

TÍTULO DE LA INVENCION
PROTEÍNAS INHIBIDORAS DE INSECTOS NOVEDOSAS
REFERENCIA CON SOLICITUDES RELACIONADAS

[01] Esta solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud de Patente Provisional de los
5 Estados Unidos N° 62/795.066 presentada el 22 de enero de 2019, que se incorpora a la presente a modo de referencia en su totalidad.

INCORPORACIÓN DE LISTADO DE SECUENCIA

[02] El archivo denominado “MONS469WO_ST25.txt” que contiene un formato legible por
computadora del Listado de Secuencia se creó el 21 de enero de 2020. Este archivo tiene 82,7
10 kilobytes (medido en MS-Windows®), presentado al mismo tiempo a través de presentación electrónica (usando el Sistema de presentación EFS-Web de la Oficina de Patentes de los Estados Unidos), y que se incorpora a modo de referencia en su totalidad.

CAMPO DE LA INVENCION

[03] La invención generalmente se refiere al campo de proteínas inhibidoras de insectos. Se
15 revela una clase novedosa de proteínas que presenta actividad inhibidora de insectos contra plagas relevantes desde el punto de vista agrícola de plantas de cultivo y semillas. En particular, la clase revelada de proteínas es activa desde el punto de vista insecticida contra plagas relevantes desde el punto de vista agrícola de plantas de cultivo y semillas, particularmente especies *Lepidóptera* de plagas de insectos. Se proporcionan plantas, partes
20 de plantas, y semillas que contienen un constructo de polinucleótidos recombinante que codifica una o más de las proteínas de toxinas reveladas.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[04] Mejorar el rendimiento de cultivos de plantas importantes desde el punto de vista
agrícola incluyendo entre otras, maíz, soja, caña de azúcar, arroz, trigo, vegetales, y algodón,
25 se ha tornado cada vez más importante. Además de la creciente necesidad de productos agrícolas para alimentación, vestimenta, y el suministro de energía para una población de seres humanos en aumento, los efectos relacionados al clima y la presión a partir de población en aumento para el uso de tierras aparte de para prácticas agrícolas se prevé que va a reducir la cantidad de tierra posible de ser cultivada disponible para agricultura. Estos factores han
30 conllevado a pronósticos sombríos respecto a seguridad alimenticia, particularmente en la ausencia de mejoras notables en biotecnología de plantas y prácticas agronómicas. En vista de estas presiones, mejoras ambientalmente sustentables en tecnología, técnicas agrícolas, y

administración de plagas son herramientas vitales para expandir la producción de cultivo en la cantidad limitada de tierra para cultivar disponible para agricultura.

[05] Insectos, particularmente insectos dentro del orden *Lepidóptera* y *Coleoptera*, son considerados una causa principal de daño a cultivos de campos, disminuyendo así rendimientos

5 de cultivo sobre áreas infestadas. Especies de plagas *Lepidóptera* que impactan negativamente la agricultura incluyen, aunque sin limitación a, oruga militar negra (*Spodoptera exempta*), gusano cortador negro (*Agrotis ipsilon*), gusano elotero (*Helicoverpa zea*), oruga de la hoja del algodón (Alabama *argillacea*), palomilla dorso de diamante (*Plutella xylostella*), barrenador del maíz europeo (*Ostrinia nubilalis*), oruga militar tardía (*Spodoptera frugiperda*),

10 oruga militar tardía resistente a Cry1Fa1 (*Spodoptera frugiperda*), oruga del viejo mundo (OWB, *Helicoverpa armigera*), oruga militar del sur (*Spodoptera eridania*), falso medidor de la soja (*Chrysodeixis includens*), gusano moteado (*Earias vittella*), barrenador de maíz sud-occidental (*Diatraea grandiosella*), gusano del capullo del tabaco (*Heliothis virescens*), gusano cortador del tabaco (*Spodoptera litura*, también conocido como rosquilla negra), gusano

15 cortador occidental del frijol (*Striacosta albicosta*), y oruga de las leguminosas (*Anticarsia gemmatilis*). Históricamente, la aplicación intensiva de insecticidas químicos sintéticos se basó sobre el agente de control de plagas en agricultura. Las preocupaciones respecto de la salud ambiental y de los seres humanos, además de cuestiones de resistencia emergentes, estimularon la investigación y desarrollo de pesticidas biológicos. Este esfuerzo de investigación conllevó

20 al descubrimiento progresivo y el uso de varias especies entomopatógenas microbianas, incluyendo bacterias. El paradigma de control biológico cambió cuando el potencial de bacterias entomopatógenas, especialmente bacterias que pertenecen al género *Bacillus*, se descubrió y desarrolló como un agente de control de plagas biológicas. Cepas de la bacteria *Bacillus thuringiensis* (Bt) se han usado como una fuente de proteínas pesticidas dado que se

25 descubrió que cepas Bt muestran una alta toxicidad contra insectos específicos. Cepas Bt son conocidas por producir delta-endotoxinas que se localizan dentro de los cuerpos de inclusiones cristalinas paraesporales en el inicio de esporulación y durante la fase de crecimiento estacionario (por ejemplo, proteínas Cry), y también se las conocen por producir proteína insecticida secretada. Luego de la ingesta por parte de un insecto susceptible, delta-

30 endotoxinas así como toxinas secretadas ejercen sus efectos en la superficie del epitelio del intestino medio, alterando la membrana celular, conllevando a alteración celular y muerte. Genes que codifican proteínas insecticidas también han sido identificados en especies bacterianas además de Bt, incluyendo otras *Bacillus* y una diversidad de especies bacterianas adicionales, tal como *Brevibacillus laterosporus*, *Lysinibacillus sphaericus* (“Ls”

anteriormente conocida como *Bacillus sphaericus*), *Paenibacillus popilliae* y *Paenibacillus lentimorbus*. Toxinas insecticidas solubles cristalinas y secretadas son sumamente específicas por sus huéspedes y han ganado aceptación a nivel mundial como alternativas a insecticidas químicos. Por ejemplo, proteínas de toxina insecticida han sido utilizadas en varias aplicaciones agrícolas para proteger plantas importantes desde el punto de vista agrícola de infestaciones de insectos, disminuir la necesidad de aplicaciones de pesticidas químicos, y aumentar rendimientos. Proteínas de toxinas insecticidas se usan para controlar plagas relevantes agrícolamente de plantas de cultivos a través de métodos mecánicos, tal como pulverización para dispersar formulaciones microbianas que contienen varias cepas de bacterias sobre superficies de plantas, y usando técnicas de transformación genética para producir plantas transgénicas y semillas que expresan proteína de toxina insecticida. El uso de plantas transgénicas que expresan proteínas de toxinas insecticidas ha sido globalmente adaptado. Por ejemplo, en 2016, 23.1 millones de hectáreas fueron plantadas con cultivos transgénicos que expresan toxinas *Bt* y 75,4 millones de hectáreas fueron plantadas con cultivos transgénicos que expresan toxinas *Bt* apiladas con rasgos de tolerancia herbicida (ISAAA. 2016. *Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2016. ISAAA Brief No. 52. ISAAA: Ithaca, NY*). El uso global de cultivos transgénicos protegidos de insectos y el número limitado de proteínas de toxinas insecticidas usadas en estos cultivos ha creado una presión de selección para alelos de insectos existentes que imparten resistencia a las proteínas insecticidas utilizadas en la actualidad. El desarrollo de resistencia en plagas objetivo para proteínas de toxina insecticida crea la necesidad continua de descubrir y desarrollar nuevas formas de proteínas de toxina insecticida que sean útiles para administrar el aumento en resistencia de insectos a cultivos transgénicos que expresan proteínas de toxina insecticida. Nuevas toxinas de proteína con eficacia mejorada y que presentan control sobre un amplio espectro de especies de insectos susceptibles va a reducir el número de insectos sobrevivientes que puede desarrollar alelos de resistencia. Además, el uso en una planta de dos o más proteínas transgénicas de toxina insecticida tóxicas a la misma plaga de insectos y que presentan diferentes modos de acción reduce la probabilidad de resistencia en cualquier especie única de insecto objetivo. Por lo tanto, los inventores revelan en la presente una familia de toxina de proteína novedosa de *Paenibacillus lentimorbus*, junto con proteínas de toxina similares, proteínas variantes, y proteínas recombinantes ejemplares que presentan actividad insecticida contra especies *Lepidóptera* objetivo.

COMPENDIO DE LA INVENCION

[12] Se revela en la presente un grupo novedoso de proteínas pesticidas con actividad inhibidora de insectos (proteínas de toxinas), denominada en la presente como TIC7941 perteneciente a la clase de toxina de proteína TIC7941, que se muestran que presentan actividad inhibidora contra una o más plagas de plantas de cultivo. La proteína TIC7941 y proteínas en la clase de toxina de proteína TIC7941 puede ser usada sola o en combinación con otras proteínas insecticidas y agentes tóxicos en formulaciones e *in planta*, proporcionando así alternativas para proteínas insecticidas y químicas insecticidas actualmente en uso en sistemas agrícolas. En una realización, revelada en esta solicitud hay una molécula de ácido nucleico recombinante que comprende un fragmento promotor heterólogo operativamente ligado a un segmento de polinucleótidos que codifica una proteína pesticida o su fragmento, donde (a) dicha proteína pesticida comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:6; SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, o SEQ ID NO:14; o (b) dicha proteína pesticida comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80%, o 85%, o 90%, o 95%, o 98%, o 99%, o aproximadamente 100% identidad de secuencia de aminoácidos con SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:6; SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, o SEQ ID NO:14; o (c) dicho segmento de polinucleótidos hibrida con un polinucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:5; SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:11, o SEQ ID NO:13; o (d) dicho segmento de polinucleótidos que codifica una proteína pesticida o su fragmento comprende una secuencia de polinucleótidos que tiene al menos 65%, o 70%, o 75%, o 80%, o 85%, o 90%, o 95%, o 98%, o 99%, o aproximadamente 100% identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:5; SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:11, o SEQ ID NO:13; o (e) dicha molécula recombinante de ácido nucleico está en enlace operable con un vector, y dicho vector se selecciona del grupo que se compone de un plásmido, fagomidio, bácmido, cósmido, y un cromosoma artificial bacteriano o de levadura. La molécula de ácido nucleico recombinante puede comprender una secuencia que funciona para expresar la proteína pesticida en una planta; o es expresada en una célula de planta para producir una cantidad efectiva desde el punto de vista pesticida de proteína pesticida. En otra realización de esta solicitud hay células huésped que comprende una molécula de ácido nucleico recombinante de la solicitud, donde la célula huésped se selecciona entre el grupo compuesto por una célula de una planta y una bacteriana. Células huésped bacterianas contempladas incluyen *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Pantoec*, y *Erwinia*. En ciertas realizaciones, dicha especie *Bacillus* es *Bacillus cereus* o *Bacillus thuringiensis*, dicha *Brevibacillus* es *Brevibacillus laterosperous*,

o *Escherichia* es *Escherichia coli*. Células huésped de plantas contempladas incluyen una célula de planta dicotiledónea y una célula de planta monocotiledónea. Células de plantas contempladas además incluyen una célula de planta de alfalfa, banana, cebada, frijol, brócoli, repollo, brassica, zanahoria, yuca, ricino, coliflor, apio, garbanzo, repollo chino, cítricos, coco, café, maíz, trébol, algodón (*Gossypium* sp.), una cucurbitácea, pepino, abeto Douglas, berenjena, eucalipto, lino, ajo, uva, lúpulos, puerro, lechuga, pino de incienso, mijos, melones, nuez, avena, oliva, cebolla, ornamental, palma, pasto, guisante, maní, pimienta, guisante de paloma, pino, papa, álamo, calabaza, pino Radiata, rábano, semilla de colza, arroz, rizoma, centeno, cártamo, arbusto, sorgo, pino del sur, soja, espinaca, zapallo, frutilla, remolacha azucarera, caña de azúcar, girasol, maíz dulce, goma dulce, batata, pasto varilla, te, tabaco, tomate, triticale, hierba de césped, sandía, y trigo. En otra realización, la proteína pesticida presenta actividad contra insectos *Lepidoptera*, incluyendo oruga de las leguminosas, barrenador de la caña de azúcar, gusano saltarín, gusano elotero, gusano del capullo del tabaco, falso medidor de la soja, oruga militar negra, oruga militar del sur, oruga militar tardía, oruga militar de la remolacha, oruga del viejo mundo, gusano oriental de la hoja, gusano rosado, gusano cortador negro, barrenador del maíz sud-occidental, oruga de la hoja del algodón, palomilla dorso de diamante, gusano moteado, gusano cortador del tabaco, gusano cortador del frijol occidental, y barrenador del maíz europeo.

[16] También se contemplan en esta solicitud plantas que comprenden una molécula de ácido nucleico recombinante que comprende un fragmento promotor heterólogo ligado operativamente a un segmento de polinucleótidos que codifica una proteína pesticida o su fragmento, donde: (a) dicha proteína pesticida comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:12, o SEQ ID NO:14; o (b) dicha proteína pesticida comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80% o, 85%, o 90%, o 95%, o 98%, o 99%, o aproximadamente 100% identidad de secuencia de aminoácidos con SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:12, o SEQ ID NO:14; o (c) dicho segmento de polinucleótidos hibrida bajo condiciones de hibridación rigurosas con el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEC ID NO:3, SEQ ID NO:11, o SEQ ID NO:13; o (d) dicha planta presenta una cantidad detectable de dicha proteína pesticida. En ciertas realizaciones, la proteína pesticida comprende SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:12, o SEQ ID NO:14. En una realización, la planta es ya sea una planta dicotiledónea o una planta monocotiledónea. En otra realización, la planta además se selecciona entre el grupo compuesto por una alfalfa, banana, cebada, frijol, brócoli, repollo, brassica, zanahoria, yuca, ricino, coliflor, apio, garbanzo, repollo chino, cítricos, coco, café, maíz, trébol, algodón, una cucurbitácea, pepino,

abeto Douglas, berenjena, eucalipto, lino, ajo, uva, lúpulos, puerro, lechuga, pino de incienso, mijos, melones, nuez, avena, oliva, cebolla, ornamental, palma, pasto, guisante, maní, pimienta, guisante de paloma, pino, papa, álamo, calabaza, pino Radiata, rábano, semilla de colza, arroz, rizoma, centeno, cártamo, arbusto, sorgo, pino del sur, soja, espinaca, zapallo, frutilla, remolacha azucarera, caña de azúcar, girasol, maíz dulce, goma dulce, batata, pasto varilla, te, tabaco, tomate, triticale, hierba de césped, sandía, y trigo.

[17] En realizaciones adicionales, se revelan semillas que comprenden las moléculas de ácido nucleico recombinantes.

[18] En otra realización, una composición inhibidora de insectos que comprende las moléculas de ácido nucleico recombinantes reveladas en esta solicitud se contemplan. La composición inhibidora de insectos puede además comprender una secuencia de nucleótidos que codifica al menos un agente pesticida distinto que es diferente de dicha proteína pesticida. En ciertas realizaciones, el al menos un agente pesticida distinto se selecciona del grupo formado por una proteína inhibidora de insectos, una molécula ARNdh inhibidora, y una proteína auxiliar. También se contempla que el al menos un agente pesticida distinto en la composición inhibidora presenta actividad contra una o más especies de plagas de los órdenes *Lepidoptera*, *Coleoptera*, o *Hemiptera*. El al menos un agente pesticida distinto en la composición inhibidora de insectos es en una realización seleccionado entre el grupo formado por una Cry1A, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1A.105, Cry1Ae, Cry1B, Cry1C, Cry1C, variantes Cry1D, Cry1E, Cry1F, quimeras Cry1A/F, Cry1G, Cry1H, Cry1I, Cry1J, Cry1K, Cry1L, Cry2A, Cry2Ab, Cry2Ae, Cry3, variantes Cry3A, Cry3B, Cry4B, Cry6, Cry7, Cry8, Cry9, Cry15, Cry34, Cry35, Cry43A, Cry43B, Cry51Aa1, ET29, ET33, ET34, ET35, ET66, ET70, TIC400, TIC407, TIC417, TIC431, TIC800, TIC807, TIC834, TIC853, TIC900, TIC901, TIC1201, TIC1415, TIC3131, TIC2160, VIP3A, VIP3B, VIP3Ab, AXMI-001, AXMI-002, AXMI-030, AXMI-035, AXMI-036, AXMI-045, Axmi52, Axmi58, Axmi88, Axmi97, Axmi102, Axmi112, Axmi117, Axmi100, AXMI-115, AXMI-113, and AXMI-005, AXMI134, AXMI-150, Axmi171, AXMI-184, axmi196, axmi204, axmi207, axmi209, Axmi205, AXMI218, AXMI220, AXMI221z, AXMI222z, AXMI223z, AXMI224z and AXMI225z, AXMI238, AXMI270, AXMI279, AXMI335, AXMI345, AXMI-R1, y sus variantes, IP3 y sus variantes, DIG-3, DIG-5, DIG-10, DIG-11, DIG-657 proteína, variantes PHI-4, variantes PIP-72, variantes PIP-45, variantes PIP-64, variantes PIP-74, variantes PIP-77, DIG-305, variantes PIP-47, DIG-17, DIG-90, DIG-79, y DIG-303.

