaginosa, alfalfa, tabaco, maní, verduras, que incluyen batata, frijol, guisante, achicoria, lechuga, col, coliflor, brócoli, nabo, zanahoria, berenjena, pepino, rábano, espinaca, papa, tomate, espárrago, cebolla, ajo, melones, pimiento, apio, calabaza, zapallo, calabacín,

frutas, que incluyen manzana, pera, membrillo, ciruela, cereza, durazno, nectarina, damasco, frutilla, uva, frambuesa, mora, piña, aguacate, papaya, mango, banana y plantas especializadas tales como *Arabidopsis* y plantas
5 leñosas tales como árboles caducifolios y coníferas. Preferentemente, las plantas de la divulgación son plantas de cultivo tales como maíz, sorgo, trigo, girasol, tomate, crucíferas, pimiento, papa, algodón, arroz, soya, remolacha azucarera, caña de azúcar, tabaco, cebada, colza oleaginosa y
10 similares.

Una vez que la molécula de ácido nucleico deseada se ha transformado en una especie vegetal particular, se puede propagar en esa especie o trasladar a otras variedades de la misma especie, incluidas en particular las variedades
15 comerciales, utilizando cualquier técnica apropiada incluyendo técnicas tradicionales de cultivo selectivo.

Las proteínas insecticidas codificadas por una molécula de ácido nucleico de la divulgación pueden funcionar en la parte de planta, célula vegetal, órgano de planta, semilla, producto recolectado, producto procesado o extracto, y
20 similares, como un agente de control de insectos. En otras palabras, las una o más proteínas insecticidas pueden seguir realizando la función insecticida que tenía en la planta transgénica. La molécula de ácido nucleico puede actuar para
25 expresar la proteína insecticida. Como una alternativa a la

expresión de la proteína insecticida de la divulgación, en algunas realizaciones la molécula de ácido nucleico puede funcionar para identificar una parte de planta transgénica, célula vegetal, órgano de planta, semilla, producto recolectado, producto procesado o extracto de la divulgación que comprende la molécula de ácido nucleico.

En realizaciones, una planta transgénica, parte de planta, célula vegetal, órgano vegetal o semilla de la divulgación es hemicigótico para una molécula de ácido nucleico de la divulgación. En realizaciones, una planta transgénica, parte de planta, célula vegetal, órgano vegetal o semilla de la divulgación es homocigótico para una molécula de ácido nucleico de la divulgación.

Realizaciones adicionales de la divulgación incluyen productos recolectados producidos a partir de las plantas transgénicas o partes de las mismas de la divulgación, así como un producto procesado producido a partir de los productos recolectados. Un producto recolectado puede ser una planta entera o cualquier parte de la planta, tal como se describe en el presente documento. Por lo tanto, en algunas realizaciones, los ejemplos no limitantes de un producto recolectado incluyen una semilla, una fruta, una flor o parte de esta (por ejemplo, una antera, un estigma, y similares), una hoja, un tallo, y similares. En otras realizaciones, un producto procesado incluye, pero no se limita a, una harina,

sémola, aceite, almidón, jarabe, cereal, y similares producidos a partir de una semilla recolectada u otra parte de la planta de la divulgación, en donde esta semilla u otra parte de la planta comprende una molécula de ácido nucleico de la divulgación.

En otras realizaciones, la divulgación proporciona un extracto de una semilla transgénica o una planta transgénica de la divulgación, en donde el extracto comprende una molécula de ácido nucleico de la divulgación. Los extractos de plantas o partes de las plantas se pueden preparar de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica (véase de la Torre et al., Food, Agric. Environ. 2(1): 84-89 (2004); Guidet, Nucleic Acids Res. 22 (9): 1772-1773 (1994); Lipton et al., Food Agric. Immun. 12:153-164 (2000)). Estos extractos se pueden utilizar, por ejemplo, en métodos para detectar la presencia de una molécula de ácido nucleico de la divulgación.

En algunas realizaciones, una planta, parte de la planta, célula vegetal, órgano vegetal, semilla, producto recolectado, producto procesado o extracto transgénicos tiene una mayor actividad insecticida a una o más plagas de insectos (por ejemplo, una plaga de lepidópteros del maíz) en comparación con un control adecuado que no comprende una molécula de ácido nucleico de la divulgación. En algunas realizaciones, una planta transgénica, parte de la planta,

célula vegetal, órgano vegetal, semilla, producto cosechado, producto procesado o extracto transgénico tiene actividad insecticida aumentada para al menos *Spodoptera frugiperda* (gusano cogollero). En algunas realizaciones, una planta transgénica, parte de la planta, célula vegetal, órgano vegetal, semilla, producto cosechado, producto procesado o extracto tiene actividad insecticida aumentada a al menos dos (por ejemplo, 2, 3, o 4) de *Spodoptera frugiperda* (gusano cogollero), *Mythimna separata* (gusano cogollero oriental), *Spodoptera litura* (gusano cortador común/gusano foliar oriental) y *Ostrinia furnacalis* (barrenador asiático del maíz).

Transformación y reproducción vegetal

Los procedimientos para transformar plantas son bien conocidos y rutinarios en la técnica y se describen por toda la bibliografía. Algunos ejemplos no limitantes de métodos para transformar plantas incluyen la transformación mediante el suministro de ácidos nucleicos mediado por bacterias (por ejemplo, mediante *Agrobacterium*), suministro de ácidos nucleicos mediado por virus, suministro de ácidos nucleicos mediado por carburo de silicio o filamentos finos de ácidos nucleicos, suministro de ácidos nucleicos mediado por liposomas, microinyección, bombardeo de micropartículas, transformación mediada por fosfato de calcio, transformación mediada por ciclodextrinas, electroporación, transformación

mediada por nanopartículas, aplicación de ultrasonidos, infiltración, captación de ácidos nucleicos mediada por PEG, así como también cualquier otro mecanismo eléctrico, químico, físico (mecánico) o biológico que dé como resultado la introducción de ácido nucleico en la célula vegetal, incluyendo cualquier combinación de los mismos. Algunas guías generales de varios métodos de transformación de plantas conocidos en la técnica incluyen Miki et al. ("Procedures for Introducing Foreign DNA into Plants" en *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*, Glick, B. R. y Thompson, J. E., Eds. (CRC Press, Inc., Boca Ratón, 1993), páginas 67-88) y Rakowoczy-Trojanowska (*Cell. Mol. Biol. Lett.* 7: 849-858 (2002)).

Para la transformación mediada por *Agrobacterium*, son por lo general adecuados los vectores binarios o vectores portadores de al menos una secuencia frontera de ADN-T, mientras que para la transferencia génica directa (por ejemplo, bombardeo de partículas y similares) cualquier vector es adecuado, y se puede emplear ADN lineal que contenga únicamente la construcción de interés. En el caso de la transferencia génica directa, se puede utilizar la transformación con una sola especie de ADN o la transformación conjunta (Schocher et al., *Biotechnology* 4:1093-1096 (1986)). Tanto para la transferencia directa de genes como para la transferencia mediada por *Agrobacterium*,

la transformación se suele llevar a cabo (pero no necesariamente) con un marcador de selección, que puede ser una selección positiva (por ejemplo, fosfomanosa-isomerasa), presentar resistencia a un antibiótico (por ejemplo, kanamicina, higromicina o metotrexato) o a un herbicida (por ejemplo, glifosato o glufosinato). Sin embargo, la elección del marcador seleccionable no es crítica para la divulgación.

La transformación mediada por *Agrobacterium* es un método utilizado habitualmente para transformar plantas debido a su alta eficacia de transformación y debido a su amplia utilidad con muchas especies diferentes. La transformación mediada por *Agrobacterium* normalmente conlleva la transferencia del vector binario que porta el ADN exógeno de interés a una cepa de *Agrobacterium* adecuada que puede depender del complemento de genes vir portados por la cepa hospedadora de *Agrobacterium* en un plásmido Ti corresidente o cromosómicamente (Uknes et al. 1993, Plant Cell 5:159-169). La transferencia del vector binario recombinante a *Agrobacterium* se puede realizar mediante un procedimiento de apareamiento triparental utilizando *Escherichia coli* que porte el vector binario recombinante, una cepa adyuvante de *E. coli* que porte un plásmido que sea capaz de movilizar el vector binario recombinante hasta la cepa de *Agrobacterium* diana. De manera alternativa, el vector binario recombinante se puede transferir a *Agrobacterium* por transformación de

ácido nucleico (Höfgen & Willmitzer (1988) *Nucleic Acids Res.* 16:9877).

Tanto las monocotiledóneas como las dicotiledóneas se pueden transformar utilizando *Agrobacterium*. Los métodos para la transformación de arroz mediada por *Agrobacterium* incluyen métodos bien conocidos para la transformación de arroz, tal como aquellos descritos en cualquiera de los siguientes: solicitud de patente Europea EP 1198985 A1, Aldemita y Hodges (Planta 199: 612-617, 1996); Chan et al. (*Plant Mol Biol* 22 (3): 491-506, 1993), Hiei et al. (*Plant J* 6 (2): 271-282, 1994), cuyas divulgaciones se incorporan por referencia al presente documento como si se expusiesen en su totalidad. En el caso de la transformación de maíz, los métodos incluyen aquellos como se describen en Ishida et al. (*Nat. Biotechnol* 14(6): 745-50, 1996) o bien Frame et al. (*Plant Physiol* 129(1): 13-22, 2002), cuyas divulgaciones se incorporan como referencia en el presente documento como si se expusieran en su totalidad. Dichos métodos se describen adicionalmente a modo de ejemplo en B. Jenes et al., *Techniques for Gene Transfer*, en: *Transgenic Plants*, Vol. 1, Engineering and Utilization, eds. S. D. Kung y R. Wu, Academic Press (1993) 128-143 and in Potrykus *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol.* 42 (1991) 205-225). El ácido nucleico o el constructo que se va a expresar se clona preferentemente en un vector, que es adecuado para transformar *Agrobacterium*

tumefaciens, por ejemplo, pBin19 (Bevan et al., Nucl. Acids Res. 12 (1984) 8711). Las *agrobacterias* transformadas por este vector se pueden usar entonces de manera conocida para la transformación de plantas, tal como plantas usadas como modelo, como *Arabidopsis* o plantas de cultivo tal como, a manera de ejemplo, plantas de tabaco, por ejemplo, al sumergir hojas magulladas u hojas picadas en una solución agrobacteriana y entonces al cultivarlas en medios adecuados. La transformación de plantas mediante *Agrobacterium tumefaciens* ha sido descrita, por ejemplo, por Hagen y Willmitzer en Nucl. Acid Res. (1988) 16, 9877 o se conoce, entre otros, de F. F. White, Vectors for Gene Transfer in Higher Plants; en Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, eds. S. D. Kung y R. Wu, Academic Press, 1993, pp. 15-38.

El material vegetal de soya puede transformarse de forma adecuada y regenerarse plantas fértiles por muchos métodos que son conocidos por el experto en la técnica. Los ejemplos de métodos de transformación de soya pueden encontrarse en la Patente de EE. UU. n.º 5,024,944; Finer y McMullen (1991) In Vitro Cell Dev. Biol. 27P:175-182; McCabe et al. (1988) Bio/technology 6:923-926; Khalafalla et al. (2006) African J. of Biotechnology 5:1594-1599; Patentes de Estados Unidos de América n.º 7.001.754; Hinchey et al. (1988) Bio/Technology 6:915-922; Pat. de los EE. UU. N.º 7.002.058; Publicación de

Solicitud de Patente de los EE. UU. n.º 20040034889; Publicación de Solicitud de Patente de los EE. UU. n.º 20080229447; y Paz et al. (2006) Plant Cell Report 25:206-213.

5 Las plantas transgénicas se pueden generar con los vectores binarios descritos hasta ahora que contienen genes marcadores seleccionables con diferentes métodos de transformación. Por ejemplo, se usa un vector para transformar dianas de semillas inmaduras según lo descrito
10 (véase, por ejemplo, la publicación de la solicitud de patente de EE. UU. N.º 20080229447) para generar plantas de HPPD usando directamente un inhibidor de HPPD, tal como mesotriona, como agente de selección. Opcionalmente, otros genes de tolerancia a herbicidas pueden estar presentes en el
15 polinucleótido junto con otras secuencias que proporcionan medios adicionales de selección/identificación de tejido transformado que incluyen, por ejemplo, los genes conocidos que proporcionan resistencia a kanamicina, higromicina, fosfinotricina, butafenacilo o glifosato. Por ejemplo,
20 diferentes vectores binarios que contienen genes marcadores seleccionables de PAT o EPSPS se transforman usando transformación mediada por *Agrobacterium* y selección de glufosinato o glifosato como se describe (ver, por ejemplo, Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos de
25 América Núm. 20080229447).

La transformación de una planta mediante *Agrobacterium* recombinante suele implicar el cocultivo de *Agrobacterium* con explantes de la planta, y sigue métodos conocidos en la técnica. El tejido transformado se regenera en un medio de
5 selección que porta un marcador de resistencia a antibióticos o herbicidas entre los bordes del ADN-T plasmídico binario.

Como se ha comentado anteriormente, otro método para transformar plantas, partes de la planta y células vegetales conlleva la introducción propulsada de partículas inertes o
10 con actividad biológica en tejidos y células vegetales. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.º 4,945,050; 5,036,006 y 5,100,792. Generalmente, este método implica propulsar partículas inertes o biológicamente activas en las células vegetales bajo condiciones eficaces para atravesar la
15 superficie externa de la célula y permitir la incorporación dentro del interior de la misma. Cuando se utilizan partículas inertes, el vector puede introducirse en la célula recubriendo las partículas con el vector que contiene el ácido nucleico de interés. Alternativamente, una célula o
20 células se pueden circundar por el vector tal que el vector se lleve a la célula por la estela de la partícula. También se pueden propulsar partículas biológicamente activas (por ejemplo, una célula de levadura desecada, una bacteria desecada o un bacteriófago, donde cada uno de los cuales

contiene uno o más ácidos nucleicos que se desean introducir) hacia el interior del tejido vegetal.

En otras realizaciones, una molécula de ácido nucleico de la divulgación puede transformarse directamente en el
5 genoma plastídico. La tecnología de transformación de plástidos se describe ampliamente en las Patentes de Estados Unidos de América Núm. 5,451,513, 5,545,817 y 5,545,818, en la solicitud de PCT Núm. WO 95/16783, y en McBride et al. (1994) Proc. Nati. Acad. Sci. USA 91, 7301-7305.

10 Los métodos para seleccionar plantas, células vegetales o cultivos de tejidos vegetales transgénicos transformados son de uso habitual en la técnica y se pueden emplear en los métodos de la divulgación proporcionados en la presente. Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico o vector de la
15 divulgación también puede incluir un casete de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos para un marcador seleccionable, que se puede utilizar para seleccionar una planta, parte de planta o célula vegetal transformada.

Los ejemplos de marcadores seleccionables incluyen, pero
20 no se limitan a, una secuencia de nucleótidos que codifica para neo o nptII, que confiere resistencia a la kanamicina, G418 y similares (Potrykus et al. (1985) Mol. Gen. Genet. 199:183-188); una secuencia de nucleótidos que codifica para la barra, que confiere resistencia a la fosfinotricina; una
25 secuencia de nucleótidos que codifica para una 5-

enolpiruvilshikimato-3-fosfato (EPSP) sintasa alterada, que confiere resistencia al glifosato (Hinchee et al. (1988) Biotech. 6:915-922); una secuencia de nucleótidos que codifica para una nitrilasa tal como bxn de *Klebsiella*
5 *ozaenae* que confiere resistencia al bromoxinilo (Stalker et al. (1988) Science 242:419-423); una secuencia de nucleótidos que codifica para una acetolactato sintasa (ALS) alterada que confiere resistencia a la imidazolinona, sulfonilurea u otros productos químicos que inhiben ALS (Solicitud de Patente EP
10 Núm. 154204); una secuencia de nucleótidos que codifica para una dihidrofolato reductasa (DHFR) resistente al metotrexato (Thillet al. (1988) J. Biol. Chem. 263: 12500-12508); una secuencia de nucleótidos que codifica para una dalapón deshalogenasa que confiere resistencia a dalapón; una
15 secuencia de nucleótidos que codifica para una manosa-6-fosfato isomerasa (también conocida como fosfomanosa isomerasa (PMI)) que confiere una capacidad para metabolizar manosa (patentes de Estados Unidos de América Núm. 5,767,378 y 5,994,629); una secuencia de nucleótidos que codifica para
20 una antranilato sintasa alterada que confiere resistencia a 5-metil-triptófano; o una secuencia de nucleótidos que codifica para hph que confiere resistencia a higromicina. Un experto en la técnica es capaz de seleccionar un marcador de selección adecuado para su uso en un casete de expresión de
25 esta divulgación.

Los marcadores de selección adicionales incluyen, sin carácter limitante, una secuencia de nucleótidos que codifica β -glucuronidasa o uidA (GUS) que codifica una enzima para la que se conocen varios sustratos cromogénicos; una secuencia
5 de nucleótidos del locus R que codifica un producto que regula la producción de pigmentos de antocianina (color rojo) en tejidos vegetales (Dellaporta et al., "Molecular cloning of the maize R-nj allele by transposon-tagging with Ac" 263-282 en: Chromosome Structure and Function: Impact of New
10 Concepts, 18th Stadler Genetics Symposium (Gustafson & Appels eds., Plenum Press 1988)); una secuencia de nucleótidos que codifica para β -lactamasa, una enzima para la cual se conocen varios sustratos cromogénicos (por ejemplo, PADAC, una cefalosporina cromogénica) (Sutcliffe (1978) Proc. Natl.
15 Acad. Sci. EUA 75: 3737-3741); una secuencia de nucleótidos que codifica para xylE que codifica para una catecol dioxigenasa (Zukowsky et al. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. usa 80:1101-1105); una secuencia de nucleótidos que codifica para tirosinasa, una enzima capaz de oxidar tirosina a DOPA y
20 dopaquinona, que a su vez se condensa para formar melanina (Katz et al. (1983) J. Gen. Microbiol. 129:2703-2714); una secuencia de nucleótidos que codifica β -galactosidasa, una enzima para la que existen sustratos cromogénicos; una secuencia de nucleótidos que codifica luciferasa (lux) que
25 permite la detección por bioluminiscencia (Ow et al. (1986)

Science 234:856-859); una secuencia de nucleótidos que codifica aecuatorina que se puede emplear en la detección bioluminiscente sensible al calcio (Prasher et al. (1985) Biochem. Biophys. Res. Comm. 126:1259-1268); o una secuencia
5 de nucleótidos que codifica una proteína fluorescente verde (Niedz et al. (1995) Plant Cell Reports 14:403-406) u otra proteína fluorescente tal como dsRed o mCherry. Un experto en la técnica es capaz de seleccionar un marcador de selección adecuado para su uso en un casete de expresión de esta
10 divulgación.

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

Adicionalmente, las propiedades genéticas modificadas en las semillas y plantas transgénicas, partes de plantas o células de plantas de la divulgación descrita anteriormente
25 se pueden transmitir por reproducción sexual o crecimiento

vegetativo y, por lo tanto, se pueden mantener y propagar en plantas de progenie. Por lo general, el mantenimiento y la propagación utilizan métodos conocidos en agricultura desarrollados para adaptarse a propósitos específicos tales como la recolección, siembra o labranza.