[19] Los productos “materia prima” que comprenden una cantidad detectable de las moléculas de ácido nucleico recombinantes reveladas en esta solicitud son también

contemplados. Dichos productos materia prima incluyen maíz materia prima embolsado por un comercializador de granos, copos de maíz, tortas de maíz, harina de maíz, jarabe de maíz, aceite de maíz, forraje de maíz, almidón de maíz, cereal de maíz y similares, y soja correspondiente, arroz, trigo, sorgo, guisantes de paloma, maní, fruta, melón, y productos materia prima de vegetales que incluyen, donde corresponda, jugos, concentrados, compotas, jaleas, mermeladas, y otras formas comestibles de dichos productos materia prima que contienen una cantidad detectable de dichos polinucleótidos y o polipéptidos de esta solicitud, semilla de algodón entera o procesada, aceite de algodón, pelusa, semillas y partes de plantas procesadas para alimentar o comida, fibra, papel, biomasas, y productos combustibles tal como combustible proveniente de aceite de algodón o gránulos provenientes de desperdicio de desmotadora de algodón, semillas de soja enteras o procesadas, aceite de soja, proteína de soja, soja triturada, harina de soja, copos de soja, salvado de soja, leche de soja, queso de soja, vino de soja, alimento animal que contiene soja, papel que contiene soja, crema que contiene soja, biomasa de soja, y productos combustibles producidos usando plantas de soja y partes de plantas de soja. También se contempla en esta solicitud un método para producir semillas que contienen las moléculas de ácido nucleico recombinantes reveladas en esta solicitud. El método comprende plantar al menos una de la semilla que comprende las moléculas de ácido nucleico recombinantes reveladas en esta solicitud; hacer crecer la planta a partir de la semilla; y cosechar la semilla de las plantas, donde la semilla cosechadas comprende las moléculas de ácido nucleico recombinantes en esta solicitud. En otra realización ilustrativa, una planta resistente a infestación de insectos, se proporciona en donde las células de dicha planta comprende: (a) una molécula de ácido nucleico recombinante que codifica una cantidad efectiva insecticidamente de una proteína pesticida según se estableció en SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:12, o SEQ ID NO:14; o (b) una cantidad efectiva insecticidamente de una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80% o, 85%, o 90%, o 95%, o aproximadamente 100% identidad de secuencia de aminoácidos a la SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:12, o SEQ ID NO:14. También se revelan en esta solicitud métodos para controlar una plaga de especie *Lepidóptera*, y controlar una infestación de plaga de especie *Lepidóptera* de una planta, particularmente una planta de cultivo. El método comprende, en una realización, (a) poner en contacto la plaga con una cantidad efectiva insecticidamente de una proteína pesticida según se estableció en SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:12, o SEQ ID NO:14; o (b) poner en contacto la plaga con una cantidad efectiva insecticidamente de una o más proteínas pesticidas que comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80% o, 85%, o 90%, o 95%, o aproximadamente 100%

identidad de secuencia de aminoácidos a la SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:12, o SEQ ID NO:14. Adicionalmente se proporciona en la presente un método para detectar la presencia de una molécula de ácido nucleico recombinante que comprende un segmento de polinucleótidos que codifica una proteína pesticida o su fragmento, donde: (a) dicha

5 proteína pesticida comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:6; SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, o SEQ ID NO:14; o (b) dicha proteína pesticida comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80%, o 85%, o 90%, o 95%, o 98%, o 99%, o aproximadamente 100% identidad de secuencia de aminoácidos a la SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:6; SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10,

10 SEQ ID NO:12, o SEQ ID NO:14; o (c) dicho segmento de polinucleótidos hibrida con una polinucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:5; SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:11, o SEQ ID NO:13. En una realización de la invención, el método comprende poner en contacto una muestra de ácidos nucleicos con una sonda de ácido nucleico que hibrida bajo condiciones de hibridación rigurosas con ADN

15 genómico a partir de una planta que comprende un segmento de polinucleótidos que codifica una proteína pesticida o su fragmento proporcionado en la presente, y no hibrida bajo dichas condiciones de hibridación con ADN genómico de por otra parte una planta isogénica que no comprende el segmento, donde la sonda es homóloga o complementaria a SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:11, o SEQ ID NO:13, o una secuencia que codifica una proteína pesticida que

20 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80%, o 85%, o 90%, o 95%, o 98%, o 99%, o aproximadamente 100% identidad de secuencia de aminoácidos con SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:12, o SEQ ID NO:14. El método puede además comprender (a) someter la muestra y sonda a condiciones de hibridación rigurosas; y (b) detectar hibridación de la sonda con ADN de la muestra. También se proporciona mediante la invención

25 métodos para detectar la presencia de una proteína pesticida o su fragmento en una muestra que comprende proteína, donde dicha proteína pesticida comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:6; SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, o SEQ ID NO:14; o dicha proteína pesticida comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80%, o 85%, o 90%, o 95%, o 98%, o 99%, o

30 aproximadamente 100% identidad de secuencia de aminoácidos con SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:6; SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, o SEQ ID NO:14. En una realización, el método comprende: (a) poner en contacto una muestra con un anticuerpo inmunoreactivo; y (b) detectar la presencia de la proteína. En algunas realizaciones el paso de detectar comprende un ELISA, o un Western blot. También se revela en esta solicitud un

método para mejorar la actividad insecticida de una proteína insecticida nativa contra una especie de plaga de insectos que comprende: diseñar una proteína insecticida variante insertando un fragmento de ADN que codifique un péptido de unión al receptor intestinal de insectos dentro de una secuencia codificante que codifica la proteína insecticida; donde la actividad insecticida de la proteína insecticida diseñada es mayor que la actividad insecticida de la proteína insecticida nativa para dichas especies de plagas de insectos. En una realización de la invención, el receptor intestinal de insectos puede ser una proteína de tipo cadherina (CADR), una aminopeptidasa N (APN) de anclaje GPI, una fosfatasa alcalina de anclaje GPI, un transportador ABC de transmembrana, o una metaloproteasa ADAM. En otra realización de la invención, el fragmento de ADN que codifica un péptido de unión al receptor de intestino de insecto se selecciona entre el grupo integrado por SEQ ID NO:15 y SEQ ID NO:16 y codifica el péptido de unión al receptor proporcionado como SEQ ID NO:17. En una realización de la invención se encuentran moléculas de ácido nucleicos recombinantes que comprenden un promotor heterólogo operativamente ligado a un segmento de polinucleótidos que codifica una proteína pesticida o su fragmento pesticida, operativamente ligado a una secuencia de ADN que comprende un elemento de sitio de unión objetivo de miARN reproductivo específico de tejido, donde dicho elemento de sitio de unión objetivo de miARN es heterólogo con respecto a dicho segmento de polinucleótidos que codifica una proteína pesticida o su fragmento pesticida. Los elementos de sitio de unión objetivo de miARN se seleccionan entre el grupo integrado por SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, y SEQ ID NO:23. Incluso en otra realización de la invención se encuentra un método para reducir expresión de una proteína pesticida en el tejido reproductivo de una planta transgénica, que comprende expresar en dicha planta transgénica una molécula de ácido nucleico recombinante que comprende un promotor heterólogo operativamente ligado a un segmento de polinucleótidos que codifica una proteína pesticida o su fragmento pesticida, operativamente ligado a una secuencia de ADN que comprende un elemento de sitio de unión objetivo de ARN mi reproductivo específico de tejido, donde dicho elemento de sitio de unión objetivo de miARN es heterólogo con respecto a dicho segmento de polinucleótidos que codifica una proteína pesticida o su fragmento pesticida. Los elementos de sitio de unión objetivo de miARN se seleccionan entre el grupo integrado por SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, y SEQ ID NO:23. Una realización adicional de la invención es una molécula recombinante de ADN seleccionada entre el grupo integrado por SEQ ID NO:25 y SEQ ID NO:26.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS SECUENCIAS

- [28] SEQ ID NO:1 es una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína pesticida TIC7941 obtenida de especie *Paenibacillus lentimorbus* DSC020651.
- [29] SEQ ID NO:2 es la secuencia de aminoácidos de la proteína pesticida TIC7941.
- [30] SEQ ID NO:3 es una secuencia sintética que codifica una proteína pesticida
5 TIC7941PL_1 diseñada para expresión en una célula vegetal.
- [31] SEQ ID NO:4 es la secuencia de aminoácidos de la proteína TIC7941PL_1 donde un aminoácido alanina adicional se inserta inmediatamente después de metionina de iniciación.
- [32] SEQ ID NO:5 es una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína pesticida TIC7941_His, donde una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una etiqueta Histidina está
10 operativamente ligada 5' y en marco a la secuencia codificante TIC7941.
- [33] SEQ ID NO:6 es la secuencia de aminoácidos de la proteína pesticida TIC7941_His.
- [34] SEQ ID NO:7 es una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína pesticida TIC7941_2His, donde una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una etiqueta Histidina está operativamente ligada 5' y en marco.
- 15 [35] SEQ ID NO:8 es la secuencia de aminoácidos de la proteína pesticida TIC7941_2His.
- [36] SEQ ID NO:9 es una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína pesticida TIC7941_3His, donde una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una etiqueta Histidina está operativamente ligada 5' y en marco.
- [37] SEQ ID NO:10 es la secuencia de aminoácidos de la proteína pesticida TIC7941_3His.
- 20 [38] SEQ ID NO:11 es una secuencia sintética que codifica una proteína pesticida TIC7941PL_2 diseñada para expresión en una célula vegetal.
- [39] SEQ ID NO:12 es la secuencia de aminoácidos de la proteína TIC7941PL_2 donde un aminoácido alanina adicional se inserta inmediatamente después de metionina de iniciación.
- [40] SEQ ID NO:13 es una secuencia sintética que codifica una proteína pesticida
25 TIC7941PL_3 diseñada para expresión en una célula vegetal.
- [41] SEQ ID NO:14 es la secuencia de aminoácidos de TIC7941PL_3 donde un aminoácido alanina adicional se inserta inmediatamente después de metionina de iniciación.
- [42] SEQ ID NO:15 es una secuencia sintética de codificación (FAWPEPBIN_Bac) que codifica la secuencia péptido FAWPEPBIN de enlace al receptor FAW ABCc4 para expresión
30 en bacteria. La secuencia sintética se encuentra dentro de posiciones de nucleótidos 2413-2448 of TIC7941_2His y dentro de posiciones de nucleótidos 2410-2445 de TIC7941_3His. SEQ ID NO:16 es una secuencia sintética de codificación (FAWPEPBIN_PL) que codifica la secuencia péptido FAWPEPBIN de enlace al receptor FAW ABCc4 para expresión en célula vegetal. La secuencia sintética se encuentra dentro de posiciones de nucleótidos 2386-2421 de

TIC7941PL_2 y dentro de posiciones de nucleótidos 2383-2418 de TIC7941PL_3. SEQ ID NO:17 es la secuencia de péptidos (FAWPEPBIN) de enlace a receptor FAW ABCc4 codificada por SEQ ID NO:15 y SEQ ID NO:16 y está ubicada en posiciones de aminoácidos 805-816 de TIC7941_2His, 804-815 de TIC7941_3His, 796-807 de TIC7941PL_2, y 795-806 de TIC7941PL_3.

[45] SEQ ID NO:18 es una secuencia ADN que codifica un sitio Gm.miR395_1 de enlace objetivo de miARN.

[46] SEQ ID NO:19 es una secuencia ADN que codifica un sitio de enlace objetivo de miARN Gm.miR395_2.

[47] SEQ ID NO:20 es una secuencia ADN (SUP-miR395) donde los sitios de enlace objetivo de miARN Gm.miR395_1 y Gm.miR395_2 están ligados usando una secuencia ADN SP-ART.8a-1.

[48] SEQ ID NO:21 es una secuencia ADN que codifica un sitio de enlace objetivo de miARN Gm.miR4392_1.

[49] SEQ ID NO:22 es una secuencia ADN que codifica un sitio de enlace objetivo de miARN Gm.miR4392_2.

[50] SEQ ID NO:23 es una secuencia ADN (SUP-miR4392) donde los sitios de enlace objetivo de miARN Gm.miR4392_1 y Gm.miR4392_2 están ligados usando una secuencia ADN SP-ART.8a-1.

[51] SEQ ID NO:24 es la secuencia de ADN del conector SP-ART.8a-1.

[52] SEQ ID NO:25 es una secuencia ADN (TIC7941PL_1-mi395) que codifica TIC7941PL_1 operativamente ligada a SUP-miR395.

[53] SEQ ID NO:26 es una secuencia ADN (TIC7941PL_1-mi4392) que codifica TIC7941PL_1 operativamente ligada a SUP-miR4392.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[54] En problema en el arte de control de plagas agrícolas puede ser caracterizado como una necesidad de nuevas proteínas toxinas que son eficaces contra plagas objetivo, presenten toxicidad de amplio espectro contra especies de plagas, sean capaces de ser expresadas en plantas sin provocar cuestiones agronómicas no deseadas, y proporcionen un modo alternativo de acción en comparación con toxinas actuales que son usadas comercialmente en plantas.

[55] Proteínas pesticidas novedosas ejemplificadas por TIC7941, TIC7941PL_1, TIC7941PL_2, y TIC7941PL_3 se revelan en la presente, y abordan cada una de estas necesidades, particularmente contra un amplio espectro de plagas de insectos *Lepidoptera*, y

más particularmente contra gusano cortador negro (*Agrotis ipsilon*), gusano elotero (*Helicoverpa zea*), barrenador del maíz europeo (*Ostrinia nubilalis*), oruga militar tardía (*Spodoptera frugiperda*), oruga militar del sur (*Spodoptera eridania*), falso medidor de la soja (*Chrysodeixis includens*), barrenador de maíz sud-occidental (*Diatraea grandiosella*).

5 [56] Referencia en esta solicitud a TIC7941, “proteína TIC7941”, “toxina de proteína TIC7941”, “proteína de toxina TIC7941”, “proteína de pesticida TIC7941”, “toxinas relacionadas a TIC7941”, “proteínas de toxina relacionadas a TIC7941”, TIC7941PL_1, “proteína TIC7941PL_1”, “toxina de proteína TIC7941PL_1”, “proteína de toxina TIC7941PL_1”, “proteína pesticida TIC7941PL_1”, “toxinas relacionadas a TIC7941PL_1”,
10 “proteínas de toxina relacionadas a TIC7941PL_1”, y similares, se refieren a cualquier proteína pesticida novedosa o proteína inhibidora de insectos, que comprende, que se compone de, que es sustancialmente homóloga a, que es similar a, o que proviene de cualquier proteína pesticida o secuencia de proteína inhibidora de insectos de TIC7941 (SEQ ID NO:2), TIC7941PL_1 (SEQ ID NO:4), TIC7941PL_2 (SEQ ID NO:12), y TIC7941PL_3 (SEQ ID NO:14) y sus
15 segmentos pesticida o inhibidores de insectos, o sus combinaciones, que otorgan actividad contra plagas *Lepidóptera*, incluyendo cualquier proteína que presenta actividad pesticida o inhibidora de insectos si alineamiento de dicha proteína con TIC7941, TIC7941PL_1, TIC7941PL_2, o TIC7941PL_3 da como resultado identidad de secuencia de aminoácidos de cualquier forma porcentaje de fracción de aproximadamente 80% hasta aproximadamente
20 100% por ciento. Las proteínas TIC7941, TIC7941PL_1, TIC7941PL_2, y TIC7941PL_3 incluyen tanto la forma de las proteínas que apuntan a plástidos y que apuntan a no plástido.