Por lo tanto, una molécula de ácido nucleico de la divulgación se puede introducir en la planta, parte de planta o célula vegetal de varias formas muy conocidas en la técnica, según se ha descrito previamente. Por lo tanto, no se confía en ningún método particular para introducir una molécula de ácido nucleico en una planta, sino que se puede utilizar cualquier método que permita que la molécula de ácido nucleico se integre de manera estable en el genoma de la planta. Cuando se vaya a introducir más de un polinucleótido, los respectivos polinucleótidos se pueden agrupar como parte de una única molécula de ácido nucleico o como moléculas individuales de ácido nucleico, y pueden estar situados en la misma molécula de ácido nucleico o en moléculas diferentes. Por consiguiente, los polinucleótidos pueden introducirse en la célula de interés en un único evento de transformación, en eventos de transformación separados o, por ejemplo, en plantas, como parte de un protocolo de cultivo selectivo.

Una vez que una molécula de ácido nucleico deseada se ha transformado en una especie de planta particular, se puede

propagar en esa especie o moverse a otras variedades de la misma especie, particularmente incluyendo variedades comerciales, usando técnicas de reproducción tradicionales.

5 En algunas realizaciones, una planta transgénica, una parte de una planta, una célula vegetal, un órgano vegetal, una semilla, un producto cosechado, un producto procesado o un extracto de la divulgación pueden comprender uno o más ácidos nucleicos de interés que proporcionan una o más características de entrada (por ejemplo, resistencia a
10 insectos, resistencia a herbicidas, resistencia a hongos, resistencia a virus, tolerancia al estrés, resistencia a enfermedades, esterilidad masculina, fuerza del tallo y similares) y/o características de producción (por ejemplo, mayor rendimiento, almidones modificados, perfil de aceite
15 mejorado, aminoácidos balanceados, alto lisina o metionina, mayor digestibilidad, mejor calidad de la fibra, resistencia a la sequía y similares). En algunas realizaciones, una planta transgénica de la divulgación puede cruzarse con otra planta transgénica que comprende uno o más ácidos nucleicos
20 de interés.

En algunas realizaciones, uno o más de otros ácidos nucleicos de interés codifican para uno o más segundos agentes de control de plagas, por ejemplo, una proteína insecticida de *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), y/o un agente
25 insecticida no de *Bt* que incluye, sin limitación, una

proteína insecticida de *Xenorhabdus*, una proteína insecticida de *Photorhabdus*, una proteína insecticida de *Brevibacillus laterosporus*, una proteína insecticida de *Bacillus sphaericus*, un inhibidor de proteasa (ambos tipos de serina y cisteína), una lectina, una alfa-amilasa, una peroxidasa, una colesterol oxidasa, o una molécula de ARN de doble hebra (ARNbc). En realizaciones adicionales, el segundo agente de control de plagas puede ser uno o más de cualquier número de proteínas insecticidas de *Bacillus thuringiensis* que incluyen, sin limitación, una proteína Cry, una proteína insecticida vegetativa (VIP, por sus siglas en inglés) y quimeras insecticidas de cualquiera de las proteínas insecticidas anteriores. En algunas realizaciones, el segundo agente de control de plagas puede ser no proteináceo, por ejemplo, una molécula de ARN de interferencia tal como un ARNbc.

En algunas realizaciones, el segundo agente de control de plagas comprende una o más de las proteínas insecticidas o ARNcd presentes en cualquiera de los siguientes eventos: el evento Bt11 (ver Patente de Estados Unidos de América Núm. US6114608), el evento MIR604 (ver Patente de Estados Unidos de América Núm. US8884102), el evento MIR162 (ver Patente de Estados Unidos de América Núm. 8232456), el evento 5307 (ver Patente de Estados Unidos de América Núm. US10428393), el evento MZIR098 (ver Solicitud de Patente de Estados Unidos de

América Núm. US20200190533), el evento TC1507 (ver Patente de Estados Unidos de América Núm. US7288643), el evento DAS-59122-7 (ver Patente de Estados Unidos de América Núm. US7323556), el evento MON810 (ver US6713259), el evento

5 MON863 (ver Patente de Estados Unidos de América Núm. US7705216), el evento MON89034 (ver Patente de Estados Unidos de América Núm. US8062840), el evento MON88017 (ver Patente de Estados Unidos de América Núm. US9556492), el evento DP-4114 (ver Patente de Estados Unidos de América Núm.

10 US9725772), el evento MON87411 (ver Patente de Estados Unidos de América Núm. US9441240), el evento DP-032218-9 (ver Solicitud de Patente de Estados Unidos de América Núm. US2015361447), el evento DP-033121-3 (ver Solicitud de Patente de Estados Unidos de América Núm. US2015361446), el

15 evento DP-023211-2 (ver Publicación de PCT Núm. WO2019209700), el evento MON95379 (ver Solicitud de Patente de Estados Unidos de América Núm. US2020032289), el evento DBN9936 (ver Publicación de PCT Núm. WO2016173361), el evento DBN9501 (ver Publicación de PCT Núm. WO20207125), el evento

20 GH5112E-117C (ver Publicación de PCT Núm. WO17/088480), LP007-1 (ver Solicitud de patente china Núm. CN112852801), LP007-2 (Solicitud de patente china Núm. CN112831584), LP007-3 (Solicitud de patente china Núm. CN112877454), LP007-4 (Solicitud de patente china Núm. CN112831585), LP007-5

25 (Solicitud de patente china Núm. CN113151534), LP007-6

(Solicitud de patente china Núm. CN113151533), LP007-7
(Solicitud de patente china Núm. CN112852991), LP007-8
(CN113980958), Ruifeng8, ND207, o el evento Ruifeng125 (ver
Solicitud de patente china Núm. CN105017391). En algunas
5 realizaciones, el segundo agente de control de plagas
comprende uno cualquiera o más de los siguientes eventos: el
evento Bt11 (véase la patente de los Estados Unidos n.º
US6114608), el evento MIR604 (véase la patente de los Estados
Unidos n.º US8884102), el evento MIR162 (véase la patente de
10 los Estados Unidos n.º 8232456), el evento 5307 (véase la
patente de los Estados Unidos n.º US10428393), el evento
MZIR098 (véase la solicitud de patente de los Estados Unidos
n.º US20200190533), el evento TC1507 (véase la patente de los
Estados Unidos n.º US7288643), el evento DAS-59122-7 (véase
15 la patente de los Estados Unidos n.º US7323556), el evento
MON810 (véase el documento US6713259), el evento MON863
(véase la patente de los Estados Unidos n.º US7705216), el
evento MON89034 (véase la patente de los Estados Unidos n.º
US8062840), el evento MON88017 (véase la patente de los
20 Estados Unidos n.º US9556492), el evento DP-4114 (véase la
patente de los Estados Unidos n.º US9725772), el evento
MON87411 (véase la patente de los Estados Unidos n.º
US9441240), el evento DP-032218-9 (véase la solicitud de
patente de los Estados Unidos n.º US2015361447), el evento
25 DP-033121-3 (véase la solicitud de patente de los Estados

Unidos n.º US2015361446), el evento DP-023211-2 (véase la publicación PCT n.º WO2019209700), el evento MON95379 (véase la solicitud de patente de los Estados Unidos n.º US2020032289), el evento DBN9936 (véase la publicación PCT n.º WO2016173361), el evento DBN9501 (véase la publicación PCT n.º WO20207125), el evento GH5112E-117C (véase la publicación PCT n.º WO17/088480), LP007-1 (véase la solicitud de patente China n.º CN112852801), LP007-2 (solicitud de patente China n.º CN112831584), LP007-3 (solicitud de patente China n.º CN112877454), LP007-4 (solicitud de patente China n.º CN112831585), LP007-5 (solicitud de patente China n.º CN113151534), LP007-6 (solicitud de patente China n.º CN113151533), LP007-7 (solicitud de patente China n.º CN112852991), LP007-8 (CN113980958), Ruifeng8, ND207, o el evento Ruifeng125 (véase la solicitud de patente China n.º CN105017391).

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

insecticida de *Xenorhabdus* spp. (tal como *X. nematophila* o *X. bovienii*), una proteína insecticida de *Photorhabdus* spp. (tal como *P. luminescens* o *P. asymobiotica*), una proteína insecticida de *Brevibacillus* spp. (tal como *B. laterosporous*), una proteína insecticida de *Lysinibacillus* spp. (tal como *L. sphearicus*), una proteína insecticida de *Chromobacterium* spp. (tal como *C. subtsugae* o *C. piscinae*), una proteína insecticida de *Yersinia* spp. (tal como *Y. entomophaga*), una proteína insecticida de *Paenibacillus* spp. (tal como *P. propylaea*), una proteína insecticida de *Clostridium* spp. (tal como *C. bifermentans*), una proteína *Pseudomonas* spp. (Tal como *P. fluorescens*) y una lignina. En otras realizaciones, el segundo agente puede ser al menos una proteína insecticida procedente de un complejo de toxina (Tc) insecticida de *Photorhabdus*, *Xenorhabdus*, *Serratia* o *Yersinia*. En otras realizaciones, la proteína insecticida puede ser una ADP-ribosiltransferasa procedente de una bacteria insecticida, tal como *Photorhabdus* ssp. En otras realizaciones, la proteína insecticida puede ser una proteína VIP, tal como VIP1 y/o VIP2 de *B. cereus*. En aun otras realizaciones, la proteína insecticida puede ser una toxina binaria derivada de una bacteria insecticida, tal como ISP1A e ISP2A de *B. laterosporous* o BinA y BinB de *L. sphaericus*. En aun otras realizaciones, la proteína insecticida se puede

modificar o puede ser un híbrido o quimera de cualquiera de las proteínas insecticidas anteriores.

En algunas realizaciones, uno o más de otros ácidos nucleicos de interés codifican uno o más agentes de tolerancia a herbicidas, por ejemplo, PAT (fosfinotricina N-acetiltransferasa), AAD-1 (ariloxialcanoato dioxigenasa 1), EPSPS (5-enolpiruvulshikimato-3-fosfato sintasa) o inhibidores de la protoporfirinógeno oxidasa (PPO, véase, por ejemplo, la Solicitud de Patente de EE. UU. n.º US2019185873). En algunas realizaciones, el agente de tolerancia a herbicidas comprende uno cualquiera o más de los siguientes eventos: GA21 (ver Publicación de PCT Núm. WO98/44140), NK603 (ver Patente de Estados Unidos de América Núm. US6825400), DAS40278 (ver Publicación de PCT Núm. WO2011/022469), DBN9858 (ver Publicación de PCT Núm. WO2016173508), MON87429 (ver Publicación de PCT Núm. WO19/152316), LW2-2 (ver Solicitud de Patente China Núm. CN113278721) y T25 (ver Petición USDA/APHIS 94-357-01 para la Determinación del Estatus No Regulado para Eventos de Transformación de Maíz Resistente a Glufosinato T14 y T25, junio de 1995).

En algunas realizaciones, uno o más ácidos nucleicos de interés codifican una o más enzimas, por ejemplo, una alfa-amilasa. En algunas realizaciones, la enzima comprende el

evento 3272 (ver Patente de Estados Unidos de América Núm. US7635799).

En algunas realizaciones, uno o más ácidos nucleicos de interés comprenden uno o más de los siguientes eventos:

5 MZDT09Y (ver Patente de Estados Unidos de América Núm. US9121033), LY038 (ver Patente de Estados Unidos de América Núm. US7157281), BT176 (ver Kozziel et al. (1993) Biotechnology 11: 194-200), y DP202216-6 (véase la solicitud de patente de los Estados Unidos n.º US2019320607).

10 Las plantas o semillas transgénicas que comprenden una molécula de ácido nucleico de la divulgación también pueden tratarse con un insecticida o un recubrimiento insecticida de semillas tal como se describe, por ejemplo, en las patentes de los Estados Unidos n.º 5,849,320 y 5,876,739. En algunas

15 realizaciones, tanto el insecticida o el recubrimiento insecticida de la semilla como la planta o semilla transgénica de la divulgación son activos contra el mismo insecto diana, por ejemplo, una plaga de lepidópteros (por ejemplo, el gusano cogollero). Por tanto, en algunas

20 realizaciones, se proporciona un método de potenciación del control de una población de insectos lepidópteros, que comprende proporcionar una planta transgénica o semilla de la divulgación y aplicar a la planta o la semilla un insecticida o recubrimiento insecticida de semillas.

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

Métodos de uso de moléculas de ácido nucleico y plantas transgénicas

En algunos aspectos, la divulgación también proporciona métodos para producir y usar una molécula de ácido nucleico de la divulgación y composiciones relacionadas tales como células y plantas que comprenden la molécula de ácido nucleico y usos de la misma.

En algunas realizaciones, los métodos de la divulgación proporcionan control de al menos una plaga de insectos lepidópteros, incluyendo, sin limitación, uno o más de los siguientes: *Spodoptera* spp. tal como *S. frugiperda* (gusano cogollero), *S. littoralis* (gusano foliar egipcio del algodón), *S. ornithogalli* (cogollero de bandas amarillas), *S. praefica* (cogollero de bandas amarillas del oeste), *S. eridania* (gusano soldado del sur), *S. litura* (Gusano cortador

común/Gusano de la hoja oriental), *S. cosmioides* (gusano cogollero negro), *S. exempta* (gusano cogollero africano), *S. mauritia* (gusano cogollero del césped) y/o *S. exigua* (gusano militar de la remolacha); *Ostrinia* spp. tal como *O. nubilalis* (barrenador europeo del maíz) y/o *O. furnacalis* (barrenador asiático del maíz); *Plutella* spp. tal como *P. xylostella* (polilla de espalda de diamante); *Agrotis* spp. tal como *A. ipsilon* (gusano cortador negro), *A. segetum* (gusano cortador común), *A. gladiaria* (gusano cortador granuloso), y/o *A. orthogonia* (gusano cortador del oeste pálido); *Striacosta* spp. tal como *S. albicosta* (gusano cortador del oeste del frijol); *Helicoverpa* spp. tal como *H. zea* (gusano cogollero del maíz/gusano de la vaina de la soya), *H. punctigera* (gusano nativo de los frutos), y/o *H. armigera* (oruga del algodón); *Heliothis* spp. tal como *H. virescens* (gusano del tabaco); *Diatraea* spp. tal como *D. grandiosella* (barrenador del maíz del suroeste) y/o *D. saccharalis* (barrenador de la caña de azúcar); *Trichoplusia* spp. tal como *T. ni* (oruga de la col); *Sesamia* spp. tal como *S. nonagroides* (Barrenador mediterráneo del maíz), *S. inferens* (Barrenador rosado del tallo) y/o *S. calamistis* (barrenador rosado del tallo); *Pectinophora* spp. tal como *P. gossypiella* (oruga rosa); *Cochylis* spp. tal como *C. hospes* (polilla del girasol rayada); *Manduca* spp. tal como *M. sexta* (gusano del tabaco) y/o *M. quinquemaculata* (gusano cornudo del tomate);

Elasmopalpus spp. tal como *E. lignosellus* (barrenador menor del tallo de maíz); *Pseudoplusia* spp. tal como *P. includens* (oruga de la soya); *Anticarsia* spp. tal como *A. gemmatalis* (gusano de terciopelo del frijol); *Plathypena* spp. tal como
5 *P. scabra* (gusano del trébol verde); *Pieris* spp. tal como *P. brassicae* (mariposa de la col), *Papaipema* spp. tal como *P. nebris* (barrenador de tallo); *Pseudaletia* spp. tal como *P. unipuncta* (cogollero común); *Peridroma* spp. tal como *P. saucia* (gusano cortador abigarrado); *Keiferia* spp. tal como
10 *K. lycopersicella* (gusano del tomate); *Artogeia* spp. tal como *A. rapae* (gusano de la col importado); *Phthorimaea* spp. tal como *P. operculella* (gusano tubérculo de la papa); *Chrysodeixis* spp. tal como *C. includens* (oruga de la soya); *Feltia* spp. tal como *F. ducens* (gusano cortador sucio); *Chilo*
15 spp. tal como *C. suppressalis* (barrenador rayado del tallo), *C. Agamemnon* (barrenador oriental del maíz), y *C. partellus* (barrenador manchado del tallo), *Cnaphalocrocis* spp. tal como *C. medinalis* (enrulador de las hojas del arroz), *Conogethes* spp. tal como *C. punctiferalis* (polilla amarilla del
20 melocotón), *Mythimna* spp. tal como *M. separata* (gusano cogollero oriental), *Athetis* spp. tal como *A. lepigone* (gusano cogollero de dos puntos), *Busseola* spp. tal como *B. fusca* (barrenador del tallo del maíz), *Etiella* spp. tal como *E. zinckenella* (barrenador de la vaina del pulso),
25 *Leguminivora* spp. tal como *L. glycinivorella* (barrenador de

la vaina de soya), *Matsumuraeses spp.* tal como *M. phaseoli* (gusano de la vaina adzuki), *Omiodes spp.* tal como *O. indicata* (enrulador de las hojas de soya/Gusano de hoja de frijol), *Rachiplusia spp.* tal como *R. nu* (oruga de girasol),
 5 o cualquier combinación de lo anterior. En algunas realizaciones, la plaga de lepidópteros es al menos *S. frugiperda* (gusano cogollero). En algunas realizaciones, la plaga de lepidópteros es al menos dos (por ejemplo, 2, 3 o 4) de *Spodoptera frugiperda* (gusano cogollero), *Mythimna*
 10 *separata* (gusano cogollero oriental), *Spodoptera litura* (gusano cortador común/gusano foliar oriental) y *Ostrinia furnacalis* (barrenador asiático del maíz).

En algunas realizaciones, los métodos proporcionan el control de una plaga o colonia de insectos gusano cogollero que es resistente a otra proteína insecticida tal como una
 15 proteína Vip3A (por ejemplo, un Vip3Aa, incluyendo sin limitación el evento de maíz MIR162), una proteína Cry1F (por ejemplo, Cry1Fa, incluyendo sin limitación el evento de maíz TC1507 o DP-4114), una proteína Cry1A (por ejemplo,
 20 Cry1A.105, incluyendo sin limitación el evento de maíz MON89034), y/o una proteína Cry2 (por ejemplo, Cry2Ab, incluyendo sin limitación el evento de maíz MON89034).

En realizaciones adicionales, se proporciona un método para controlar una plaga de lepidópteros, comprendiendo el
 25 método administrar a la plaga una cantidad eficaz de una

planta o parte de la planta que comprende una molécula de ácido nucleico de la divulgación. Para que sea eficaz, la proteína o proteínas insecticidas expresadas por la molécula de ácido nucleico de la divulgación son ingeridas por vía oral por la plaga. En algunas realizaciones, la proteína o proteínas insecticidas se administran a la plaga en una planta transgénica, en donde la plaga come (ingiere) una o más partes de la planta transgénica, ingiriendo así la proteína o proteínas insecticidas que se expresan en la planta transgénica.

También se abarcan métodos para producir una planta transgénica con propiedades insecticidas mejoradas. En realizaciones representativas, el método comprende: introducir en una planta una molécula de ácido nucleico de la divulgación, en donde la molécula de ácido nucleótido se expresa en la planta para producir una proteína o proteínas insecticidas, confiriendo así a la planta unas propiedades insecticidas mejoradas.