[57] El término “segmento” o “fragmento” se usa en esta solicitud para describir secuencia de aminoácidos o ácidos nucleicos consecutivas que son más cortas que la secuencia de aminoácidos o ácido nucleicos completa que describe una proteína TIC7941. Un segmento o
25 fragmento que presenta actividad inhibidora de insectos también se describe en esta solicitud si la alineamiento de dicho segmento o fragmento, con la sección correspondiente de la proteína TIC7941 que se estableció en SEQ ID NO:2, o proteína TIC7941PL_1 que se estableció en SEQ ID NO:4, o proteína TIC7941PL_2 que se estableció en SEQ ID NO:12, o proteína TIC7941PL_3 que se estableció en como SEQ ID NO:14 da como resultado identidad de
30 secuencia de aminoácidos de cualquier porcentaje de fracción desde aproximadamente 80 hasta aproximadamente 100 por ciento entre el segmento o fragmento y la sección correspondiente de la proteína TIC7941, TIC7941PL_1, TIC7941PL_2, o TIC7941PL_3.

[58] Incluso en realizaciones específicas adicionales, un fragmento de una proteína TIC7941, TIC7941PL_1, TIC7941PL_2, o TIC7941PL_3 puede definirse como que presenta

actividad pesticida que posee por la molécula de proteína de partida de la cual proviene. Un fragmento de una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína TIC7941, TIC7941PL_1, TIC7941PL_2, o TIC7941PL_3 puede definirse como que codifica una proteína que presenta la actividad pesticida que posee por la molécula de proteína codificada por la secuencia de ácido nucleico de partida de la cual proviene. Un fragmento o variante que se describe en la presente puede además comprender un dominio identificado en la presente que es responsable de la actividad pesticida de una proteína.

[59] En realizaciones específicas, fragmentos de una proteína TIC7941, TIC7941PL_1, TIC7941PL_2, o TIC7941PL_3 son provistos que comprenden al menos aproximadamente 50, al menos aproximadamente 75, al menos aproximadamente 95, al menos aproximadamente 100, al menos aproximadamente 125, al menos aproximadamente 150, al menos aproximadamente 175, al menos aproximadamente 200, al menos aproximadamente 225, al menos aproximadamente 250, al menos aproximadamente 275, al menos aproximadamente 300, al menos aproximadamente 500, al menos aproximadamente 600, al menos aproximadamente 700, al menos aproximadamente 750, al menos aproximadamente 800, al menos aproximadamente 900, al menos aproximadamente 1000, al menos aproximadamente 1100, al menos aproximadamente 1150, o al menos aproximadamente 1175 aminoácidos contiguos, o más, de una proteína TIC7941, TIC7941PL_1, TIC7941PL_2, o TIC7941PL_3 que tiene actividad pesticida según se revela en la presente. En ciertas realizaciones, la invención proporciona fragmentos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 2, 4, 12, o 14, que tienen la actividad de la secuencia de longitud completa. Métodos para producir dichos fragmentos a partir de moléculas de partida son bien conocidos en el arte.

[60] Referencia en esta solicitud a los términos “activo” o “actividad”, “actividad pesticida” o “pesticida” o “actividad insecticida” “inhibidor de insectos” o “insecticida” se refiere a eficacia de un agente tóxico, tal como una toxina de proteína, para inhibir (inhibir crecimiento, alimentación, fecundación, o viabilidad), suprimir (suprimir crecimiento, alimentación, fecundación, o viabilidad), controlar (controlar la infestación de la plaga, controlad actividades de alimentación de la plaga sobre un cultivo particular que contiene una cantidad efectiva de la proteína TIC7941) o exterminar (provocando la morbilidad, mortalidad, o fecundidad reducida de) una plaga. Estos términos pretenden incluir el resultado de proporcionar una cantidad efectiva pesticidamente de una proteína de toxina a una plaga donde la exposición de la plaga a la proteína de toxina dé como resultado morbilidad, mortalidad, fecundidad reducida o atrofiamiento. Estos términos también incluyen también repulsión de la plaga de la planta, un tejido de la planta, una parte de la planta, semilla, células vegetales, o de la ubicación

geográfica particular donde la planta puede estar creciendo, como un resultado de proporcionar una cantidad efectiva pesticidamente de la proteína de toxina en o sobre la planta. En general, actividad pesticida se refiere a la capacidad de una proteína tóxica de ser efectiva en inhibir el crecimiento, desarrollo, viabilidad, comportamiento alimentario, comportamiento de acoplamiento, fecundación, o cualquier disminución medible en los efectos adversos provocados por un insecto que se alimenta en esta proteína, fragmento de proteína, segmento de proteína o polinucleótido de una plaga objetivo particular, incluyendo aunque sin limitación a insectos del orden *Lepidóptera*. La proteína de toxina puede ser producida por la planta o puede ser aplicada a la planta o al entorno dentro de la ubicación donde se encuentra la planta. Los términos “bioactividad”, “efectivo/a”, “eficaz” o sus variantes son también términos intercambiables utilizados en esta solicitud para describir los efectos de proteínas de la presente invención sobre plagas de insectos objetivo.

[61] Una cantidad efectiva pesticidamente de un agente tóxico, cuando se proporcionar en la dieta de una plaga objetivo, presenta actividad pesticida cuando el agente tóxico entra en contacto con la plaga. Un agente tóxico puede ser una proteína pesticida o uno o más agentes químicos conocidos en el arte. Agentes químicos pesticidas o insecticidas y agentes de proteínas pesticidas o insecticidas pueden ser usados solos o en combinaciones entre sí. Agentes químicos incluyen aunque no se limitan a moléculas ARNdh que fijan como objetivo genes específicos para supresión en una plaga objetivo, organocloruros, organofosfatos, carbamatos, piretroides, neonicotinoides, y ryanoides. Agentes de proteína pesticidas o insecticidas incluyen las toxinas de proteína establecidas en esta solicitud, así como también otros agentes tóxicos proteináceos incluyendo aquellos que apuntan a *Lepidópteras*, así como toxinas de proteínas que se usan para controlar otras plagas de insectos tal como proteínas Cry y Cyt disponibles en el arte para usar para controlar especies *Coleopteran*, *Hemipteran* y *Homopteran*. Se pretende que la referencia a una plaga, particularmente una plaga de una planta de cultivo, significa plagas de insectos de plantas de cultivo, particularmente aquellas plagas de insectos *Lepidóptera* que son controladas por la clase de toxina de proteína TIC7941. Sin embargo, referencia a una plaga también puede incluir plagas de insectos *Coleopteran*, *Hemipteran* y *Homopteran* de plantas, así como nematodos y hongos cuando agentes tóxicos que fijan como objetivo estas plagas son co-localizados o se presentan junto con la proteína TIC7941 o una proteína que es 80 hasta 100 por ciento idéntica a proteína TIC7941. Las proteínas TIC7941 son relacionadas por una función común y presentan actividad insecticida hacia plagas de insectos de la especie *Lepidóptera*, incluyendo adultos, pupas, larvas, y neonatos.

[64] Los insectos del orden *Lepidóptera* incluyen, aunque no se limitan a, gusanos militares, gusanos cortadores, barrenadores, y heliotis en la Familia *Noctuidae*, por ejemplo, oruga militar tardía (*Spodoptera frugiperda*), oruga militar de la remolacha (*Spodoptera exigua*), oruga militar negra (*Spodoptera exempta*), oruga militar del sur (*Spodoptera eridania*), oruga militar

5 bertha (*Mamestra configurata*), gusano cortador negro (*Agrotis ipsilon*), barrenadores del repollo (*Trichoplusia ni*), barrenadores de la soja (*Pseudoplusia includens*), oruga de las leguminosas (*Anticarsia gemmatalis*), gusano verde del trébol (*Hypena scabra*), gusano del capullo del tabaco (*Heliothis virescens*), gusano cortador granulado (*Agrotis subterranea*), gusano militar (*Pseudaletia unipuncta*), gusano cortador occidental (*Agrotis orthogonia*);

10 barrenadores, polillas del estuche, orugas tejedoras, orugas de la piña del pino, orugas del repollo y skeletonizers de la Familia *Pyralidae*, por ejemplo, barrenador del maíz europeo (*Ostrinia nubilalis*), gusano de ombligo naranja (*Amyelois transitella*), oruga tejedora de la raíz del maíz (*Crambus caliginosellus*), oruga de la hierba (*Herpetogramma licarsisalis*), polilla del girasol (*Homoeosoma electellum*), barrenador menor del tallo (*Elasmopalpus lignosellus*);

15 gusanos enrolladores de hoja, orugas capulleras, orugas de semillas, y gusanos de frutas en la Familia *Tortricidae*, por ejemplo, gusano de la pera y la manzana (*Cydia pomonella*), polilla de la uva (*Endopiza viteana*), palomilla oriental de la fruta (*Grapholita molesta*), polilla de la yema del girasol (*Suleima helianthana*); y muchas otras *Lepidóptera* económicamente importantes, por ejemplo, palomilla dorso de diamante (*Plutella xylostella*), gusano rosado

20 (*Pectinophora gossypiella*), y lagarta peluda (*Lymantria dispar*). Otras plagas de insectos del orden *Lepidóptera* incluyen, por ejemplo, oruga de la hoja del algodón (*Alabama argillacea*), gusano enrollador de hoja de frutales (*Archips argyrospila*), gusanos enrolladores europeos (*Archips rosana*) y otras especies *Archips*, (*Chilo suppressalis*, barrenador del arroz asiático, o barrenador del tallo de arroz), enrollador de la hoja de arroz (*Cnaphalocrocis medinalis*), oruga tejedora de la raíz del maíz (*Crambus caliginosellus*), oruga de la piña del

25 pino gusano tejedor del césped (*Crambus teterrellus*), barrenador del maíz sud-occidental (*Diatraea grandiosella*), barrenador de la caña de azúcar (*Diatraea saccharalis*), oruga de la cápsula de algodón (*Earias insulana*), gusano moteado (*Earias vittella*), gusano cogollero (*Helicoverpa armigera*), gusano elotero (*Helicoverpa zea*, también conocido como gusano de

30 la soja y gusano del algodón), gusano del capullo del tabaco (*Heliothis virescens*), oruga de la hierba (*Herpetogramma licarsisalis*), gusano cortador occidental del frijol (*Striacosta albicosta*), palomilla europea de la vid (*Lobesia botrana*), minador de las hojas de los cítricos (*Phyllocnistis citrella*), mariposa blanca de la col (*Pieris brassicae*), blanquita de la col (*Pieris rapae*, también conocida como gusano importado de la col), gusano militar de la remolacha

(*Spodoptera exigua*), gusano cortador del tabaco (*Spodoptera litura*, también conocido como rosquilla negra), y minador de las hojas de tomate (*Tuta absoluta*).

[65] Referencia en esta solicitud a una “molécula de ADN aislada”, o un término o frase equivalente, pretende significar que la molécula de ADN es aquella que está presente sola o en combinación con otras composiciones, pero no dentro de su entorno natural. Por ejemplo, elementos de ácido nucleico tal como una secuencia codificante, secuencia de intrones, secuencia principal no traducida, secuencia promotora, secuencia de terminación transcripcional, y similares, que se encuentran naturalmente dentro del ADN del genoma de un organismo no son consideradas que son “aisladas” siempre que el elemento se encuentre dentro del genoma del organismo y en la ubicación dentro del genoma en donde se encuentra naturalmente. Sin embargo, cada uno de estos elementos, y subpartes de estos elementos, serían “aislados” dentro del alcance de esta revelación siempre que el elemento no esté dentro del genoma del organismo y en la ubicación dentro del genoma en donde se encuentra naturalmente. De modo similar, una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína insecticida o cualquier variante insecticida que se da naturalmente de esa proteína sería una secuencia de nucleótidos aislada siempre que la secuencia de nucleótidos no esté dentro del ADN de la bacteria a partir de la cual se encuentra naturalmente la secuencia que codifica la proteína. Una secuencia de nucleótidos sintética que codifica la secuencia de aminoácidos de la proteína insecticida que se da naturalmente sería considerada que es aislada para los fines de esta revelación. Para los fines de esta revelación, cualquier secuencia de nucleótidos transgénica, es decir, la secuencia de nucleótidos del ADN insertado dentro del genoma de las células de una planta o bacteria, o presente en un vector extracromosómico, sería considerada que es una secuencia de nucleótidos aislada si está presente dentro del plásmido o estructura similar usada para transformar las células, dentro del genoma de la planta o bacteria, o presente en cantidades detectables en tejidos, progenie, muestras biológicas o productos de materia prima provenientes de la planta o bacteria.

[66] Tal como se usa en la presente, una “molécula de ADN recombinante” es una molécula de ADN que comprende una combinación de moléculas de ADN que no se darían naturalmente juntas sin intervención humana. Por ejemplo, una molécula de ADN recombinante puede ser una molécula de ADN que se compone de al menos dos moléculas de ADN heterólogas con respecto una a la otra, una molécula de ADN que comprende una secuencia de ADN que se desvía de una secuencia de ADN que existe en la naturaleza, o una molécula de ADN que ha sido incorporada dentro de un ADN de células huésped mediante transformación genética o edición de genes. Similarmente, una “molécula de proteína recombinante” es una molécula de

proteína que comprende una combinación de aminoácidos que no se darían naturalmente juntos sin intervención humana. Por ejemplo, una molécula de proteína recombinante puede ser una molécula de proteína que se compone de al menos dos moléculas de aminoácidos heterólogas con respecto una a la otra, una molécula de proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que se desvía de secuencias de aminoácidos que existen en la naturaleza, o una molécula de proteína que se expresa en una célula huésped como un resultado de transformación genética de la célula huésped o mediante edición de genes del genoma de célula huésped.

[67] Como se describe adicionalmente en esta solicitud, un marco de lectura abierto (ORF)

que codifica TIC7941 (SEQ ID NO:2) se descubrió en ADN obtenido de *Paenibacillus lentimorbus* cepa DSC020651. La secuencia codificante se clonó y expresó en células huésped microbianas para producir proteínas recombinantes usadas en bioensayos. Bioensayos utilizando proteínas provenientes de células huésped microbianas de TIC7941 demostraron actividad contra la especie *Lepidóptera* gusano cortador negro (*Agrotis ipsilon*), gusano elotero (*Helicoverpa zea*), barrenador del maíz europeo (*Ostrinia nubilalis*), gusano militar del sur (*Spodoptera eridania*), falso medidor de la soja (*Chrysodeixis includens*), barrenador del maíz sud-occidental (*Diatraea grandiosella*). Secuencias sintéticas que codifican TIC7941 y variantes de TIC7941 fueron diseñadas para expresión en una célula vegetal. La secuencia codificante, TIC7941PL_1 (SEQ ID NO:3) codifica la proteína insecticida TIC7941PL_1 que es idéntica a la secuencia de proteína TIC7941 con la excepción de un aminoácido alanina adicional insertado después de la metionina de iniciación para mejorar expresión. Cuando se expresa en maíz transgénico, TIC7941PL_1 demostró actividad insecticida contra gusano cortador negro (BCW, *Agrotis ipsilon*), gusano elotero (CEW, *Helicoverpa zea*), y barrenador del maíz sud-occidental (SWCB, *Diatraea grandiosella*) en ensayos de discos de hojas. Cuando se expresó en plantas de soja transgénicas, TIC7941PL_1 demostró actividad insecticida contra gusano militar del sur (SAW, *Spodoptera eridania*), falso medidor de la soja (SBL, *Chrysodeixis includens*), y gusano de la soja (SPW, *Helicoverpa zea*) en ensayos de discos de hojas. La secuencia codificante TIC7941PL_2 (SEQ ID NO:11) y secuencia codificante TIC7941PL_3 (SEQ ID NO:13) codifican las proteínas insecticidas TIC7941PL_2 (SEQ ID NO:12) y TIC7941PL_3 (SEQ ID NO:14), respectivamente. Contienen un aminoácido alanina adicional insertado después de la metionina de iniciación para mejorar expresión. Tanto TIC7941PL_2 como TIC7941PL_3 también contiene un fragmento péptido de unión a proteína del transportador ABC de transmembrana de gusano militar tardío (ABCC4) insertado dentro del dominio de bucle 2 de TIC7941. En TIC7941PL_2 el fragmento de unión

a proteína ABCc4 está ubicado en posiciones de aminoácidos 796-807. En TIC7941PL_3 el fragmento de unión a proteína ABCc4 está ubicado en posiciones de aminoácidos 795-806. Para expresión en células vegetales, la proteína TIC7941PL_1, TIC7941PL_2, o TIC7941PL_3 puede ser expresada para residir en el citosol o apuntarse a varios orgánulos de la célula vegetal.