En algunas realizaciones, el método para introducir la molécula de ácido nucleico de la divulgación en la planta comprende en primer lugar transformar una célula vegetal con la molécula de ácido nucleico de la divulgación y regenerar una planta transgénica a partir de la misma, donde la planta transgénica comprende la molécula de ácido nucleico de la divulgación. En algunas realizaciones, el método comprende

introducir en una planta, cultivo de tejido, o una célula vegetal la molécula de ácido nucleico de la divulgación para obtener una planta transformada, cultivo de tejido transformado o una célula transformada que tiene propiedades insecticidas potenciadas; y cultivar la planta transformada o regenerar una planta transformada a partir del cultivo de tejido transformado o célula vegetal transformada, tal que se produzca una planta transgénica con propiedades insecticidas potenciadas.

Como alternativa, o además, la etapa de introducción puede comprender cruzar una primera planta que comprende la molécula de ácido nucleico de la divulgación con una segunda planta (por ejemplo, una planta diferente de la primera planta, por ejemplo, una planta que no comprende la molécula de ácido nucleico de la divulgación) y, opcionalmente, producir una planta de descendencia que comprenda la molécula de ácido nucleico de la divulgación. Por tanto, una planta transgénica abarca una planta que es el resultado directo de un evento de transformación y la descendencia de la misma (de cualquier generación) que comprende la molécula de ácido nucleico de la divulgación.

La divulgación proporciona además un método para identificar una planta transgénica de la divulgación, comprendiendo el método detectar la presencia de una molécula de ácido nucleico de la divulgación en una planta (o una

célula vegetal, parte de planta y similares derivados de la misma) e identificar así la planta como una planta transgénica de la divulgación tomando como base la presencia de la molécula de ácido nucleico de la divulgación.

5 Algunas realizaciones proporcionan además un método para producir una planta transgénica con una resistencia aumentada a al menos una plaga de insectos (por ejemplo, al menos una plaga de lepidópteros), comprendiendo el método: plantar una semilla que comprende una molécula de ácido nucleico de la
10 divulgación o vector de la divulgación y cultivar una planta transgénica a partir de la semilla, donde la planta transgénica comprende la molécula de ácido nucleico de la divulgación.

 Los métodos para producir una planta transgénica
15 descritos en el presente documento comprenden opcionalmente una etapa adicional de recolectar una semilla a partir de la planta transgénica, donde la semilla comprende la molécula de ácido nucleico de la divulgación. Opcionalmente, la semilla produce una planta transgénica adicional que comprende la
20 molécula de ácido nucleico de la divulgación.

 La divulgación proporciona además partes de la planta, células vegetales, órganos vegetales, cultivos vegetales, semillas, extractos vegetales, productos recolectados y productos procesados de las plantas transgénicas producidas
25 mediante los métodos de la divulgación.

Como un aspecto adicional, la divulgación también proporciona un método para producir semilla, comprendiendo el método: proporcionar una planta transgénica que comprende una molécula de ácido nucleico de la divulgación, y recolectar una semilla de la planta transgénica, en donde la semilla comprende la molécula de ácido nucleico de la divulgación. Opcionalmente, la semilla produce una planta transgénica adicional que comprende la molécula de ácido nucleico de la divulgación. En realizaciones representativas, la etapa de proporcionar la planta transgénica comprende plantar una semilla que produzca la planta transgénica.

Además, se proporciona un método para producir una semilla de la planta híbrida, comprendiendo el método: cruzar una primera planta endogámica, la cual es una planta transgénica que comprende una molécula de ácido nucleico de la divulgación, con una planta endogámica diferente (por ejemplo, una planta endogámica que no comprende una molécula de ácido nucleico de la divulgación) y permitir que se forme una semilla híbrida. Opcionalmente, el método comprende además recolectar una semilla híbrida. En algunas realizaciones, la semilla híbrida comprende la molécula de ácido nucleico de la divulgación. En algunas realizaciones, la semilla híbrida produce una planta transgénica que comprende la molécula de ácido nucleico de la divulgación.

En algunas realizaciones, la divulgación proporciona un método para producir un producto vegetal básico, comprendiendo el método usar una planta transgénica que comprende una molécula de ácido nucleico de la divulgación para producir dicho producto vegetal básico a partir de esta. Ejemplos de productos básicos vegetales incluyen grano, almidón, aceite de semilla, jarabe, harina, sémola, almidón, cereal, proteína y similares. Los métodos para producir dichos productos vegetales básicos se conocen bien en la técnica.

En algunos aspectos, la divulgación proporciona un método para detectar la presencia de una molécula de ácido nucleico en una muestra, comprendiendo el método: (a) poner en contacto la muestra con un par de cebadores que, cuando se utilizan en una reacción de amplificación de ácido nucleico con el ADN que comprende la molécula de ácido nucleico de cualquiera de las realizaciones mencionadas anteriormente o cualquier otra realización descrita en el presente documento (por ejemplo, que comprende una cualquiera de las SEQ ID NO: 1 u 8 a 31 o una o más de las variantes de la tabla 3), produce un amplicón que es diagnóstico para la molécula de ácido nucleico; (b) realizar una reacción de amplificación de ácido nucleico, produciendo así el amplicón; y (c) detectar el amplicón. En algunas realizaciones, el par de cebadores es un primer cebador y un segundo cebador en donde el primer

cebador comprende al menos 10 (por ejemplo, al menos 10, al menos 15 o al menos 20) nucleótidos contiguos que son complementarios a una cualquiera de las SEQ ID NO: 1 u 8 a 31 o una o más de las variantes de la tabla 3 y el segundo

5 cebador comprende al menos 10 nucleótidos contiguos que son complementarios al complemento inverso de una cualquiera de los SEQ ID NO: 1 u 8 a 31 o una o varias de las variantes en la tabla 3. En algunas realizaciones, el primer y el segundo cebador están entre 10-50, 10-40, 10-30, o 10-20 nucleótidos

10 de longitud. En algunas realizaciones, la muestra es una muestra obtenida de una parte o una célula de la planta de maíz.

En algunos aspectos, la divulgación proporciona un método para detectar la presencia de una molécula de ácido

15 nucleico en una muestra, comprendiendo el método: (a) poner en contacto la muestra con una sonda que se hibrida en condiciones de alta rigurosidad con el ADN que comprende la molécula de ácido nucleico de cualquiera de las realizaciones mencionadas anteriormente o cualquier otra realización

20 descrita en el presente documento (por ejemplo, que comprende una cualquiera de las SEQ ID NO: 1 u 8 a 31 o una o más de las variantes de la tabla 3) y que no hibride en condiciones de alta rigurosidad con el ADN de una planta de maíz de control que no comprenda la molécula de ácido nucleico; (b)

25 someter la muestra y la sonda a condiciones de hibridación de

alta rigurosidad; y (c) detectar la hibridación de la sonda con la molécula de ácido nucleico. En algunas realizaciones, la sonda comprende al menos 10 (por ejemplo, al menos 10, al menos 15 o al menos 20) nucleótidos contiguos que son complementarios a una cualquiera de las SEQ ID NO: 1 u 8 a 31 o una o varias de las variantes de la tabla 3 o su complemento inverso. En algunas realizaciones, la sonda tiene entre 10-50, 10-40, 10-30, o 10-20 nucleótidos de longitud. En algunas realizaciones, la muestra es una muestra obtenida de una parte o una célula de la planta de maíz.

En algunos aspectos, la divulgación proporciona un par de cebadores de polinucleótido que comprenden un primer cebador de polinucleótido y un segundo cebador de polinucleótido que funcionan juntos en presencia de la molécula de ácido nucleico de cualquiera de las realizaciones mencionadas anteriormente o de cualquier otra realización descrita en el presente documento (por ejemplo, que comprende una cualquiera de las SEQ ID NO: 1 u 8 a 31 o una o más de las variantes de la tabla 3) en una muestra para producir un amplicón de diagnóstico de la presencia de la molécula de ácido nucleico en una muestra. En algunas realizaciones, la muestra es una muestra obtenida de una parte o una célula de la planta de maíz. En algunas realizaciones, el primer cebador de polinucleótido comprende al menos 10 nucleótidos contiguos que son complementarios a una cualquiera de las SEQ

ID NO: 1 u 8 a 31 o cualquiera de las variantes de la tabla 3 y el segundo cebador de polinucleótido comprende al menos 10 (por ejemplo, al menos 10, al menos 15 o al menos 20) nucleótidos contiguos que son complementarios al complemento
5 inverso de una cualquiera de las SEQ ID NO: 1 u 8 a 31 o una o varias de las variantes en la tabla 3. En algunas realizaciones, el primer y el segundo cebador están entre 10-50, 10-40, 10-30, o 10-20 nucleótidos de longitud.

En algunos aspectos, la divulgación proporciona un kit
10 para detectar la molécula de ácido nucleico de cualquiera de las realizaciones mencionadas anteriormente o cualquier otra realización descrita en el presente documento (por ejemplo, que comprende una cualquiera de las SEQ ID NO: 1 u 8 o 31 o una cualquiera o más de las variantes de la tabla 3),
15 comprendiendo el kit al menos una molécula de ácido nucleico con una longitud suficiente de nucleótidos contiguos para funcionar como cebador o sonda en un método de detección de ácido nucleico, y que tras la amplificación de, o la hibridación con, una secuencia de ácido nucleico objetivo en
20 una muestra, seguida de la detección del amplicón o la hibridación con la secuencia objetivo, son diagnósticos de la presencia de la molécula de ácido nucleico. En algunas realizaciones, la al menos una molécula de ácido nucleico comprende al menos 10 (por ejemplo, al menos 10, al menos 15
25 o al menos 20) nucleótidos contiguos que son complementarios

a una cualquiera de las SEQ ID NO: 1 u 8 a 31 o una o varias de las variantes en la tabla 3. En algunas realizaciones, la al menos una molécula de ácido nucleico comprende un par de cebadores, en donde el primer cebador de polinucleótido comprende al menos 10 (por ejemplo, al menos 10, al menos 15 o al menos 20) nucleótidos contiguos que son complementarios a una cualquiera de las SEQ ID NO: 1 u 8 a 31 o cualquiera de las variantes de la tabla 3 y el segundo cebador de polinucleótido comprende al menos 10 (por ejemplo, al menos 10, al menos 15 o al menos 20) nucleótidos contiguos que son complementarios al complemento inverso de una cualquiera de las SEQ ID NO: 1 u 8 a 31 o una o varias de las variantes en la tabla 3. En algunas realizaciones, el primer y el segundo cebador están entre 10-50, 10-40, 10-30, o 10-20 nucleótidos de longitud. En algunas realizaciones, la al menos una molécula de ácido nucleico comprende una sonda que comprende al menos 10 nucleótidos contiguos que son complementarios a una cualquiera de las SEQ ID NO: 1 u 8 a 31 o una o varias de las variantes de la tabla 3 o su complemento inverso. En algunas realizaciones, la sonda tiene entre 10-50, 10-40, 10-30, o 10-20 nucleótidos de longitud. Los kits de la divulgación también pueden comprender opcionalmente reactivos e/o instrucciones para realizar la detección como se describe en la presente.

En algunos aspectos, la divulgación proporciona métodos para modificar una molécula de ácido nucleico de la divulgación, por ejemplo, en una célula o planta. En algunas realizaciones, la modificación es una eliminación, una inserción (por ejemplo, de una secuencia de ácido nucleico heteróloga), una sustitución, una duplicación, o inversión, o una combinación de las mismas. En algunas realizaciones, la modificación comprende la eliminación de una porción o la totalidad de una secuencia codificante de un marcador de selección presente en la molécula de ácido nucleico, por ejemplo, una secuencia codificante PMI o EPSPS. En algunas realizaciones, la modificación se introduce usando una nucleasa, tal como una nucleasa CRISPR-Cas, una nucleasa con dedos de zinc, una meganucleasa, una nucleasa efectora TAL (TALEN), o una combinación de las mismas.

En algunas realizaciones, la modificación se realiza en una célula hospedadora o planta de la divulgación, por ejemplo, una célula de maíz o planta de maíz, para producir una célula transgénica modificada o una planta transgénica modificada. En algunas realizaciones, la modificación se realiza expresando la nucleasa en la célula hospedadora o planta (por ejemplo, transformando la célula hospedadora o planta con un casete de expresión que codifica la nucleasa o cruzando la planta con otra planta que contiene dicho casete de expresión). En algunas realizaciones, la modificación se

realiza introduciendo directamente la nucleasa en la célula hospedadora o planta, por ejemplo, usando reactivos que transfieren la nucleasa a la célula hospedadora o planta, tal como mediante métodos físicos tales como biolística/bombardeo de partículas, transfección de protoplastos, administración mediada por nanopartículas, inyección de granos de aerosol o administración mediada por filamentos. En algunas realizaciones, el método comprende además producir una planta a partir de la célula hospedadora transgénica modificada para producir una planta transgénica modificada. En algunas realizaciones, el método comprende además autofecundar o cruzar la planta transgénica modificada con otra planta durante al menos una generación (por ejemplo, una, dos, tres, cuatro o más generaciones), produciendo de esta manera una planta de progenie transgénica modificada. En algunas realizaciones, la divulgación proporciona dicha célula transgénica modificada, planta transgénica modificada o planta de descendencia transgénica modificada, por ejemplo, producida mediante un método del presente documento.

En ciertas realizaciones, la modificación de ácido nucleico se ve afectada mediante un sistema de nucleasa con dedos de cinc (ZFN) (modificado). El sistema de ZFN utiliza enzimas de restricción artificiales generadas mediante la fusión de un dominio de unión al ADN con dedos de cinc con un dominio de escisión de ADN que puede genomanipularse para

dirigirse a las secuencias de ADN deseadas. Los ejemplos no limitantes de métodos de uso de ZFN se pueden encontrar, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos de América Núm. 6,534,261; 6,607,882; 6,746,838; 6,794,136; 6,824,978; 5 6,866,997; 6,933,113; y 6,979,539.

En ciertas realizaciones, la modificación de ácido nucleico se ve afectada por una meganucleasa, que son endodesoxirribonucleasas caracterizadas por un sitio de reconocimiento grande (secuencias de ADN de doble hebra de 12 10 a 40 pares de bases). Se pueden encontrar ejemplos no limitantes de métodos de uso de meganucleasas en las Patentes de Estados Unidos de América Núm: 8,163,514; 8,133,697; 8,021,867; 8,119,361; 8,119,381; 8,124,369; y 8,129,134.

En determinadas realizaciones, la modificación de ácido nucleico se ve afectada mediante un complejo o sistema 15 CRISPR/Cas. En ciertas realizaciones, el sistema o complejo de CRISPR/Cas es un sistema de CRISPR/Cas de clase 2. En ciertas realizaciones, dicho sistema o complejo CRISPR/Cas es un sistema o complejo CRISPR/Cas de tipo II, de tipo V o de 20 tipo VI. El sistema CRISPR/Cas no requiere la generación de proteínas personalizadas para dirigirse a secuencias específicas, sino que puede programarse una nucleasa Cas mediante una guía de ARN (ARNg) para que reconozca un objetivo de ácido nucleico específico, en otras palabras, la 25 nucleasa Cas puede reclutarse para un locusobjetivo de ácido

nucleico específico de interés usando dicha guía de ARN corta.

En general, el sistema de CRISPR/Cas o CRISPR, como se utiliza en la presente, se refiere colectivamente a los
5 elementos involucrados en la expresión o dirección de la actividad de nucleasa asociada a CRISPR ("Cas"), que incluye secuencias que codifican para un gen Cas y uno o más de, una secuencia de tracr (CRISPR de transactivación) (por ejemplo, tracrRNA o un tracrRNA parcial activo), una secuencia de
10 emparejamiento de tracr (que abarca una "repetición directa" y una repetición directa parcial procesada por tracrRNA en el contexto de un sistema de CRISPR endógeno), una secuencia guía (también conocida como un "espaciador" en el contexto de un sistema de CRISPR endógeno), o "ARN(s)" como se utiliza
15 ese término en la presente (por ejemplo, ARN(s) para guiar Cas, tal como Cas9, por ejemplo, ARN de CRISPR y, cuando corresponda, ARN de transactivación (tracr) o un ARN guía individual (ARNgu) (ARN quimérico)) u otras secuencias y transcriptos de un locus de CRISPR. En general, un sistema de
20 CRISPR se caracteriza por elementos que promueven la formación de un complejo de CRISPR en el sitio de una secuencia diana (también conocido como protoespaciador en el contexto de un sistema de CRISPR endógeno). En el contexto de la formación de un complejo CRISPR, "secuencia objetivo" se
25 refiere a una secuencia con la que una secuencia de guía se

diseña para que tenga complementariedad, en donde la hibridación entre una secuencia objetivo y una secuencia de guía promueve la formación de un complejo CRISPR.

5 En ciertas realizaciones, el ARNg es un ARN de guía quimérico o un ARN de guía simple (ARNgs). En ciertas realizaciones, el ARNg comprende una secuencia de guía y una secuencia tracr mate (o repetición directa). En ciertas realizaciones, el ARNg comprende una secuencia de guía, una secuencia tracr mate (o repetición directa) y una secuencia tracr. En ciertas realizaciones, el sistema o complejo CRISPR/Cas como se describe en el presente documento no comprende y/o no depende de la presencia de una secuencia tracr (por ejemplo, si la nucleasa Cas es Cas12a).

15 La nucleasa CRISPR-Cas puede ser cualquiera de dichas nucleasas conocida en la técnica, tal como Cas9, Cas12a, Cas12b, Cas12i, Cas13a (anteriormente denominada C2c2), C2c3, Cas13b o una versión modificada de cualquiera de las anteriores. Las nucleasas CRISPR-Cas se conocen bien en la técnica (véase, por ejemplo, Dong et al. Efficient Targeted Mutagenesis Mediated by CRISPR-Cas12a Ribonucleoprotein Complexes in Maize. Front. Genome Ed. (2021), vol. 3, artículo 670529; Wei et al. TALEN or Cas9 - Rapid, Efficient and Specific Choices for Genome Modifications. J. of Genetics and Genomics (2013), vol. 40, págs. 281-289; Sedeek et al. Plant Genome Engineering for Targeted Improvement of Crop

20

25

Traits. *Frontiers in Plant Science* (2019), vol. 10, artículo 114; y Zhang et al. Applications and potential of genome editing in crop improvement. *Genome Biology* (2018), vol. 19, artículo 210).

5

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Constructos sintetizados

Se construyeron construcciones de vectores binarios que contenían diferentes combinaciones de potenciadores transcripcionales, promotores, péptidos de tránsito y terminadores, y variantes de estos elementos genéticos, que conducen la expresión de variantes de eCry1Gb.1Ig. Estos elementos genéticos se sintetizaron y ligaron en cada vector binario a través de un método de clonación basado en enzimas de restricción. Todos los promotores utilizados fueron promotores constitutivos medios o fuertes o promotores virales. Se crearon versiones de los genes eCry1Gb.1Ig con diferentes preferencias de codones para probar el nivel de expresión y la eficacia deseados. La tabla 1 muestra los constructos creados y lista los elementos genéticos con cada secuencia de codificación (CDS). La tabla 2 describe cada uno de los elementos genéticos nombrados en la tabla 1.