5 Por ejemplo, fijar como objetivo una proteína al cloroplasto puede dar como resultado niveles aumentados de proteína expresada en una planta transgénica mientras que previene que aparezcan fenotipos off. Fijar como objetivos puede también dar como resultado un aumento en eficacia de resistencia a plagas en el evento transgénico. Un péptido objetivo o péptido en tránsito es una cadena de péptidos corta (3-70 aminoácidos de longitud) que dirige el transporte

10 de una proteína a una región específica en la célula, incluyendo el núcleo, mitocondria, retículo endoplasmático (ER), cloroplasto, apoplasto, peroxisoma y membrana plasmática. Algunos péptidos objetivo son escindidos de la proteína mediante peptidasas señal después de que las proteínas son transportadas. Para fijar como objetivo al cloroplasto, proteínas contienen péptidos en tránsito que tienen alrededor de 40-50 aminoácidos. Para descripciones del uso de

15 péptidos en tránsito para cloroplastos, ver Patente de los Estados Unidos Nos. 5.188.642 y 5,728,925. Muchas proteínas localizadas en cloroplastos se expresan a partir de genes nucleares como precursores y son apuntadas al cloroplasto mediante un péptido en tránsito para cloroplasto (CTP). Ejemplos de tales proteínas para cloroplastos aisladas incluyen, aunque sin limitación a, aquellas asociadas con la subunidad pequeña (SSU) de ribulosa-1,5,-bisfosfato

20 carboxilasa, ferredoxina, ferredoxina oxidoreductasa, la proteína I y proteína II del complejo captador de luz, tioredoxina F, enolpiruvil shikimato fosfato sintasa (EPSPS), y péptidos en tránsito descritos en la Patente de los Estados Unidos No. 7.193.133. Se ha demostrado in vivo e in vitro que proteínas no-cloroplasto pueden ser apuntadas al cloroplasto mediante uso de fusiones de proteínas con un CTP heterólogo y que el CTP es suficiente para apuntar una

25 proteína al cloroplasto. La incorporación de un péptido en tránsito para cloroplasto adecuado tal como el *Arabidopsis thaliana* EPSPS CTP (CTP2) (ver, Klee *et al.*, *Mol. Gen. Genet.* 210:437-442, 1987) o el *Petunia hybrida* EPSPS CTP (CTP4) (ver, della-Cioppa *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:6873-6877, 1986) ha demostrado que apunta secuencias de proteína heterólogas EPSPS a cloroplastos en plantas transgénicas (ver, Patente de los Estados Unidos

30 Nos. 5.627.061; 5.633.435; y 5.312.910; y EP 0218571; EP 189707; EP 508909; y EP 924299). Para fijar como objetivo la proteína de toxina TIC7941, TIC7941PL_1, TIC7941PL_2, o TIC7941PL_3 al cloroplasto, una secuencia que codifica un péptido en tránsito para cloroplasto se coloca 5' en enlace operativo y en marco con una secuencia codificante sintética que codifica la proteína de toxina TIC7941, TIC7941PL_1, TIC7941PL_2, o TIC7941PL_3 que ha sido

diseñada para expresión óptima en células vegetales. Se contempla que secuencias de proteína de toxina adicionales relacionadas con TIC7941 pueden ser creadas usando la secuencia de aminoácidos de TIC7941 para crear proteínas novedosas con propiedades novedosas. Las proteínas de toxina TIC7941 pueden ser alineadas para combinar diferencias en el nivel de

5 secuencia de aminoácidos dentro de variantes de secuencia de aminoácidos nuevas y realizando cambios apropiados a la secuencia de ácido nucleico recombinante que codifica las variantes. Esta revelación además contempla que variantes mejoradas de la case de toxina de proteína TIC7941 pueden ser diseñadas *in planta* usando varios métodos de edición de genes conocidos en el arte. Dichas tecnologías usadas para edición de genoma incluyen, aunque no

10 se limitan a, ZFN (nucleasa con dedos de zinc), meganucleasas, TALEN (nucleasas efectoras de tipo activador de transcripción), y sistemas CRISPR (repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas)/Cas (asociados a CRISPR). Estos métodos de edición de genoma pueden ser usados para alterar la secuencia codificante de proteína de toxina transformada dentro de una célula vegetal en una secuencia codificante de toxina diferente.

15 Específicamente, mediante estos métodos, uno o más codones dentro de la secuencia codificante de toxina se altera para diseñar una secuencia de aminoácido de proteína nueva. Alternativamente, un fragmento dentro de la secuencia codificante es reemplazado o suprimido, o fragmentos ADN adicionales se insertan dentro de la secuencia codificante, para diseñar una secuencia que codifica toxina nueva. La nueva secuencia codificante puede

20 codificar una proteína de toxina con nuevas propiedades tal como actividad aumentada o espectro contra plagas de insectos, así como proporcionar actividad contra una especie de plaga de insectos donde se ha desarrollado resistencia contra la proteína de toxina de insecto original. La célula vegetal que comprende la secuencia codificante de toxina editado puede usarse mediante métodos conocidos en el arte para generar plantas completas que expresen la nueva

25 proteína de toxina. También se contempla que fragmentos de TIC7941 o sus variantes de proteína pueden ser formas truncadas donde uno o más aminoácidos son suprimidos del extremo N terminal, extremo C terminal, el medio de la proteína, o sus combinaciones donde los fragmentos y variantes retienen actividad inhibidora de insectos. Estos fragmentos pueden darse naturalmente o ser variantes sintéticas de TIC7941 o variantes de proteína derivadas, pero

30 deben retener la actividad inhibidora de insectos de al menos TIC7941. Un fragmento variante que se describe en la presente puede además comprender un dominio identificado en la presente que es responsable de la actividad pesticida de una proteína. Proteínas que se asemejan a las proteínas en la clase de toxina de proteína TIC7941 pueden ser identificadas y comparadas entre sí usando varios algoritmos informáticos conocidos en el arte (*ver* Tabla 1). Identidades

de secuencia de aminoácidos informadas en esta solicitud son un resultado de un alineamiento Clustal W usando estos parámetros predeterminados: Matriz de peso: blosum, error de apertura de brecha: 10,0, error de extensión de brecha: 0,05, brechas hidrófilas: en operación, residuos hidrófilos: GPSNDQERK, errores de brecha específicos de residuo: en funcionamiento (Thompson, *et al* (1994) Nucleic Acids Research, 22:4673-4680). Identidad de aminoácido por ciento se calcula además a través del producto de 100% multiplicado por (identidades de aminoácidos/ longitud de proteína objeto). Otros algoritmos de alineamiento también están disponibles en el arte y proporcionan resultados similares a aquellos obtenidos usando un alineamiento Clustal W y se contemplan en la presente. Se pretende que una proteína que presenta actividad inhibidora de insectos contra una especie de insectos *Lepidóptera* se refiere a un miembro de la clase de toxina de proteína TIC7941 si la proteína se usa en una consulta, por ejemplo, en una alineamiento Clustal W, y las proteínas de la presente invención según se establece como SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:8, o SEQ ID NO:10 se identifican como concordancias en dicho alineamiento en donde la proteína de consulta presenta al menos 80% hasta aproximadamente 100% identidad de aminoácidos a lo largo de la longitud de la proteína de consulta que es aproximadamente 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%, o cualquier porcentaje de fracción en este rango.

[75] Además de la identidad por ciento, proteínas TIC7941 también pueden ser relacionadas mediante estructura primaria (motivos de aminoácidos conservados), mediante longitud (aproximadamente 807 aminoácidos), y mediante otras características. Características de las toxinas de proteína TIC7941 se informan en Tabla 1.

Tabla 1. Características seleccionadas de la clase de toxina de proteína TIC7941.

<u>Proteína</u>	<u>Peso molecular (en Dalton)</u>	<u>Longitud Aminoácidos</u>	<u>Punto isoeléctrico</u>	<u>Carga a PH 7,0</u>	<u>No. de aminoácidos fuertemente básicos (-)</u>	<u>No. de aminoácidos fuertemente ácidos</u>	<u>No. de aminoácidos hidrofóbicos</u>	<u>No. de aminoácidos polares</u>
TIC7941	91187,48	807	4,4561	-35,5	87	118	394	413
TIC7941 PL_1	91258,56	808	4,4561	-35,5	87	118	395	413
TIC7941 PL_2	92245,74	817	4,4414	-36,5	87	119	402	415
TIC7941 PL_3	92203,70	817	4,4544	-35,5	87	118	402	415

[76] Como se describe adicionalmente en los Ejemplos, secuencias de molécula de ácido nucleico que codifican variantes de TIC7941 fueron diseñadas para usar en plantas. Secuencias de moléculas de ácido nucleico recombinantes ejemplares que fueron diseñadas para usar en plantas que codifican las proteínas TIC7941PL_1, TIC7941PL_2, y TIC7941PL_3 se presentan como SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:11, y SEQ ID NO:13, respectivamente. Las proteínas TIC7941PL_1, TIC7941PL_2, y TIC7941PL_3 tienen un aminoácido alanina adicional inmediatamente seguido de la metionina de iniciación en relación con la proteína TIC7941. Este residuo alanina adicional se cree que mejora expresión de la proteína in planta. Las proteínas TIC7941PL_2 y TIC7941PL_3 también comprenden el fragmento de unión a péptido ABCc4 para mejorar eficacia de las proteínas contra gusano militar tardío (*Spodoptera frugiperda*).

[77] Casetes de expresión y vectores que contienen una secuencia de molécula de ácido nucleico recombinantes pueden ser contruidos e introducidos en células vegetales de maíz, soja o algodón de acuerdo con métodos de transformación y técnicas conocidas en el arte. Por ejemplo, transformación intermediada por *Agrobacterium* se describe en Publicaciones de solicitud de Patente de los Estados Unidos 2009/0138985A1 (soja), 2008/0280361A1 (soja), 2009/0142837A1 (maíz), 2008/0282432 (algodón), 2008/0256667 (algodón), 2003/0110531 (trigo), 2001/0042257 A1 (remolacha azucarera), Patentes de los Estados Unidos Nos. 5.750.871 (canola), 7.026.528 (trigo), y 6.365.807 (arroz), y en Arencibia *et al.* (1998) Transgenic Res. 7:213-222 (caña de azúcar) todas las cuales se incorporan a la presente a modo de referencia en su totalidad. Células transformadas pueden ser generadas en plantas transformadas que expresan proteína TIC7941PL_1, TIC7941PL_2, o TIC7941PL_3 y demuestran actividad pesticida mediante bioensayos realizados en la presencia de larvas de plaga *Lepidóptera* usando discos de hojas de planta obtenidos a partir de plantas transformadas. Plantas pueden provenir de las células de plantas mediante regeneración, semilla, polen, o técnicas de transformación de meristema. Métodos para transformación de plantas son conocidos en el arte.

[78] Como una alternativa a métodos de transformación tradicionales, una secuencia de ADN, tal como un transgen, casete(s) de expresión, etc., pueden ser insertados o integrados en un sitio específico o lugar dentro del genoma de una planta o célula vegetal mediante integración de sitio dirigido. Constructo(s) y molécula(s) de ADN recombinantes de esta revelación pueden por lo tanto incluir una secuencia molde donante que comprende al menos un transgen, casete de expresión, u otra secuencia de ADN para inserción dentro del genoma de la planta o célula vegetal. Dicho molde donante para integración de sitio dirigido puede

además incluir uno o dos grupos de homología que flanquean una secuencia de inserción (es decir, la secuencia, transgen, casete, etc., a ser insertado dentro del genoma de la planta). El constructo(s) de ADN recombinante de esta revelación puede además comprender un casete(s) de expresión que codifica una nucleasa de sitio específico y/o cualquier proteína(s) asociada para llevar a cabo integración de sitio dirigido. Este casete(s) que expresan nucleasa puede estar presente en la misma molécula o vector que el molde donante (en cis) o en una molécula separada o vector (en trans). Varios métodos para integración de sitio dirigido son conocidos en el arte que involucran proteínas diferentes (o complejos de proteínas y/o ARN guía) que cortan el ADN genómico para producir una ruptura de doble filamento (DSB) [según sus siglas en inglés] o fragmento en el sitio genómico o lugar deseado. Brevemente como se entiende en el arte, durante el proceso de reparar el DSB o fragmento introducido mediante la enzima nucleasa, el ADN molde donante puede tornarse integrado dentro del genoma en el sitio del DSB o fragmento. La presencia del grupo(s) de homología en el molde donante puede promover la adopción y fijar como objetivo de la secuencia de inserción dentro del genoma de la planta durante el proceso de reparación mediante recombinación homóloga, a pesar de que un evento de inserción puede darse mediante enlace de extremo no homólogo (NHEJ) [según sus siglas en inglés]. Ejemplos de nucleasas de sitio específico que se pueden usar incluyen nucleasas de dedos de zinc, meganucleasas diseñadas o nativas, endonucleasas TALE, y endonucleasas guiadas por ARN (por ejemplo, Cas9 o Cpf1). Para métodos que usan nucleasas de sitio específico guiadas por ARN (por ejemplo, Cas9 o Cpf1), el constructo(s) de ADN recombinante también va a comprender una secuencia que codifica uno o más ARNs guía para dirigir la nucleasa al sitio deseado dentro del genoma de la planta.

[79] Se contemplan composiciones de molécula de ácido nucleico recombinantes que codifican proteínas TIC7941. Por ejemplo, proteínas TIC7941, TIC7941PL_1, TIC7941PL_2, y TIC7941PL_3 pueden ser expresadas con constructos de ADN recombinante en donde una molécula de polinucleótido con un ORF que codifica la proteína se une operativamente a elementos de expresión genética tal como un promotor y cualquier otro elemento regulador necesario para expresión en el sistema para el cual se pretende el constructo. Ejemplos no limitativos incluyen un promotor funcional de planta operativamente unido a una secuencia que codifica proteína TIC7941 para expresión de la proteína en plantas o un promotor funcional *Bt* operativamente unido a una secuencia de codificación de proteína TIC7941 para expresión de la proteína en una bacteria *Bt* u otra especie *Bacillus*. Otros elementos pueden ser operativamente unidos a la secuencia de codificación de proteína TIC7941 incluyendo, aunque sin limitación a, potenciadores, intrones, conductores sin traducir, etiquetas de inmovilización

de proteína codificada (etiqueta HIS), péptidos de translocación (es decir, péptidos en tránsito plástidos, péptidos señal), secuencias de polipéptidos para enzimas de modificación post-traducción, sitios de unión ribosomal, y sitios objetivo iARN. Moléculas de polinucleótido recombinantes ejemplares provistas con la presente incluyen, aunque no se limitan a, un

5 promotor heterólogo operativamente unido a un polinucleótido tal como SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:11, y SEQ ID NO:13 que codifica los polipéptidos respectivos o proteínas que tienen la secuencia de aminoácidos según se estableció en SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, y SEQ ID NO:14. Un promotor heterólogo también puede estar

10 operativamente unido a secuencia de codificación de ADN sintéticas que codifican un plástido que apunta TIC7941PL_1, TIC7941PL_2, o TIC7941PL_3 o que no apunta TIC7941PL_1, TIC7941PL_2, o TIC7941PL_3. Los codones de una molécula de ácido nucleico recombinante que codifican proteínas reveladas en la presente pueden ser sustituidos mediante codones sinónimos (conocidos en el arte como sustitución silenciosa).

15 [80] Un constructo de ADN recombinante que comprende una secuencia de codificación de proteína TIC7941 puede además comprender una región de ADN que codifica uno o más agentes inhibidores de insectos que puede estar configurada para expresar concomitantemente o co-expresar con una secuencia de ADN que codifica una proteína TIC7941, una proteína diferente de una proteína TIC7941, una molécula ARNdh inhibidora, o una proteína auxiliar.

20 Proteínas auxiliares incluyen, aunque no se limitan a, co-factores, enzimas, socios de enlace, u otros agentes que funcionan para ayudar en la efectividad de un agente inhibidor de insectos, por ejemplo, al ayudar en su expresión, influyendo en su estabilidad en plantas, optimizando energía libre para oligomerización, aumentando su toxicidad, y aumentando su espectro de actividad. Una proteína auxiliar puede facilitar la captación de uno o más agentes inhibidores

25 de insectos, por ejemplo, o potenciar los efectos tóxicos del agente tóxico.