15

20

Tabla 1: Composición de constructos binarios

ID del constru cto	Posici ón del casete	Promotor	Péptido de tránsito	CDS	Terminador
--------------------------	----------------------------	----------	---------------------------	-----	------------

25

5

10

15

20

24795	1	prSoUbi4 -02		eCry1Gb.1I g-03	tZmUbi361- 05
	2	prUbi1- 43		cPMI-15	tUbi1-04
23698	1	prUbi1- 18		eCry1Gb.1I g-01	tZmUbi361- 01
	2	prUbi1- 18		cPMI-01	tUbi1-04
24530	1	prScBv- 05		eCry1Gb.1I g-02	tNOS-05-01
	2	prUbi1- 18		cPMI-01	tUbi1-04
24534	1	pr35S-12		eCry1Gb.1I g-02	tNOS-05-01
	2	prUbi1- 43		cPMI-15	tUbi1-04
25628	1	prSoUbi4 -02	xOTPSSUct -02	eCry1Gb.1I g-03	tZmUbi361- 05
	2	prUbi1- 43		cPMI-15	tUbi1-04

Tabla 2: Descripción de Elementos Genéticos

Elemento	Nombre	Descripción con referencias pertinentes
promotor	SoUbi4-02	Promotor constitutivo de Ubiquitina 4 de <i>Saccharum officinarum</i> que contiene

25

			el primer intrón (número de accesoión de NCBI AF093504.1).
5	promotor	ScBv-05	Promotor modificado de aislado de badnavirus IM baciliforme de caña de azúcar Ireng Maleng (ScBVIM) (Davies et. al. 2014).
10	promotor	Ubil-18	Región de promotor del gen de poliubiquitina de <i>Zea mays</i> que contiene el primer intrón (número de accesoión de NCBI S94464.1). Proporciona expresión constitutiva en monocotiledóneas (Christensen et al. 1992).
15	promotor	Ubil-43	Región de promotor del gen de poliubiquitina de <i>Zea mays</i> que contiene el primer intrón (número de accesoión de NCBI S94464.1). Proporciona una expresión constitutiva en monocotiledóneas (Christensen et al. 1992).
20	promotor	35S-12	Promotor modificado del virus del mosaico de coliflor (Odell et al. 1985, Nature 313: 810-812).
25	péptido de	xOTPSSUct-02	Péptido quimérico optimizado de tránsito de la subunidad pequeña de

	tránsito		la rubisco de girasol y maíz, similar al pDPG434 (patente de los Estados Unidos 6,040,497).
5	secuencia codificante ante	eCry1Gb.1Ig -01	Gen optimizado por codones que codifica para la proteína modificada eCry1Gb.1Ig, que es una quimera de Cry1Gb y Cry1Ig. Ambas proteínas Cry1Gb y Cry1Ig proceden de genomas secuenciados de la bacteria del suelo <i>Bacillus thuringiensis</i> y son activas contra varias especies de plagas de lepidópteros. La proteína eCry1Gb.1Ig se genomodificó para que tuviera una actividad insecticida mejorada contra el gusano cogollero (<i>Spodoptera frugiperda</i>) (véase, por ejemplo, la Publicación de Patente Internacional Número WO2018111553). La proteína eCry1Gb.1Ig también tiene actividad contra otras especies de plagas, incluyendo, por ejemplo, el gusano cogollero oriental (<i>Mythimna separata</i>), el gusano cortador común/gusano oriental de la hoja (<i>Spodoptera litura</i>) y el barrenador
10			
15			
20			
25			

		asiático del maíz (<i>Ostrinia furnacalis</i>) (véase, por ejemplo, la Solicitud de Patente Internacional Número PCT/CN2021/073190).
5	secuenci a codific ante	eCry1Gb.1Ig-02
10		Gen optimizado por codones que codifica para la proteína modificada eCry1Gb.1Ig, que es una quimera de Cry1Gb y Cry1Ig. Esta versión codifica la misma proteína pero difiere de eCry1Gb.1Ig-01 en cuatro pares de bases para eliminar los marcos abiertos de lectura no deseados.
15	secuenci a codific ante	eCry1Gb.1Ig-03
		Secuencia que codifica para la proteína modificada eCry1Gb.1Ig, que es una quimera de Cry1Gb y Cry1Ig. Se introdujeron mutaciones silenciosas para optimizar el uso de codones.
20	secuenci a codific ante	PMI-01
25		El gen pmi de <i>Escherichia coli</i> que codifica para la enzima fosfomanosa isomerasa (PMI) (número de acceso de NCBI M15380.1); este gen también se conoce como manA. Cataliza la isomerización de manosa-6-fosfato a fructosa-6-fosfato (Negrotto et al.

		2000).
5	secuenci codific ante	PMI-15 El gen pmi de <i>Escherichia coli</i> que codifica para la enzima fosfomanosa isomerasa (PMI) (número de acceso de NCBI M15380.1); este gen también se conoce como manA. Cataliza la isomerización de manosa-6-fosfato a fructosa-6-fosfato (Negrotto et al. 2000). Se introdujeron mutaciones silenciosas en comparación con PMI-01.
10	termina dor	ZmUbi361-01 Terminador derivado del gen de la ubiquitina del maíz (Nuccio 2018).
15	termina dor	ZmUbi361-05 Terminador derivado del gen de ubiquitina de maíz (Nuccio 2018) con mutaciones para remover marcos de lectura abiertos no deseados en comparación al terminador de ZmUbi361-01.
20	termina dor	NOS-05-01 Secuencia terminadora del gen de nopalina sintasa (nos) de <i>A. tumefaciens</i> (número de acceso de NCBI V00087.1). Proporciona un sitio de poliadenilación (Bevan et al. 1983).
25		

termina dor	Ubil-04	Terminador del gen de la ubiquitina 1 de <i>Z. mays</i> . Una mutación de pb para remover un sitio de restricción interno en comparación al terminador de Ubil-01.
----------------	---------	--

5

Ejemplo 2: Transformación mediada por *Agrobacterium* con selección de fosfomanosa isomerasa (PMI)

Cada uno de los constructos de vector binario se utilizó para crear eventos transgénicos de maíz. La transformación de *Zea mays* para producir maíz genéticamente modificado se logró usando embriones inmaduros a través de la transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, tal como se describe en Zhong et al. (2018) (Advances in *Agrobacterium*-mediated Maize Transformation. En: Lagrimini L. (eds) Maize. Methods in Molecular Biology, vol 1676. Humana Press, Nueva York, NY). Se utilizó la cepa LBA4404 (*recA*⁻) de *A. tumefaciens* que alberga el plásmido pTi desarmado pAL4404 y el plásmido auxiliar pVGW7 para la transformación de maíz. Información detallada sobre los plásmidos pAL4404 y pVGW7 se describe por Hoekema et al. (*Nature*. (1983) 303:179-189), Ishida et al. (*Nat Biotechnol* (1996) 14:745-750) e Imayama et al. (US10266835). Una cepa de *A. tumefaciens* LBA4404 (*recA*⁻) que contenía vectores binarios individuales se preparó tal como se describe por Li et al. (*Plant Physiol* (2003) 133:736-47). Para la transformación del maíz, se recolectaron

10

15

20

25

embriones inmaduros de la línea endogámica de maíz cultivada en invernadero NP2222 aproximadamente 9 días después de la polinización y se usaron como explantes (Zhong *et al.*, 2018). El aislamiento de embriones inmaduros, la inoculación de Agrobacterium y el cocultivo de Agrobacterium con los embriones inmaduros se realizaron según lo descrito en Zhong *et al.* (2018) usando el método de extracción a granel descrito en el mismo. Usando este método, los elementos genéticos dentro de las regiones de borde izquierdo y derecho del plásmido de transformación se transfirieron de manera eficiente y se integraron en el genoma de la célula vegetal, en tanto que los elementos genéticos fuera de estas regiones de borde no se transfirieron.

Los tejidos transformados y los supuestos eventos transgénicos se regeneraron y enraizaron tal como se describió anteriormente (Zhong *et al.*, 2018) usando medios con selección de manosa para eventos que contenían un marcador seleccionable de fosfomanosa isomerasa (PMI) (Negrotto *et al.*, (2000) Plant Cell Rep. 19:789-803.) o usando el herbicida N-(fosfonometil)-glicina 2 mM (TouchDown®) como agente de selección para eventos que contienen una versión modificada de una enzima 5-enol piruvilshikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS).

Las plántulas regeneradas se probaron para la presencia de los genes diana y el gen marcador seleccionable de planta

(PMI o EPSPS) por análisis de PCR TAQMAN[®] en tiempo real desarrollado por Ingham et al. (Biotechniques 31(1):132-4, 136-40, 2001). Las plantas positivas para los genes diana y el marcador seleccionable, también conocidos como eventos, se transfirieron al invernadero para su propagación posterior. En una planta transformada con el vector binario 24795 (SEQ ID NO: 2), se encontró que el casete de expresión (SEQ ID NO: 1) contenía una mutación silenciosa en la secuencia de codificación de cPMI-15 (SEQ ID NO: 7), creando una secuencia de casete de expresión ligeramente modificada en la planta (SEQ ID NO: 8). Tras la secuenciación adicional, se encontraron mutaciones adicionales como se muestra en la tabla 3 (véanse también las SEQ ID NO: 9-31). Las plantas de las que se obtuvieron los resultados de la secuenciación no parecieron tener ningún impacto negativo significativo en la eficacia en relación con el grupo de otras plantas que contenían la SEQ ID NO: 1.