[81] Un constructo de ADN recombinante puede ser montado de modo que todas las proteínas o moléculas ARNdh sean expresadas a partir de un promotor o cada proteína o moléculas de ARNdh esté bajo control de promotor separado o alguna de sus combinaciones. Las proteínas de esta invención pueden ser expresadas a partir de un sistema de expresión de

30 genes múltiples en donde una o más proteínas de la clase de toxina de proteína TIC7941 se expresan a partir de un segmento de nucleótidos común que también contiene otros marcos de lectura abiertos y promotores, dependiendo del tipo de sistema de expresión seleccionado. Por ejemplo, un sistema de expresión de múltiples genes bacteriano puede utilizar un único promotor para conducir expresión de marcos de lectura abiertos unidos de forma

múltiple/tándem desde dentro de un único operón (es decir, expresión policistrónica). En otros ejemplos, un sistema de expresión de múltiples genes de plantas puede utilizar casetes de expresión múltiples no unidos o unidos, cada casete que expresa una proteína diferente u otro agente tal como una o más moléculas ARNdh.

- 5 [82] Polinucleótidos recombinantes o constructos de ADN recombinantes que comprenden una secuencia de codificación de proteína TIC7941 pueden ser suministrados a células huésped mediante vectores, por ejemplo, un plásmido, baculovirus, cromosoma sintético, virión, cósmido, fagomidio, fago, o vector viral. Dichos vectores pueden ser usados para lograr expresión estable o transitoria de una secuencia que codifica proteína TIC7941 en una célula
- 10 huésped, o expresión subsiguiente del polipéptido codificado. Un polinucleótido recombinante exógeno o constructo de ADN recombinante que comprende una secuencia de codificación de proteína TIC7941 y que es introducido dentro de una célula huésped es denominado en esta solicitud como un “transgen”. Se proporciona en la presente bacterias transgénicas, células
- 15 vegetales transgénicas, plantas transgénicas, y partes de plantas transgénicas que contienen un polinucleótido recombinante que expresa secuencia de codificación de proteína TIC7941, TIC7941_His, TIC7941PL_1, TIC7941PL_2, o TIC7941PL_3. El término “célula bacteriana” o “bacteria” puede incluir, aunque no se limita a, una célula *Agrobacterium*, una *Bacillus*, una *Escherichia*, una *Salmonella*, una *Pseudomonas*, una *Brevibacillus*, una *Klebsiella*, una *Erwinia*, o una a *Rhizobium*. El término “célula vegetal” o “planta” puede incluir aunque no
- 20 se limita a planta dicotiledóneas o monocotiledóneas. El término “célula vegetal” o “planta” puede además incluir aunque no se limita a una célula vegetal o planta de alfalfa, banana, cebada, frijol, brócoli, repollo, brassica, zanahoria, yuca, ricino, coliflor, apio, garbanzo, repollo chino, cítricos, coco, café, maíz, trébol, algodón, una cucurbitácea, pepino, abeto Douglas, berenjena, eucaliptus, lino, ajo, uva, lúpulos, puerro, lechuga, pino de incienso, mijos,
- 25 melones, nuez, avena, oliva, cebolla, ornamental, palma, pasto, guisante, maní, pimienta, guisante de paloma, pino, papa, álamo, calabaza, pino Radiata, rábano, semilla de colza, arroz, rizoma, centeno, cártamo, arbusto, sorgo, pino del sur, soja, espinaca, zapallo, frutilla, remolacha azucarera, caña de azúcar, girasol, maíz dulce, goma dulce, batata, pasto varilla, te, tabaco, tomate, triticales, hierba de césped, sandía y trigo. En ciertas realizaciones, se
- 30 proporcionan plantas transgénicas y partes de plantas transgénicas regeneradas a partir de una célula de planta transgénica. En ciertas realizaciones, las plantas transgénicas pueden ser obtenidas a partir de una semilla transgénica, cortando, partiendo, moliendo o separando de otra forma la parte de la planta. En ciertas realizaciones, la parte de la planta puede ser una semilla, una baya, una hoja, una flor, un tallo, una raíz, o cualquiera de sus porciones, o una

porción no regenerable de una parte de una planta transgénica. Tal como se usa en este contexto, una porción “no regenerable” de una parte de planta transgénica es una porción que no puede ser inducida para formar una planta completa o que no puede ser inducida para formar una planta completa que es capaz de reproducción sexual y/o asexual. En ciertas realizaciones, una porción de una planta no regenerable es una porción de una semilla, baga, hoja, flor, tallo o raíz transgénicos. Se proporcionan métodos para realizar plantas transgénicas que comprendan cantidades inhibitoras de *Lepidóptera* de insectos de una proteína TIC 7941. Dichas plantas pueden ser realizadas introduciendo un polinucleótido recombinante que codifica cualquiera de las proteínas provistas en esta solicitud dentro de una célula vegetal, y seleccionando una planta proveniente de dicha célula vegetal que expresa una cantidad de las proteínas inhibitoras de *Lepidóptera* de insectos. Plantas pueden provenir de las células vegetales mediante regeneración, semilla, polen, o técnicas de transformación de meristema. Métodos para transformar plantas son conocidos en el arte. Productos de planta procesados, donde el producto procesado comprende una cantidad detectable de una proteína TIC7941, un segmento inhibitor de insectos o su fragmento, o cualquiera de su porción diferencial, también se revelan en la presente. En ciertas realizaciones, el producto procesado se selecciona entre el grupo integrado por partes de plantas, biomasa de planta, aceite, comida, azúcar, alimento animal, harina, copos, salvado, pelusa, cáscaras, semillas procesadas, y semillas. En ciertas realizaciones, el producto procesado es no regenerable. El producto de planta puede comprender materia prima u otros productos de comercio derivados de una planta transgénica o parte de planta transgénica, donde el materia prima u otro producto puede ser rastreado mediante comercio detectando segmentos de nucleótidos o ARN expresado proteínas que codifican o comprenden porciones diferenciales de una proteína TIC7941. Plantas que expresan una proteína TIC7941 pueden ser cruzadas por reproducción con eventos transgénicos que expresan otras proteínas de toxina y/o que expresan otros rasgos transgénicos tal como genes de tolerancia herbicida, genes que otorgan rendimiento o rasgos de tolerancia al estrés, y similares, o dichos rasgos pueden ser combinados en un único vector de forma que los rasgos se unan todos.

[87] Como se describe adicionalmente en los Ejemplos, la clase de toxina de proteína TIC7941 y secuencias que tienen una identidad porcentual sustancial con un miembro de la clase de toxina de proteína TIC7941 puede ser identificada usando métodos conocidos por parte de aquellos con experiencia común en el arte tal como reacción en cadena de polimerasa (PCR), amplificación térmica e hibridación. Por ejemplo, las proteínas en la clase de toxina de proteína TIC7941 pueden usarse para producir anticuerpos que se unen específicamente a

proteínas relacionadas, y pueden usarse para clasificar y para encontrar otros miembros de proteína que están estrechamente relacionados. Además, secuencias de nucleótidos que codifican las proteínas de toxina TIC7941 pueden usarse como sondas y cebadores para clasificar para identificar otros miembros de la clase usando ciclo térmico o amplificación isotérmica y métodos de hibridación. Por ejemplo, oligonucleótidos provenientes de secuencias según se establece en SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:11, y SEQ ID NO:13 pueden usarse para determinar la presencia o ausencia de un transgen TIC7941 en una muestra de ácido desoxirribonucleico proveniente de un producto materia prima. Dada la sensibilidad de ciertos métodos de detección de ácido nucleico que utilizan oligonucleótidos, se anticipa que oligonucleótidos provenientes de secuencias según se establece en SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:11, y SEQ ID NO:13 se pueden usar para detectar un transgen TIC7941PL_1, TIC7941PL_2, y TIC7941PL_3 en productos materia prima provenientes de fuentes agrupadas donde solamente una fracción del producto materia prima proviene de una planta transgénica que contiene cualquiera de los transgenes. Se reconoce además que tales oligonucleótidos pueden usarse para introducir variación de secuencia de nucleótidos en cada una de SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:11, y SEQ ID NO:13. Dichos oligonucleótidos “mutagénesis” son útiles para identificación de variantes de secuencia de aminoácidos de clase de toxina de proteína TIC7941 que presentan un rango de actividad inhibidora de insectos o expresión variada en células huésped de planta transgénica. Homólogos de secuencia de nucleótidos, por ejemplo, proteínas insecticidas codificadas por secuencias de nucleótidos que hibridan a cada una o cualquiera de las secuencias reveladas en esta solicitud bajo condiciones de hibridación rigurosas, también son una realización de la presente invención. La invención también proporciona un método para detectar una primera secuencia de nucleótidos que hibridan en una secuencia de nucleótidos, donde la primera secuencia de nucleótidos (o su secuencia complemento inversa) codifica una proteína pesticida o su fragmento pesticida e hibrida en la segunda secuencia de nucleótidos. En dicho caso, la segunda secuencia de nucleótidos puede ser cualquiera de las secuencias de nucleótidos presentadas como SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:11, y SEQ ID NO:13 bajo condiciones de hibridación rigurosas. Secuencias codificantes de nucleótidos hibridan entre sí bajo condiciones de hibridación apropiadas, tal como condiciones de hibridación rigurosas, y las proteínas codificadas por estas secuencias de nucleótidos reaccionan de forma cruzada con antisuero levantado contra cualquiera de las otras proteínas. Condiciones de hibridación rigurosas, tal como se define en la presente, comprende al menos hibridación a 42° C seguido por dos lavados durante cinco minutos cada uno a temperatura ambiente con 2X SSC, 0,1% SDS, seguido por dos lavados durante treinta minutos

cada uno a 65°C en 0,5X SSC, 0,1% SDS. Lavados a temperaturas incluso mayores constituye incluso condiciones de más rigurosidad, por ejemplo, condiciones de hibridación de 68°C, seguido por lavado a 68°C, en 2xSSC que contiene 0,1% SDS. Una persona con experiencia en el arte va a reconocer que, debido a la redundancia del código genético, muchas otras

5 secuencias son capaces de codificar tales proteínas relacionadas, y aquellas secuencias, en la medida que funcionen para expresar proteínas pesticidas ya sea en cepas *Bacillus* o en células vegetales, son realizaciones de la presente invención, reconociendo por supuesto que muchas de dichas secuencias codificantes redundantes no van a hibridar bajo estas condiciones en las secuencias *Bacillus* o *Paenibacillus* nativas que codifican TIC7941. Esta solicitud contempla

10 el uso de estos y otros métodos de identificación conocidos por aquellos con experiencia común en el arte para identificar secuencias que codifican proteína TIC7941 y secuencias que tienen una identidad porcentual sustancial con las secuencias que codifican proteína TIC7941. Esta revelación también contempla el uso de métodos moleculares conocidos en el arte para diseñar y clonar proteínas útiles comercialmente que comprenden quimeras de proteínas de proteínas

15 pesticidas; por ejemplo, las quimeras pueden ser ensambladas a partir de segmentos de las proteínas relacionadas a TIC7941 para derivar realizaciones útiles adicionales incluyendo ensamble de segmentos de TIC7941, TIC7941PL_1, TIC7941PL_2, y TIC7941PL_3 con segmentos de proteínas diversas diferentes de TIC7941, TIC7941PL_1, TIC7941PL_2, y TIC7941PL_3; y proteínas relacionadas. Las proteínas TIC7941 pueden ser sometidas a

20 alineación entre sí y a otras *Bacillus*, *Paenibacillus* u otras proteínas pesticidas (ya sea que estas estén o no estrechamente o vagamente relacionadas filogenéticamente), y segmentos de cada una de dicha proteína pueden ser identificados como útiles para sustitución entre las proteínas alineadas, dando como resultado la construcción de proteínas quiméricas. Dichas proteínas quiméricas pueden ser sometidas a análisis de bioensayos de plagas y caracterizadas

25 según la presencia o ausencia de bioactividad aumentada o espectro de plaga objetivo expandido en comparación con las proteínas originales a partir de las cuales proviene cada uno de dicho segmento en la quimera. La actividad pesticida de los polipéptidos puede ser adicionalmente diseñada según actividad para una plaga particular o para un espectro más amplio de plagas intercambiando dominios o segmentos con otras proteínas o usando métodos

30 de evolución dirigidos conocidos en el arte. Además, esta revelación contempla diseñar una proteína pesticida variante insertando secuencias péptido dentro de la proteína pesticida nativa que puede mejorar la actividad pesticida contra especie de plaga de insectos específica. El péptido insertado se une a un receptor de intestino medio del insecto. Unión específica de la endotoxina a receptores específicos ubicados en el intestino medio del insecto es un paso en el

modo de acción pesticida de una proteína pesticida. Al menos cinco receptores de proteína diferentes han sido descritos por ser involucrados en interacciones que conllevan a mortalidad de insectos; una proteína de tipo cadherina (CADR), una aminopeptidasa N (APN) de anclaje a glicosilfosfatidil inositol (GPI), una fosfatasa alcalina de anclaje GPI (ALP), un transportador ABC de transmembrana, y una “Desintegrina A y Metaloproteasa” o metaloproteasa ADAM.

Además, se ha propuesto que glicolípidos también son moléculas de receptor Cry importantes en insectos y nematodos (Pigott et al. (2007) *Role of Receptors in Bacillus thuringiensis Crystal Toxin Activity. Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 71(2): 255-281; Ochoa-Campuzano et al. (2007) *An ADAM metalloprotease is a Cry3Aa Bacillus thuringiensis toxin receptor. Biochemical and Biophysical Research Communication*, 362(2): 437-442). El fragmento péptido, FAWPEPBIN se une a transportador ABCc4 ABC de transmembrana de gusano militar Tardío (FAW) [según sus siglas en inglés]. Inserción de la secuencia codificante, FAWPEPBIN_Bac (SEQ ID NO:15), que codifica el péptido FAWPEPBIN (SEQ ID NO:17) dentro del dominio bucle 2 de TIC7941 aumentó actividad pesticida contra FAW en ciertas variantes. Específicamente, inserción de FAWPEPBIN en posiciones de aminoácidos 805-816 en TIC7941_2His dio como resultado poca o sin demostrar actividad contra FAW mientras inserción de FAWPEPBIN en posiciones de aminoácidos 804-815 de TIC7941_3His demostró actividad contra FAW. Una secuencia de ADN sintética que codifica el péptido FAWPEPBIN, FAWPEPBIN_PL, (SEQ ID NO:16) se diseñó para expresión en una célula vegetal. Se encontró FAWPEPBIN_PL entre posiciones de nucleótidos 2386 y 2421 de la secuencia codificante sintética TIC7941PL_2 y dentro de posiciones de nucleótidos 2383-2418 de la secuencia codificante sintética TIC7941PL_3. El fragmento péptido FAWPEPBIN está ubicado dentro de posiciones de aminoácidos 796-807 de TIC7941PL_2 y 795-806 de TIC7941PL_3. Plantas de maíz fueron transformadas con vectores binarios que comprenden casetes de transgen usados para la expresión de TIC7941PL_2 y TIC7941PL_3. Las plantas que expresan TIC7941PL_2 y TIC7941PL_3 van a ser usadas para ensayar la actividad pesticida de las toxinas diseñadas contra FAW. Métodos para controlar insectos, en particular infestaciones *Lepidóptera* de plantas de cultivos, con las proteínas TIC7941 también se revelan en esta solicitud. Dichos métodos pueden comprender cultivar una planta que comprende una cantidad inhibidora de insecto o *Lepidóptera* de una proteína de toxina TIC7941. En ciertas realizaciones, dichos métodos pueden además comprender cualquiera de o más de: (i) aplicar cualquier composición que comprende o que codifica una proteína de toxina TIC7941 a una planta o una semilla que da origen a una planta; y (ii) transformar una planta o una célula vegetal que da origen a una planta con un polinucleótido que codifica una proteína de toxina