20

25

Tabla 3. Variantes adicionales identificadas por secuenciación

5	Posición en SEQ ID NO 1	Referencia	Variantes	Secuencia de referencia	Secuencia variante
10	324	TC	T	CTCCCTCCTCCCCGTTA (SEQ ID NO: 32)	CTCCCTCCTCCCCGTTA (SEQ ID NO: 33)
15	711	G	T	TGATTCTGCGGGTTG GC (SEQ ID NO: 34)	TGATTCTGCTGGTTGGC (SEQ ID NO: 35)
20	7271	A	AC	TAATAAATAGACACC CCCTCCACACCCTCTT (SEQ ID NO: 36)	TAATAAATAGACACCCC CCTCCACACCCTCTT (SEQ ID NO: 37)
20	7387	T	TC	CTCGTCCTCCCCCCCC CCCCCCTC (SEQ ID NO: 38)	CTCGTCCTCCCCCCCCC CCCCCCTC (SEQ ID NO: 39)
25	7989	A	AT	CGGTCGTTTCATTTCGT TCTA (SEQ ID NO: 40)	CGGTCGTTTCATTTCGTT CTA (SEQ ID NO: 41)

5	6015	C	CT	AGACTAGTGGCTTGC TTTTTCGTATGTCT (SEQ ID NO: 42)	AGACTAGTGGCTTGCTT TTTTTCGTATGTCT (SEQ ID NO: 43)
	6470	AT	A	AAAAAATTACCACAT ATTTTTTTTGTGACA (SEQ ID NO: 44)	AAAAAATTACCACATAT TTTTTTGTGACA (SEQ ID NO: 45)
	6683	CT	C	TAGTGTGCATGTGTT CTCCTTTTTTTTTTGC AAA (SEQ ID NO: 46)	TAGTGTGCATGTGTTCT CCTTTTTTTTTGCAAA (SEQ ID NO: 47)
10	7387	T	TC	GTACGCCGCTCGTCC TCCCCCCCCCCCCCT CT (SEQ ID NO: 48)	GTACGCCGCTCGTCCTC CCCCCCCCCCCCCTCT (SEQ ID NO: 49)
15	8397	C	CA	GATCTCCGATCATGC AAAAACTCATTA CAGT (SEQ ID NO: 50)	GATCTCCGATCATGCAA AAAAACTCATTA T (SEQ ID NO: 51)
20	5944	CT	C	CTTATGCAGAACCTT TTTTTTTG (SEQ ID NO: 52)	CTTATGCAGAACCTTTT TTTTG (SEQ ID NO: 53)
25	6015	CT	C	GGAGACTAGTGGCTT GCTTTTTTCGTATGTC T (SEQ ID NO: 54)	GGAGACTAGTGGCTTGC TTTTTCGTATGTCT (SEQ ID NO: 55)

5	7387	T	TC	ACGCCGCTCGTCCTC CCCCCCCCCCCCCTCT (SEQ ID NO: 56)	ACGCCGCTCGTCCTCCC CCCCCCCCCCCCCTCT (SEQ ID NO: 57)
	7576	TG	T	GCCAGTGTTTCTCTT TGGGGAATCCTGGGA T (SEQ ID NO: 58)	GCCAGTGTTTCTCTTTG GGAATCCTGGGAT (SEQ ID NO: 59)
	10055	G	GT	ACTAACAATTAGTTT CAGTGCATTCAAACA (SEQ ID NO: 60)	ACTAACAATTAGTTTTC AGTGCATTCAAACA (SEQ ID NO: 61)
10	347	TC	T	TTATAAATTGGCTTC ATCCCCTCCTTGCCT CAT (SEQ ID NO: 62)	TTATAAATTGGCTTCAT CCCTCCTTGCCTCAT (SEQ ID NO: 63)
15	1579	A	AT	CATATATCATGTATT TTTTTTTGG (SEQ ID NO: 64)	CATATATCATGTATTTT TTTTTTTGG (SEQ ID NO: 65)
20	7387	T	TC	TACGCCGCTCGTCCT CCCCCCCCCCCCCT (SEQ ID NO: 66)	TACGCCGCTCGTCCTCC CCCCCCCCCCCCCT (SEQ ID NO: 67)
	7720	CT	C	CATCTTTTCATGCTT TTTTTTGTCTTGGTT GTGATG (SEQ ID NO: 68)	CATCTTTTCATGCTTTT TTTGTCTTGGTTGTGAT G (SEQ ID NO: 69)
25	8656	A	G	CCTGTTCAAAGTATT	CCTGTTCAAAGTATTGT

			ATGCGCAGCACAGCC A (SEQ ID NO: 70)	GCGCAGCACAGCCA (SEQ ID NO: 71)
8870	GC	G	GTCTCCCTACTCCAG CCGGTCGCAGGTGCA C (SEQ ID NO: 72)	GTCTCCCTACTCCAGCG GTCGCAGGTGCAC (SEQ ID NO: 73)
9064	AC	A	AATTTCTGAATTTTA CCCGGAAGACAGCGG (SEQ ID NO: 74)	AATTTCTGAATTTTACC GGAAGACAGCGG (SEQ ID NO: 75)

Ejemplo 3: ELISA cuantitativo para la detección de proteínas de rasgos

La detección de las diferentes proteínas características usó dos anticuerpos monoclonales producidos contra cada proteína. Se tomaron muestras de las hojas de eventos transgénicos y se extrajeron en solución salina amortiguada con fosfato pH 7.3 (PBS) que contenía Tween-20 al 0.05% (PBST). La proteína soluble total (TSP) del extracto se midió usando el ensayo de proteínas Pierce BCA (Thermo Scientific, Rockford, IL). Se recubrieron placas de poliestireno de alta unión (Nunc Maxisorp n.º 430341) a 4°C durante la noche con 1 µg/ml del anticuerpo monoclonal específico (MAb) en borato 25 mM, NaCl 75 mM, pH 8.5. Las placas se lavaron cinco veces con PBST. Se añadieron muestras o estándares en diluyente ELISA (PBST que contenía albúmina de suero bovino al 1%) a la placa

(100 µl/pocillo), se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente (TA) con agitación y se lavaron cinco veces. A continuación, se añadió a la placa MAb secundario marcado con HRP (100 µl/pocillo) diluido 1/10.000 en diluyente ELISA, se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación y se lavó como antes. Se añadió sustrato tetrametilbencidina (SurModics, Eden Prairie, MN) (100 µl/pocillo) y se dejó que se desarrollara durante 15-30 min a temperatura ambiente con agitación. La reacción se detuvo usando HCl 1 N (100 µl/pocillo). La absorbancia se midió a 450 nm utilizando un lector de microplacas (BioTek Powerwave XS2, Winooski, VT). La curva patrón utilizó un ajuste de la curva de cuatro parámetros para representar gráficamente las concentraciones frente a la absorbancia. Para normalizar la eficiencia de extracción, la concentración de cada analito se dividió por la concentración de la proteína soluble total (TSP).

Tabla 4: Resumen de los datos de expresión de ELISA

ID de constructo	# de eventos	ng eCry1Gb.1Ig /mg TSP (promedio)	ng eCry1Gb.1Ig/mg TSP (rango)
24795	257	23	1-121
23698	43	57	30-125
24530	13	0.4	0.1-0.8
24534	29	0.9	0.3-2.3
25628	16	0	NA

Los constructos 24530, 24534 y 25628 sorprendentemente sólo produjeron eventos con expresión muy baja o ninguna expresión de la proteína de rasgo, aunque la secuencia de la proteína de rasgo se emparejó con un promotor que se esperaba
5 que fuera un promotor medio o fuerte.

Ejemplo 4: Prueba de Eficacia en Invernadero

Se confirmó que 279 eventos de maíz transgénico del constructo 24795 tenían inserción de ADNt de copia individual y expresión de proteína de rasgo mediante análisis de ELISA
10 como se describe en el ejemplo 3. De esta población, se seleccionaron 45 eventos de maíz transgénico de la construcción 24795, así como eventos de maíz transgénico de las otras construcciones mencionadas en la tabla 4 para pruebas de bioensayo. Los eventos seleccionados representaron
15 un rango de expresión de eCry1Gb.1Ig, que comprende una mezcla de expresiones bajas, medias y altas. El muestreo del bioensayo consistió en un bioensayo de hojas separadas, donde se extirpó una porción de la hoja de la planta, se colocó en una placa de Petri con una almohadilla de filtro humedecida
20 con agua esterilizada y se infestó con aproximadamente 10 larvas neonatas del gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda*). Se incubaron los ensayos a temperatura ambiente de laboratorio y se clasificaron 5 días después de la infestación. Se clasificó cada muestra por porcentaje de
25 protección de hojas (escala 1-5) y mortalidad de insectos

(escala 1-3). Los eventos que recibieron un porcentaje de calificación de protección de la hoja de 1 o 2 (es decir, menos del 5 % de daño en el disco de la hoja extirpado) y alcanzaron el 100 % de mortalidad de las larvas neonatas se consideraron eficaces y se usaron como punto de referencia para el rendimiento de la construcción. Los datos del bioensayo para los 45 eventos analizados se extrapolaron a aquellos eventos cuya expresión génica característica fue similar, lo que dio como resultado un total de 65 eventos de 24795 que cumplieron con los criterios de eficacia y expresión y progresaron para una caracterización adicional. Los eventos de las construcciones 23698, 24530, 24534 y 25628 no cumplieron con los criterios de eficacia y expresión; estos construcciones no fueron seleccionadas para una progresión adicional.

Ejemplo 5: Ensayos de eficacia en campo

24 eventos de maíz transgénico del constructo 24795 se probaron en ciclos de campo en Argentina. Se sembraron los eventos en hileras de una parcela con 3 repeticiones cada una. Las clasificaciones para el gusano cogollero de caída foliar (*Spodoptera frugiperda*) se evaluaron a partir de ocho plantas para cada fila. Se evaluó el daño foliar mediante la Escala de Davis de 0-9, (Davis, F.M. & Williams, W.P. 1992. Escalas de calificación visual para cribar maíz en etapa de espiral para resistencia al gusano cogollero. Mississippi

Agricultural & Forestry Experiment Station, Technical
Bulletin 186, Mississippi State University, MS39762,
EE. UU.). 14 de 24 eventos de la construcción anterior
tuvieron una eficacia aceptable contra el gusano cogollero.

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

.

10

15

20

25