TIC7941. En general, se contempla que una proteína de toxina TIC7941 puede ser provista en una composición, provista en un microorganismo, o provista en una planta transgénica para otorgar actividad inhibidora de insectos contra insectos *Lepidóptera*. En ciertas realizaciones, una molécula de ácido nucleico recombinante de una proteína de toxina TIC7941 es el ingrediente activo pesticidamente de una composición inhibidora de insectos preparada cultivando *Bacillus* recombinante o cualquier otra célula bacteriana recombinante transformada para expresar una proteína de toxina TIC7941 bajo condiciones adecuadas para expresar la proteína de toxina TIC7941. Dicha composición puede ser preparada mediante disecación, liofilización, homogeneización, extracción, filtración, centrifugación, sedimentación, o concentración de un cultivo de dichas células recombinantes que expresan/producen dicho polipéptido recombinante. Dicho proceso puede dar como resultado un *Bacillus* u otro extracto de célula bacteriana entomopatógena, suspensión celular, homogeneizado celular, lisado celular, sobrenadante celular, filtrado celular, o gránulo celular. Al obtener el polipéptido recombinante producido de esta forma, una composición que incluye los polipéptidos recombinantes puede incluir células bacterianas, esporas bacterianas, y cuerpos de inclusión paraporales y puede ser formulado para varios usos, incluyendo como productos de pulverización inhibidora de insectos agrícolas o como formulaciones inhibidoras de insectos en bioensayos de dietas. En una realización, para reducir la probabilidad de desarrollo de resistencia, una composición inhibidora de insectos que comprende una proteína de toxina TIC7941 puede además comprender al menos un polipéptido adicional que presenta actividad inhibidora de insectos contra la misma especie de insectos *Lepidóptera*, pero que es diferente de la proteína de toxina TIC7941. Polipéptidos adicionales posibles para dicha composición incluyen cualquier proteína inhibidora de insectos o molécula ARNdh inhibidora de insectos conocida por una persona con experiencia común en el arte. Un ejemplo para el uso de dichas secuencias de ribonucleótidos para controlar plagas de insectos se describe en Baum, *et al.* (Publicación de Patente de los Estados Unidos 2006/0021087 A1). Dichos polipéptidos adicionales para el control de plagas *Lepidóptera* pueden ser seleccionados entre el grupo integrado por una proteína inhibidora de insectos, tal como, aunque no se limita a, Cry1A (Patente de los Estados Unidos No. 5.880,275), Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1A.105, Cry1Ae, Cry1B (Publicación de Patente de los Estados Unidos No. 10/525,318), Cry1C (Patente de los Estados Unidos No. 6.033.874), Cry1D, Cry1Da y sus variantes, Cry1E, Cry1F, y quimeras Cry1A/F (Patente de los Estados Unidos Nos. 7.070.982; 6.962.705; y 6.713.063), Cry1G, Cry1H, Cry1I, Cry1J, Cry1K, Cry1L, quimeras tipo Cry1 tal como, aunque no se limitan a, TIC836, TIC860, TIC867, TIC869, y TIC1100 (Publicación de Solicitud Internacional

WO2016/061391 (A2)), TIC2160 (Publicación de Solicitud Internacional WO2016/061392(A2)), Cry2A, Cry2Ab (Patente de los Estados Unidos No. 7.064.249), Cry2Ae, Cry4B, Cry6, Cry7, Cry8, Cry9, Cry15, Cry43A, Cry43B, Cry51Aa1, ET66, TIC400, TIC800, TIC834, TIC1415, Vip3A, VIP3Ab, VIP3B, AXMI-001, AXMI-002, AXMI-030, AXMI-035, AND AXMI-045 (Publicación de Patente de los Estados Unidos 2013-0117884 A1), AXMI-52, AXMI-58, AXMI-88, AXMI-97, AXMI-102, AXMI-112, AXMI-117, AXMI-100 (Publicación de Patente de los Estados Unidos 2013-0310543 A1), AXMI-115, AXMI-113, AXMI-005 (Publicación de Patente de los Estados Unidos 2013-0104259 A1), AXMI-134 (Publicación de Patente de los Estados Unidos 2013-0167264 A1), AXMI-150 (Publicación de Patente de los Estados Unidos 2010-0160231 A1), AXMI-184 ((Publicación de Patente de los Estados Unidos 2010-0004176 A1), AXMI-196, AXMI-204, AXMI-207, AXMI-209 ((Publicación de Patente de los Estados Unidos 2011-0030096 A1), AXMI-218, AXMI-220 ((Publicación de Patente de los Estados Unidos 2014-0245491 A1), AXMI-221z, AXMI-222z, AXMI-223z, AXMI-224z, AXMI-225z (Publicación de Patente de los Estados Unidos 2014-0196175 A1), AXMI-238 (Publicación de Patente de los Estados Unidos 2014-0033363 A1), AXMI-270 (Publicación de Patente de los Estados Unidos 2014-0223598 A1), AXMI-345 (Publicación de Patente de los Estados Unidos 2014-0373195 A1), AXMI-335 (Publicación de Solicitud Internacional WO2013/134523(A2)), DIG-3 (Publicación de Patente de los Estados Unidos 2013-0219570 A1), DIG-5 (Publicación de Patente de los Estados Unidos 2010-0317569 A1), DIG-11 (Publicación de Patente de los Estados Unidos 2010-0319093 A1), AfIP-1A y sus derivados (Publicación de Patente de los Estados Unidos 2014-0033361 A1), AfIP-1B y sus derivados (Publicación de Patente de los Estados Unidos 2014-0033361 A1), PIP-1APIP-1B (Publicación de Patente de los Estados Unidos 2014-0007292 A1), PSEEN3174 (Publicación de Patente de los Estados Unidos 2014-0007292 A1), AECFG-592740 (Publicación de Patente de los Estados Unidos 2014-0007292 A1), Pput_1063 (Publicación de Patente de los Estados Unidos 2014-0007292 A1), DIG-657 (Publicación de Solicitud Internacional WO2015/195594 A2), Pput_1064 (Publicación de Patente de los Estados Unidos 2014-0007292 A1), GS-135 y sus derivados (Publicación de Patente de los Estados Unidos 2012-0233726 A1), GS153 y sus derivados (Publicación de Patente de los Estados Unidos 2012-0192310 A1), GS154 y sus derivados (Publicación de Patente de los Estados Unidos 2012-0192310 A1), GS155 y sus derivados (Publicación de Patente de los Estados Unidos 2012-0192310 A1), SEQ ID NO:2 y sus derivados como se describe en la Publicación de Patente de los Estados Unidos 2012-0167259 A1, SEQ ID NO:2 y sus derivados como se describe en Publicación de Patente de los Estados Unidos 2012-0047606

A1, SEQ ID NO:2 y sus derivados como se describe en Publicación de Patente de los Estados Unidos 2011-0154536 A1, SEQ ID NO:2 y sus derivados como se describe en Publicación de Patente de los Estados Unidos 2011-0112013 A1, SEQ ID NO:2 y 4 y sus derivados como se describe en Publicación de Patente de los Estados Unidos 2010-0192256 A1, SEQ ID NO:2 y sus derivados como se describe en Publicación de Patente de los Estados Unidos 2010-0077507 A1, SEQ ID NO:2 y sus derivados como se describe en Publicación de Patente de los Estados Unidos 2010-0077508 A1, SEQ ID NO:2 y sus derivados como se describe en Publicación de Patente de los Estados Unidos 2009-0313721 A1, SEQ ID NO:2 o 4 y sus derivados como se describe en Publicación de Patente de los Estados Unidos 2010-0269221 A1, SEQ ID NO:2 y sus derivados como se describe en Patente de los Estados Unidos No. 7.772.465 (B2), CF161_0085 y sus derivados como se describe en WO2014/008054 A2, proteínas tóxicas *Lepidóptera* y sus derivados como se describe en Publicaciones de Patente de los Estados Unidos US2008-0172762 A1, US2011-0055968 A1, y US2012-0117690 A1; SEQ ID NO:2 y sus derivados como se describe en US7510878(B2), SEQ ID NO:2 y sus derivados como se describe en Patente de los Estados Unidos No. 7812129(B1), DIG-911 y DIG-180 como se describe en Publicación de Patente de los Estados Unidos No. 2015-0264940A1; y similares. En otras realizaciones, dicha composición /formulación puede además comprender al menos un polipéptido adicional que presenta actividad inhibidora de insectos para un insecto que no es inhibido por otra proteína inhibidora de insectos de la presente invención para expandir el espectro de inhibición de insectos obtenido. Por ejemplo, para el control de plagas *Hemipteran*, combinaciones de proteínas inhibidoras de insectos de la presente invención pueden usarse con proteínas activas e *Hemipteran* tal como TIC1415 (Publicación de Patente de los Estados Unidos 2013-0097735 A1), TIC807 (Patente de los Estados Unidos No. 8609936), TIC834 (Publicación de Patente de los Estados Unidos 2013-0269060 A1), AXMI-036 (Publicación de Patente de los Estados Unidos 2010-0137216 A1), y AXMI-171 (Publicación de Patente de los Estados Unidos 2013-0055469 A1). Además un polipéptido para el control de plagas *Coleopteran* puede ser seleccionado entre el grupo integrado por una proteína inhibidora de insectos, tal como, aunque no se limita a, Cry3Bb (Patente de los Estados Unidos No. 6.501.009), variantes Cry1C, variantes Cry3A, Cry3, Cry3B, Cry34/35, 5307, AXMI134 (Publicación de Patente de los Estados Unidos 2013-0167264 A1) AXMI-184 (Publicación de Patente de los Estados Unidos 2010-0004176 A1), AXMI-205 (Publicación de Patente de los Estados Unidos 2014-0298538 A1), AXMI-207 (Publicación de Patente de los Estados Unidos 2013-0303440 A1), AXMI-218, AXMI-220 (Publicación de Patente de los Estados Unidos 20140245491A1), AXMI-221z, AXMI-223z (Publicación de Patente de los Estados Unidos

2014-0196175 A1), AXMI-279 (Publicación de Patente de los Estados Unidos 2014-0223599 A1), AXMI-R1 y sus variantes (Publicación de Patente de los Estados Unidos 2010-0197592 A1, TIC407, TIC417, TIC431, TIC807, TIC853, TIC901, TIC1201, TIC3131, DIG-10 (Publicación de Patente de los Estados Unidos 2010-0319092 A1), eHIPs (Publicación de
5 Solicitud de Patente de los Estados Unidos No. 2010/0017914), IP3 y sus variantes (Publicación de Patente de los Estados Unidos 2012-0210462 A1), variantes PHI-4 (Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos 2016-0281105 A1), variantes PIP-72 (WO 2016-144688 A1), variantes PIP-45, variantes PIP-64, variantes PIP-74, variantes PIP-75, y variantes PIP-77 (WO 2016-144686 A1), DIG-305 (WO 2016109214 A1), variantes PIP-
10 47 (Publicación de Patente de los Estados Unidos 2016-0186204 A1), DIG-17, DIG-90, DIG-79 (WO 2016-057123 A1), DIG-303 (WO 2016-070079 A1), y ϖ -Hexatoxin-Hv1a (Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos US2014-0366227 A1).

[98] Polipéptidos adicionales para el control de plagas de insectos *Coleopteran*, *Lepidóptera*, y *Hemipteran* se puede encontrar en el sitio web de nomenclatura de toxina
15 *Bacillus thuringiensis* que lo provee Neil Crickmore (de acceso en internet en www.btnomenclature.info).

[99] La posibilidad de insectos de desarrollar resistencia a ciertos insecticidas ha sido documentada en el arte. Una estrategia de gestión de resistencia a insectos es la de utilizar cultivos transgénicos que expresan dos agentes inhibidores de insectos distintos que funcionan
20 mediante diferentes modos de acción. En consecuencia, cualesquiera insectos con resistencia a cualquiera de uno de los agentes inhibidores de insectos puede ser controlado por el otro agente inhibidor de insectos. Otra estrategia de gestión de resistencia de insectos utiliza el uso de plantas que no están protegidas a la especie de plata *Lepidóptera* fijada como objetivo para proporcionar un refugio para dichas plantas no protegidas. Un ejemplo particular se describe
25 en Patente de los Estados Unidos No. 6.551.962, que se incorpora a modo de referencia en su totalidad.

[100] Otras realizaciones tal como químicas pesticidas aplicadas tópicamente que son diseñadas para controlar plagas que también son controladas por las proteínas reveladas en la presente para ser usadas con proteínas en tratamientos de semilla, pulverizar sobre, remojar
30 sobre, o limpiar sobre formulaciones pueden ser aplicadas directamente al suelo (un remojo de suelo), aplicada a plantas que crecen que expresan las proteínas reveladas en la presente, o formuladas para ser aplicadas a semilla que contiene uno o más transgenes que codifican una o más de las proteínas reveladas. Dichas formulaciones para usar en tratamientos de semilla

pueden ser aplicadas con varios adhesivos y fijadores conocidos en el arte. Dichas formulaciones pueden contener pesticidas que son sinérgicos en modo de acción con las proteínas reveladas, de forma que los pesticidas de formulación actúan a través de un modo de acción diferente para controlar la misma plaga o plagas similares que pueden ser controladas por las proteínas reveladas, o que tales pesticidas actúan para controlar plagas dentro de un rango huésped más amplio o especie de plaga de planta que no son efectivamente controladas por las proteínas pesticidas TIC7941.

[101] La composición/ formulación antes mencionada puede además comprender un portador aceptable agrícolamente, tal como una carnada, un polvo, talco, microgránulos, gránulo, pulverizador, emulsión, una suspensión coloidal, una solución acuosa, una preparación *Bacillus* espora/cristal, un tratamiento de semilla, una célula vegetal recombinante /tejido celular /semilla/planta transformada para expresar una o más de las proteínas, o bacteria transformada para expresar una o más de las proteínas. Dependiendo del nivel de inhibición de insecto o inhibición pesticida inherente en el polipéptido recombinante y el nivel de formulación a ser aplicado a una planta o ensayo de dieta, la composición/ formulación puede incluir varias cantidades en peso del polipéptido recombinante, por ejemplo desde 0,0001% hasta 0,001% hasta 0,01% hasta 1% hasta 99% en peso del polipéptido recombinante.

[102] Esta revelación también contempla composiciones y métodos para reducir expresión de una proteína pesticida en los tejidos reproductivos de una planta transgénica mediante el uso de microARNs (miARNs). miARNs son componentes esenciales de la mecánica de silenciamiento de genes en plantas. En plantas, la producción de miARNs es un proceso de tejido específico, está estrechamente asociado con transcripción y empalme, e incluso varía entre precursores miARN. Codificado por ADN nuclear en plantas, miARNs funciona mediante apareamiento de base con secuencias complementarias dentro de moléculas mRNA (Achkar et al. (2016) *miARN Biogenesis: A Dynamic Pathway, Trends in Plant Science*. 21(12): 1034-1044). miARNs se producen a partir de un transcripto miARN primario (pri-miARN). Los pri-miARNs que nacen son recubiertos en el extremo 5' y poliadenilados en el extremo 3', y pri-miARNs que contienen intron son empalmados o empalmados alternativamente. pri-miARNs son procesados mediante el complejo de fragmentación que contiene la RNasa nuclear DICER-LIKE 1 (DCL1) y sus proteínas auxiliares SERRATE (SE) e HYPONASTIC LEAVES (HYL1) como componentes centrales, para suministrar miARN/miARN* duplexes de veintiún (21) nucleótidos maduros. El miARN/miARN* dúplex se estabiliza mediante 3'-terminal 2'-O-metilación mediante HUA ENHANCER 1 (HEN1). HEN1 también contribuye para exportar el miARN/miARN* dúplex del núcleo celular y

montaje de complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC) [según sus siglas en inglés]. Durante carga de RICS, una hebra del dúplex ARN pequeño se selecciona como la hebra guía y se incorpora dentro de ARGONAUTE 1 (AGO1) para formar un RISC funcional, mientras la otra hebra (la hebra pasajera) se extrae y se degrada. La carga de miARNs dentro de

5 proteínas AGO es afectada por las protuberancias en los duplexes miARN/miARN* producidas por incongruencias de par de base. AGO1 prefiere duplexes con incongruencias centrales (Yu et al. (2017) *The “how” and “where” of plant microRNAs. New Phytologist*, 216: 1002-1017).

[103] miARNs de plantas regulan genes objetivo en el nivel post-transcripcional mediante dos mecanismos principales: escisión de transcripto y represión de traducción. En plantas,

10 represión de traducción es menos frecuentemente observada que escisión de transcripto. Escisión de ARN guiada por miARN se da en una posición precisa en el mRNA objetivo. Escisión se lleva a cabo mediante el dominio PIWI de proteínas AGO, que forma un pliegue RNasa de tipo H y presenta actividad endonucleasa. Los fragmentos de escisión 5' y 3' son posteriormente degradados por exonucleasas. Factores conocidos requeridos para inhibición

15 de traducción intermediada por miARN incluye la enzima KATANIN 1 cortada en microtúbulos (KTN1), el componente de cuerpo de procesamiento (cuerpo P) de VARICOSE (VCS), la proteína SUO de repetición GW, y el PROGRAMA 1 de MERISTEMA ALTERADO de proteína de membrana ER 1 (AMP1). Mutaciones en estos genes interfieren selectivamente con represión guiada por miARN en el nivel proteína, sugiriendo que escisión

20 de transcripto y represión de traducción son dos modos de acción independientes. El mecanismo molecular que subyace represión de traducción intermediada por miARN no se entiende bien. Análisis *in vitro* sugiere que miARNs de plantas podría inhibir inicio de traducción o impedir el movimiento de ribosomas (Yu et al. (2017) *The “how” and “where” of plant microRNAs. New Phytologist*, 216: 1002-1017).

25 [104] Además de escisión mRNA y represión de traducción, algunos miARNs también activan la producción de ARN pequeño de interferencia secundarios (ARNip) de sus transcriptos, y esto es un fenómeno difundido y conservado en plantas (Yu et al. (2017) *The “how” and “where” of plant microRNAs. New Phytologist*, 216: 1002-1017). Los miARNs que típicamente activan la producción de estos ARNip secundarios son veintidós (22)

30 nucleótidos de longitud en oposición a los veintiún (21) nucleótidos de miARNs descritos anteriormente. El ARN objetivo se convierte en ARN de doble hebra (ARNdh) mediante ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp), que luego se escinde en ARNip mediante nucleasas DCL. Típicamente, una hebra del dúplex preferencialmente se asocia con una proteína AGO para formar un complejo efector (complejo de silenciamiento inducido por ARN, o RISC), que

fija como objetivo y silencia transcriptos basados en complementariedad de secuencia. En Arabidopsis, después de escisión de ARN guiada por miARN intermediada por AGO1 del ARN objetivo, tanto el fragmento de escisión 5' o 3' se estabiliza mediante SUPRESOR DE SILENCIAMIENTO GENICO 3 (SGS3), que se asocia con RISC mediante características de reconocimiento de los veintidós (22) nucleótidos miARN/objetivo dúplex para proteger la escisión. ARN POLIMERASA DEPENDIENTE DE ARN 6 (RDR6) se recluta para convertir el fragmento de escisión en ARNdh que es más tarde fragmentado en ARNip en un fragmento de intervalo de veintiún (21) nucleótidos de degradación. En plantas, este proceso puede ser amplificado mediante producción de siRNAs secundario después de transcripción mediante ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp) sobre el ARN objetivo primario. (Cuperus et al., (2010) *Unique Functionality of 22 nt miARNs in Triggering RDR6-Dependent siRNA Biogenesis from Target Transcripts in Arabidopsis*. *Nat Struct Mol Biol*, 17(8): 997-1003; Chen et al., (2010) *22-Nucleotide RNAs trigger secondary siRNA biogenesis in Plants*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107: 15269-15274; Yu et al. (2017) *The “how” and “where” of plant microRNAs*. *New Phytologist*, 216: 1002-1017).

[105] Mediante procesamiento de datos de miARNs en varios tejidos en soja, dos miARNs fueron identificados que fueron sobre representados en tejidos reproductivos al compararse con tejidos vegetativos; miR395 y miR4392. miR395 se procesa en miARN/miARN * dúplex de veintiún (21) nucleótidos y se expresa mayormente en el estambre de flor de soja. miR4392 se procesa en miARN/miARN* dúplex de veintidós (22) nucleótidos y activa la producción de ARNip secundarios de sus transcriptos, amplificando la señal de supresión. miR4392 es sumamente enriquecido en las anteras de flor de soja. Unido con una proteína ARGO para formar un complejo de silenciamiento, miARNs funcionan como guías de secuencia específica, dirigiendo el complejo de silenciamiento a transcriptos mediante pareamiento base entre el miARN y sitios de complementariedad en la presente denominados como “sitios de unión objetivo miARN”, dentro de la región no traducida 3' (3' UTR) de ARNs objetivo. Sitios de unión objetivo miARN que corresponden a miR395 (Gm.miR395_1 (SEQ ID NO:18) y Gm.miR395_2 (SEQ ID NO:19)) y miR4392 (Gm.miR4392_1 (SEQ ID NO:21) y Gm.miR4392_2 (SEQ ID NO:22)) fueron unidos operativamente usando un espaciador de ADN (SP-ART.8a-1, SEQ ID NO:24) para constructo SUP-miR395 (SEQ ID NO:20) y SUP-miR4392 (SEQ ID NO:23), respectivamente. SUP-miR395 y SUP-miR4392 fueron a su vez unidos operativamente a la secuencia de codificante TIC7941PL_1 3' después del codón de terminación que produce los transgenes, TIC7941PL_1-miR395 (SEQ ID NO:25) y TIC7941PL_1-miR4392 (SEQ ID NO:26), respectivamente. Expresión de TIC7941PL_1-

miR395 y TIC7941PL_1-miR4392 no tuvo efecto sobre la actividad pesticida de TIC7941PL_1. Tanto TIC7941PL_1-miR395 como TIC7941PL_1-miR4392 demostraron actividad pesticida similar contra gusano militar del sur (SAW, *Spodoptera eridania*), barrenador de la soja (SBL, *Chrysodeixis includens*), y gusano de la soja (SPW, *Helicoverpa zea*) cuando se compara con TIC7941PL_1 en ensayos de disco de hoja. Operativamente uniendo los sitios objetivo miR395 y miR4392 a la secuencia codificante TIC7941PL_1 tiene la intención de disminuir expresión de la proteína pesticida TIC7941PL_1 en los tejidos reproductivos de soja transgénica que expresa TIC7941PL_1-miR395 o TIC7941PL_1-miR4392.

[106] En vista de lo anterior, aquellos con experiencia en el arte deben apreciar que cambios se pueden realizar en los aspectos específicos que se revelan y aún obtener un resultado parecido o similar sin apartarse del espíritu o alcance de la invención. Por lo tanto, detalles específicos y funcionales revelados en la presente no deben ser interpretados como limitantes. Se debe entender que la revelación completa de cada referencia enumerada en la presente se incorpora dentro de la revelación de esta solicitud.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Descubrimiento, clonación, y expresión de TIC7941

[107] Una secuencia que codifica una proteína pesticida novedosa *Paenibacillus lentimorbus* se identificó, clonó, confirmó secuencia, y evaluó en bioensayo de insectos. La proteína pesticida, TIC7941 aislada de la especie *Paenibacillus lentimorbus* DSC020651, representa una proteína de tipo Vip3C novedosa. Secuencias relacionadas lejanas a TIC7941 son Vip3Ca1 (a 72,43% identidad, la relacionada más conocida), Vip3Aa1 (64,45% identidad), y una proteína de tipo Vip3B (59% identidad).

[108] Una copia de longitud completa de la región codificante para TIC7941 y una versión con rótulo His de TIC7941 (TIC7941_His) fueron sintetizadas mediante métodos mediante métodos conocidos en el arte y comprenden los codones de inicio de traducción y terminación de cada secuencia codificante. La secuencia codificante TIC7941 se clonó usando métodos conocidos en el arte dentro de un vector de expresión *Bt* en enlace operativo con un promotor expresable *Bt*. El vector de expresión *Bt* comprendía un promotor que está en funcionamiento durante la etapa de esporulación del bacillus. Además, la secuencia codificante TIC7941_His

se clonó dentro de un vector usado para expresión de proteína en *Escherichia coli* (*E. coli*). Para aislación de las proteínas expresadas *E. coli*, una etiqueta Histidina se unió operativamente a las secuencias codificantes expresadas para facilitar purificación en columna de la proteína. Las secuencias codificantes y sus secuencias de proteína respectivas usadas para expresión bacteriana se presentan en Tabla 2.

Tabla 2. Secuencias codificantes de toxina y secuencias de proteína correspondientes usadas para expresión en *Bt* y *E. coli*.

Toxina	Secuencia de Codificación de ADN SEQ ID NO:	Proteína SEQ ID NO:	Huésped de Expresión Bacteriana
TIC7941	1	2	<i>Bt</i>
TIC7941_His	5	6	<i>E. coli</i>

Ejemplo 2

TIC7941 demuestra actividad *Lepidóptera* en bioensayos de insectos

[109] La proteína pesticida TIC7941 se expresó en *Bt* y *E. coli* y se ensayó para toxicidad a varias especies de *Lepidóptera*, *Coleoptera*, *Hemiptera*, y *Dipteran*. Preparaciones de TIC7941 y TIC7941_His a partir de tanto *Bt* como *E. coli*, fueron ensayados contra la especie *Lepidóptera* de gusano cortador negro (BCW por sus siglas en inglés, *Agrotis ipsilon*), gusano elotero de maíz (CEW por sus siglas en inglés, también conocido como gusano de la soja (SPW, por sus siglas en inglés), *Helicoverpa zea*), barrenador del maíz europeo (ECB por sus siglas en inglés, *Ostrinia nubilalis*), gusano militar tardío (FAW por sus siglas en inglés, *Spodoptera frugiperda*), gusano militar del sur (SAW por sus siglas en inglés, *Spodoptera eridania*), falso medidor de la soja (SBL por sus siglas en inglés, *Chrysodeixis includens*), barrenador del maíz sud-occidental (SWCB por sus siglas en inglés, *Diatraea grandiosella*), gusano del capullo del tabaco (TBW por sus siglas en inglés, *Heliothis virescens*), y oruga de las leguminosas (VBW por sus siglas en inglés, *Anticarsia gemmatilis*); la especie *Coleopteran* de escarabajo de la patata de Colorado (CPB por sus siglas en inglés, *Leptinotarsa decemlineata*), y gusano occidental de la raíz de maíz (WCB por sus siglas en inglés, *Diabrotica virgifera virgifera*); y la especie *Hemipteran* chinche opaca de las plantas (TPB por sus siglas en inglés, *Lygus*

lineolaris) y chinche opaca occidental de las plantas (WTP por sus siglas en inglés, *Lygus hesperus*) y la especie *Dipteran* Mosquito de Fiebre Amarilla (YFM por sus siglas en inglés, *Aedes aegypti*).

[110] Para producir TIC7941 en huéspedes *Bt*, una cepa *Bt* que expresa TIC7941 se dejó
5 crecer durante veinticuatro (24) horas y luego el cultivo se agregó a dieta de insectos. Se
evaluaron mortalidad y atrofiamiento comparando el crecimiento y desarrollo de insectos sobre
una dieta con un cultivo a partir de la cepa *Bt* que expresa TIC7941 a insectos sobre una dieta
con un cultivo control sin tratar.

[111] La cepa *E. coli* que expresa TIC7941_His se trató de un modo similar a la cepa *Bt* y se
10 proporcionó en una dieta de insectos después de purificación de proteína y se comparó con el
crecimiento y desarrollo de insectos sobre una dieta con un cultivo control sin tratar. TIC7941
demostró actividad pesticida contra la especie de plaga de insecto *Lepidóptera* gusano cortador
negro, gusano elotero de maíz, barrenador de maíz europeo, gusano militar del sur, falso
medidor de la soja y barrenador de maíz sud-occidental. Actividad fue particularmente alta
15 contra falso medidor de la soja.

Ejemplo 3

Ensayo de actividad TIC7941PL_1 contra plaga *Lepidóptera* en plantas de maíz transformadas establemente

[112] Un vector de transformación de planta binario que comprende un casete de transgen
20 diseñado para expresar proteína pesticida TIC7941PL_1 no fijada como objetivo se clonó
usando métodos conocidos en el arte. El vector resultante se usó para transformar establemente
plantas de maíz. Tejidos fueron cosechados a partir de los transformantes y se usaron en
25 bioensayos de insectos contra varias plagas de insectos *Lepidóptera*.

[113] Una secuencia codificante sintética se construyó para usar en expresión de la TIC7941
en plantas, se clonó en un vector de transformación de plantas binario, y se usó para transformar
células de plantas de maíz. La secuencia sintética se sintetizó, de acuerdo con métodos
generalmente descriptos en Patente de los Estados Unidos 5.500.365, para evitar ciertas
30 secuencias de problema hostil tal como secuencias de poliadenilación de plantas ATTTA y A/T
ricas mientras conserva la secuencia de aminoácidos de la proteína nativa *Paenibacillus*. La
secuencia codificante sintética (SEQ ID NO:3) codifica una proteína TIC7941PL_1 (SEQ ID
NO:4) que comprende un residuo alanina adicional inmediatamente después de la metionina
de inicio en relación con la proteína TIC7941. El vector de transformación de planta resultante
35 comprendió in primer casete de transgen para expresión de la proteína pesticida TIC7941PL_1

que comprendía un promotor constitutivo, operativamente unido 5' a un conductor, operativamente unido 5' a un intron, operativamente unido 5' a la secuencia codificante sintética que codifica una proteína TIC7941PL_1 no fijada como objetivo (SEQ ID NO:4), que fue a su vez operativamente unida 5' a un 3' UTR; y un segundo casete transgen para la selección de células de plantas transformadas usando selección de glifosato.

[114] Células de plantas de maíz fueron transformadas con el vector de transformación binario según se describe con anterioridad usando un método de transformación intermediado por *Agrobacterium*. Las células transformadas fueron inducidas para formar plantas mediante métodos conocidos en el arte. Bioensayos usando discos de hoja de planta fueron realizados análogos a aquellos descritos en Patente de los Estados Unidos No. 8.344.207. Una única larva neonata incubada fresca de menos de un día se colocó sobre cada muestra de disco de hoja y se dejó alimentar durante aproximadamente cuatro días. Una planta de maíz no transformada se usó para obtener tejido para ser usado como un control negativo. Múltiples eventos de inserción de copia simple R₀ de transformación de cada vector binario fueron evaluados contra BCW, CEW, FAW, y SWCB.

[115] Doce eventos R₀ transformados fueron evaluados usando discos de hoja de planta. Calificaciones de daño de hoja (LDR, por sus siglas en inglés) de uno, tres, o cuatro se dio para cada evento para cada plaga de insecto ensayada. Una calificación LDR de uno (1) es equivalente a menos de o igual a treinta por ciento de daño. Una LDR de tres (3) es equivalente a treinta por ciento a menos de o igual a cincuenta por ciento de daño. Una LDR de cuatro (4) es equivalente a mayor de cincuenta por ciento de daño. Los puntajes LDR para cada evento y cada especie de plaga de insecto se presenta en Tabla 3.

Tabla 3. Calificación de daño de hoja (LDR) para eventos R₀ de maíz transformado que expresan TIC7941PL_1.

Evento	Calificaciones R ₀ Daño de Hoja			
	BCW	CEW	FAW	SWCB
Evento 1	1	1	4	3
Evento 2	1	1	4	1
Evento 3	4	4	4	4
Evento 4	4	4	4	4
Evento 5	1	1	4	3
Evento 6	1	1	4	1
Evento 7	4	4	4	4
Evento 8	4	4	4	4
Evento 9	1	1	4	4
Evento 10	4	4	4	4
Evento 11	1	1	4	3

Calificaciones R ₀ Daño de Hoja				
Evento	BCW	CEW	FAW	SWCB
Evento 12	1	1	4	1

[116] Como se puede observar en Tabla 3, siete de los doce eventos R₀ transformados ensayados demostraron resistencia a BCW y CEW. Tres de los siete eventos también demostraron resistencia a SWCB.

- 5 [117] Eventos uno al seis fueron seleccionados para ensayo en la generación F₁. Tabla 4 muestra los puntajes LDR para cada uno de los seis eventos ensayados contra las cuatro especies de plaga de insectos.

10 **Tabla 4. Calificación de daño de hoja (LDR) para eventos F₁ de maíz transformado que expresan TIC7941PL_1.**

Calificaciones F ₁ Daño de Hoja				
Evento	BCW	CEW	FAW	SWCB
Evento 1	1	1	4	1
Evento 2	1	3	4	1
Evento 3	1	1	4	3
Evento 4	1	1	4	3
Evento 5	1	1	4	3
Evento 6	1	1	4	3

- [118] Como se puede observar en Tabla 4, todos los seis eventos demostraron resistencia contra BCW, cinco de los seis eventos demostraron resistencia contra CEW, y dos de los seis eventos demostraron resistencia SWCB. Plantas de maíz establemente transformadas con un casete de transgen para la expresión de TIC7941 demostraron resistencia a especie de plaga *Lepidóptera* tal como BCW, CEW, y SWCB.
- 15

Ejemplo 4

Ensayo de actividad TIC7941PL_1 contra plagas *Lepidóptera* en plantas de soja establemente transformadas

20

[119] Vectores de transformación de planta binarios que comprenden casetes de transgen diseñados para expresar proteína pesticida TIC7941PL_1 no fijada como objetivo fueron clonados usando métodos conocidos en el arte. Los vectores resultantes fueron usados para

transformar establemente plantas de soja. Tejidos fueron cosechados a partir de los transformantes y se usó en bioensayos de insectos contra varias plagas de insectos *Lepidóptera*.

[120] La secuencia codificante TIC7941PL_1 sintética diseñada para expresión de planta según se describió en Ejemplo 3 se clonó en vectores de transformación de planta binarios, y

5 se usó para transformar células de planta de soja. Los vectores binarios que comprenden una secuencia codificante TIC7941PL_1 no fijada como objetivo fueron contruidos usando métodos conocidos en el arte. Los vectores de transformación de planta resultantes comprendían un primer casete de transgen para expresión de la proteína pesticida TIC7941PL_1 que comprendía un promotor expresable de planta, operativamente unido 5' a

10 un conductor, operativamente unido 5' a una secuencia codificante sintética que codifica una proteína TIC7941PL_1 no fijada como objetivo (SEQ ID NO:4), que fue a su vez operativamente unida 5' a un 3' UTR y; y un segundo casete de transgen para la selección de células de plantas transformadas usando selección de espectinomicina. Cuatro (4) vectores de transformación binarios fueron contruidos según se describió con anterioridad. Cada
15 constructo comprendía una casete de expresión TIC7941PL_1 que comprende promotores diferentes y 3' UTRs.

[121] Las células de soja transformadas fueron inducidas para formar plantas mediante métodos conocidos en el arte. Bioensayos usando discos de hoja de planta fueron realizados análogos a aquellos descritos en Patente de los Estados Unidos No. 8.344.207. Una planta de
20 soja no transformada se usó para obtener tejido a ser usado como un control negativo. Múltiples eventos de transformación de cada vector binario fueron evaluados contra SAW, SBL, SPW, y VBW.

[122] Eventos R₀, provenientes de transformaciones usando los cuatro constructos binarios diferentes, fueron evaluados usando discos de hoja de planta. Una calificación de daño de la
25 hoja (LDR) de uno a cuatro se dio para cada evento para cada especie de plaga de insecto ensayada. Una LDR de uno (1) es equivalente a menos de o igual a veinte por ciento de daño. Una LDR de dos (2) es equivalente a veinte por ciento a menos de o igual a treinta y cinco por ciento de daño. Una LDR de tres (3) es equivalente a treinta y cinco por ciento a menos de o
30 igual a setenta por ciento de daño. Una LDR de cuatro (4) es equivalente a mayor de setenta por ciento de daño. Los puntajes LDR para cada constructo y cada especie de plaga de insecto se presenta en Tabla 5. El número de eventos que demuestra el puntaje LDR (observado) en relación con el número de eventos ensayados también es provisto. Alta penetrancia de los rasgos de resistencia se define como un puntaje LDR de uno (1) donde mayor de cincuenta por ciento (50%) de los eventos demostraron una LDR de uno (1).

Tabla 5. Calificaciones de daño de hoja (LDR) y penetrancia para eventos R₀ de soja transformada que expresan TIC7941PL_1.

Constructo	LDR (Observada/Ensayada)			
	SAW	SBL	SPW	VBC
Constructo 1	1 (12/14)	1 (13/14)	1 (12/14)	2 (1/13)
Constructo 2	1 (14/14)	1 (14/14)	1 (13/14)	3 (9/14)
Constructo 3	1 (12/12)	1 (12/12)	1 (12/12)	3 (5/12)
Constructo 4	1 (12/15)	1 (15/15)	1 (12/15)	3 (10/15)

[123] Como se puede observar en Tabla 5, eventos de soja R₀ que expresan TIC7941PL_1 transformada con cada uno de los cuatro (4) constructos demostraron alta resistencia con alta penetrancia a SAW, SBL, y SPW. Plantas de soja transformadas establemente que expresan TIC7941PL_1 demostraron resistencia a especie de plaga *Lepidóptera*, y es sumamente eficaz contra SAW, SBL, y SPW.

Ejemplo 5

Ensayo de actividad TIC7941PL_1 contra plagas *Lepidóptera* en plantas de algodón transformadas establemente

[124] Vectores de transformación de planta binarios que comprenden casetes de transgen diseñados para expresar tanto plástido objetivo y proteína pesticida TIC7941PL_1 no fijada como objetivo son clonados usando métodos conocidos en el arte. Los vectores resultantes se usan para transformar establemente plantas de algodón. Tejidos fueron cosechados a partir de los transformantes y se usaron en bioensayos de insectos contra varias plagas de insectos *Lepidóptera*.

[125] La secuencia codificante sintética diseñada para expresión de planta según se describió en Ejemplo 3 se clonó en vectores de transformación de planta binarios, y se usó para transformar células de planta de algodón. Vectores binarios que comprenden plástido objetivo u secuencias codificantes TIC7941PL_1 no fijadas como objetivo son construidos usando métodos conocidos en el arte. Los vectores de transformación de planta resultantes comprendían un primer casete de transgen para expresión de la proteína pesticida TIC7941PL_1 que comprendía un promotor constitutivo, operativamente unido 5' a un conductor, operativamente unido 5' a una secuencia codificante sintética que codifica un

plástido objetivo o proteína TIC7941PL_1 no fijada como objetivo, que es a su vez operativamente unida 5' a un 3' UTR y; un segundo casete de transgen para la selección de células de plantas transformadas usando selección de espectinomicina.

[126] Las células de algodón transformadas son inducidas para formar plantas mediante métodos conocidos en el arte. Bioensayos usando discos de hoja de planta son realizados análogos a aquellos descritos en Patente de los Estados Unidos No. 8.344.207. Una planta de algodón no transformada se usó para obtener tejido a ser usado como un control negativo. Múltiples eventos de transformación de cada vector binario son evaluados contra CBW, FAW, SBL, y TBW, así como también cualquier otra especie de plaga de insectos *Lepidoptera* conocida por producir daño agronómico a cultivos de algodón.

[127] Además de discos de hoja, otros tejidos pueden también ser usados para evaluar resistencia impartida por expresión de proteína de toxina TIC7941PL_1 en plantas de algodón transgénicas, tal como soportes y bagas. Puntajes de calificación de daño se aplican a cada muestra que corresponde a cada plaga de insecto y se compara con controles negativos para determinar si expresión de TIC7941PL_1 proporciona resistencia a una especie de plaga de insecto particular.

Ejemplo 6

Mejorando la actividad pesticida de TIC7941 contra gusano militar tardío

[128] Este ejemplo ilustra la mejora de la actividad pesticida de TIC7941 contra gusano militar tardío mediante inserción de un péptido de unión al transportador ABC de transmembrana FAW (ABCc4) en la secuencia de proteína TIC7941.

[129] El fragmento péptido FAWPEPBIN (presentado como SEQ ID NO:17) se une al transportador ABC de transmembrana FAW ABCc4. FAWPEPBIN_Bac (SEQ ID NO:15) es una secuencia codificante sintética que codifica FAWPEPBIN (SEQ ID NO:17) para expresión del péptido FAWPEPBIN en bacteria.

[130] Proteínas TIC7941 diseñadas con rótulo Hi con el péptido FAWPEPBIN insertado dentro de posiciones diferentes en el domino 2 bucle de la proteína fueron comparadas en bioensayos de insectos. La secuencia codificante TIC7941_2His (SEQ ID NO:7) codifica la proteína pesticida TIC7941_2His (SEQ ID NO:8). La secuencia codificante TIC7941_3His (SEQ ID NO:9) codifica la proteína pesticida TIC7941_3His (SEQ ID NO:10). La secuencia codificante FAWPEPBIN_Bac sintética se encuentra dentro de posiciones de nucleótidos 2413-2448 de TIC7941_2His y dentro de posiciones 2410-2445 de TIC7941_3His. La

secuencia péptido FAWPEPBIN está ubicada en posiciones de aminoácidos 805 a 816 de TIC7941_2His y posiciones de aminoácidos 804 a 815 de TIC7941_3His.

[131] La actividad pesticida de las proteínas pesticidas TIC7941_His, TIC7941_2His, y TIC7941_3His fueron ensayadas contra FAW. Tanto TIC7941_His como TIC7941_2His demostraron poco o sin actividad contra FAW. Sin embargo, TIC7941_3His demostró actividad pesticida mejorada contra FAW. Por lo tanto, inserción de la secuencia codificante sintética FAWPEPBIN_Bac en las posiciones de aminoácidos 804-815 de TIC7941_3His mejoró la actividad pesticida de la proteína TIC7941 contra FAW.

10

Ejemplo 7

Ensayo de actividad de TIC7941PL_2 y TIC7941PL_3 contra gusano militar tardío en plantas de algodón transformadas establemente

[132] Vectores de transformación de planta binarios que comprenden casetes de transgen diseñados para expresar las proteína pesticidas TIC7941PL_2 y TIC7941PL_3 se clonan usando métodos conocidos en el arte. Los vectores resultantes se usan para transformar establemente plantas de maíz. Tejidos fueron cosechados a partir de los transformantes y se usaron en bioensayos de insectos contra FAW y otras plagas de insectos *Lepidóptera*.

[133] Vectores de transformación de planta binarios son construidos según se describió previamente en Ejemplo 3. Los vectores binarios comprenden un casete de transgen usado para expresar TIC7941PL_2 o TIC7941PL_3. TIC7941PL_2 y TIC7941PL_3 comprenden el péptido de unión a receptor ABCc4 FAWPEPBIN. Una secuencia de ADN sintética (FAWPEPBIN_PL, SEQ ID NO:16) usada para expresión en una célula vegetal y que codifica el péptido de unión del transportador ABC de membrana de gusano militar tardío ABCc4 FAWPEPBIN, se inserta dentro de la proteína de toxina TIC7941PL_1. El FAWPEPBIN_PL que codifica fragmento ADN se encuentra dentro de posiciones de nucleótidos 2386-2421 de TIC7941PL_2 y dentro de 2383-2418 de TIC7941PL_3. El fragmento péptido FAWPEPBIN está ubicado en posiciones de aminoácidos 796-807 de TIC7941PL_2 y 795-806 de TIC7941PL_3.

[134] Células de planta de maíz son transformadas con los vectores de transformación binarios según se describió anteriormente usando un método de transformación intermediado por *Agrobacterium*. Las células transformadas son inducidas para formar plantas mediante métodos conocidos en el arte. Bioensayos usando discos de hoja de planta son realizados

análogos a aquellos descritos en Patente de los Estados Unidos No. 8.344,207. Una planta de maíz no transformada se usó para obtener tejido a ser usado como un control negativo. Múltiples eventos de inserción de copia simple R₀ de transformación de cada vector binario son evaluados contra FAW y comparados a TIC7941PL_1 para determinar si inserción del péptido FAWPEPBIN aumenta la actividad insecticida de TIC7941PL_1 contra FAW.

Ejemplo 8

Reducción de expresión TIC7941PL_1 en el tejido reproductivo de plantas de soja transformadas establemente mediante el uso de sitios objetivo miARN

[135] Este ejemplo ilustra la reducción de expresión de TIC7941PL_1 en los tejidos reproductivos de plantas de soja transformadas establemente mediante el uso de sitios de reconocimiento miARN operativamente unidos.

[136] miARNs de plantas regulan genes objetivo en el nivel post-transcripcional mediante dos mecanismos principales: escisión de transcripto y represión de traducción. Además, algunos miARNs también activan la producción de ARN de interferencia pequeños secundarios (ARNip) de sus transcriptos, amplificando el efecto de los miARN sobre expresión. miARNs tiene generalmente veintiún (21) nucleótidos de largo, pero aquellos que activan la producción de ARNip secundarios, tienen veintidós (22) nucleótidos de largo. Mediante procesamiento de datos de miARNs en varios tejidos en soja, dos miARNs fueron identificados que fueron sobre-representados en tejidos reproductivos cuando se compararon con tejidos vegetativos; miR395 y miR4392. miR395 se procesa dentro de un miARN/miARN* dúplex de veintiún (21) nucleótidos y se expresa mayormente en el estambre de flor de soja. miR4392 se procesa dentro de miARN/miARN* dúplex de veintidós (22) nucleótidos y activa la producción de siARNs secundarios de sus transcriptos, amplificando la señal de supresión. miR4392 es sumamente enriquecida en las anteras de flor de soja. Unida con una proteína ARGO para formar un complejo de silenciamiento, miARNs funciona como guías de secuencia específica, dirigiendo el complejo de silenciamiento a transcriptos mediante apareamiento base entre el miARN y los sitios de unión objetivo miARN dentro de región no traducida 3' (3' UTR) de los ARNs objetivo.

[137] Sitios objetivo que corresponden a miR395 (Gm.miR395_1 (SEQ ID NO:18) y Gm.miR395_2 (SEQ ID NO:19)) fueron operativamente unidos usando el espaciador de ADN (SP-ART.8a-1, SEQ ID NO:24) para constucto SUP-miR395 (SEQ ID NO:20). Sitios objetivo que corresponden a miR4392 (Gm.miR4392_1 (SEQ ID NO:21) y Gm.miR4392_2 (SEQ ID

NO:22)) fueron unidos operativamente usando el espaciador de ADN (SP-ART.8a-1, SEQ ID NO:24) para constructo SUP-miR4392 (SEQ ID NO:23). SUP-miR395 y SUP-miR4392 fueron unidos operativamente a la secuencia codificante TIC7941PL_1 3' después del codón de terminación produciendo los transgenes, TIC7941PL_1-miR395 (SEQ ID NO:25) y
5 TIC7941PL_1-miR4392 (SEQ ID NO:26), respectivamente.

[138] Vectores de transformación de planta binarios que comprenden casetes de transgen diseñados para expresar TIC7941PL_1-miR395 no fijada como objetivo y TIC7941PL_1-miR4392 fueron contruidos usando métodos conocidos en el arte y fueron similares a aquellos descritos en Ejemplo 4. Dos constructos fueron contruidos usando el mismo promotor,
10 conductor y 3' elemento UTR que Constructo 3 en Ejemplo 4 y comprendía las secuencias de ADN TIC7941PL_1-miR395 y TIC7941PL_1-miR4392. Múltiples eventos de transformación de cada vector binario fueron evaluados usando discos de hoja contra SAW, SBL, SPW, y VBW según se describe en Ejemplo 4. Constructo 3, TIC7941PL_1, sirvió como un control para comparación de actividad insecticida de los constructos que comprenden TIC7941PL_1-
15 miR395 no fijada como objetivo y TIC7941PL_1-miR4392

Tabla 6. Calificaciones de daño de hoja (LDR) y penetrancia para eventos R₀ de soja transformada que expresan TIC7941PL_1.

		LDR (Observada/Ensayada)			
Constructo	Composición TIC7941	SAW	SBL	SPW	VBC
Constructo 3	TIC7941PL_1	1 (12/12)	1 (12/12)	1 (12/12)	3 (5/12)
Constructo 5	TIC7941PL_1-mi395	1 (20/20)	1 (20/20)	1 (20/20)	3 (9/20)
Constructo 6	TIC7941PL_1-mi4392	1 (17/19)	1 (17/19)	1 (16/19)	3 (3/19)

[139] Como se puede observar en Tabla 6, uniendo operativamente sitios de unión objetivo miARN a la secuencia codificante TIC7941PL_1 no afectó la actividad insecticida de TIC7941PL_1. Los dos constructos de sitio de unión objetivo miARN demostraron el mismo nivel de actividad insecticida contra SAW, SBL, SPW, y VBC. Como se observó previamente en Ejemplo 4, TIC7941PL_1 demostró alta resistencia con alta penetrancia contra SAW, SBL, y SPW.

[140] Todas las composiciones reveladas y reivindicadas en la presente pueden ser realizadas y practicadas sin experimentación indebida en virtud de la presente revelación. Mientras las composiciones de esta invención han sido descritas en términos de las anteriores realizaciones ilustrativas, se tornará evidente por parte de aquellas personas con experiencia en el arte que variaciones, cambios, modificaciones, y alteraciones pueden aplicarse a la composición que se describe en la presente, sin apartarse del concepto real, espíritu, y alcance de la invención. Más específicamente, se tornará evidente que ciertos agentes que son tanto química y fisiológicamente relacionados pueden ser sustituidos por los agentes descritos en la presente a la vez que se logrará el mismo resultados o resultados similares. Todos dichos sustitutos similares y modificaciones evidentes para aquellos con experiencia en el arte se consideran se encuentran dentro del espíritu, alcance y concepto de la invención según se define mediante las reivindicaciones que se anexan.

[141] Todas las publicaciones y documentos de patentes publicados enumerados en la memoria descriptiva se incorporan a la presente a modo de referencia con el mismo alcance que el de cada publicación o solicitud de patente individual fue específica e individualmente indicada para ser incorporada a modo de referencia.