

"PROTEÍNAS INSECTICIDAS QUIMÉRICAS TRUNCADAS".

CAMPO DE LA INVENCION

[001] La invención se refiere, en general, al campo de las proteínas inhibidoras de insectos útiles en agricultura. La presente solicitud de patente enseña una nueva clase de proteínas insecticidas quiméricas que exhiben actividad inhibidora contra plagas de insectos agrícolamente relevantes de plantas y semillas cultivadas. En particular, la presente solicitud de patente enseña una clase de proteínas con actividad insecticida contra el orden Lepidoptera de plagas de insectos. También se enseñan plantas, partes de plantas y semillas que contienen una molécula de ácido nucleico recombinante que codifica una o más de las proteínas insecticidas.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[002] Existe una necesidad creciente de mejorar la productividad de cultivos vegetales de importancia agrícola, incluidos, entre otros, algodón, soja, maíz, caña de azúcar, arroz y trigo. Además de la creciente demanda de productos agrícolas para alimentar, vestir y proporcionar energía a una población humana en aumento, los efectos relacionados con el clima y la creciente presión demográfica para utilizar la tierra para fines distintos de las prácticas agrícolas tienden a reducir la cantidad de tierra disponible para la agricultura. Estos efectos generan una mayor demanda de productividad y eficiencia de los cultivos agrícolas. En vista de la creciente demanda, las técnicas de manejo y control de plagas agrícolas son herramientas vitales para aumentar la producción por unidad de tierra disponible para la agricultura.

[003] Los insectos, particularmente los insectos del orden Lepidoptera, son una de las principales causas de daños a los cultivos agrícolas, reduciendo el rendimiento de los cultivos infestados. Las especies de plagas de Lepidópteros que impactan negativamente en la

agricultura incluyen, por ejemplo, *Agrotis ipsilon*, *Agrotis subterranea*, *Agrotis orthogonia*, *Alabama argillacea*, *Anticarsia gemmatalis*, *Amyelois transitella*, *Archips argyrospila*, *Archips rosana*, *Chilo suppressalis*, *Chrysodeixis includens*, *Cnaphalocrocis medinalis*, *Crambus caliginosellus*, *Crambus teterrellus*, *Cydia pomonella*, *Diatraea saccharalis*, *Diatraea grandiosella*, *Earias vitela*, *Earias insulana*, *Earias vittella*, *Elasmopalpus lignosellus*, *Endopiza viteana*, *Grapholita molesta*, *Helicoverpa armigera*, *Helicoverpa gelotopen*, *Helicoverpa zea*, *Heliothis virescens*, *Herpetogramma licarsisalis*, *Homoeosoma electellum*, *Hypena scabra*, *Lobesia botrana*, *Lymantria dispar*, *Mamestra configurata*, *Ostrinia nubilalis*, *Pectinophora gossypiella*, *Pieris brassicae*, *Pieris rapae*, *Phyllocnistis citrella*, *Plutella xylostella*, *Pseudaletia unipuncta*, *Rachiplusia nu*, *Sesamia inferens*, *Spodoptera cosmioides*, *Spodoptera exigua*, *Spodoptera eridania*, *Spodoptera frugiperda*, *Spodoptera litura*, *Suleima helianthana*, *Trichoplusia ni*, y *Tuta absoluta*.

[004] Históricamente se han utilizado insecticidas químicos sintéticos para controlar plagas de insectos en la agricultura. Sin embargo, las preocupaciones sobre el medio ambiente y la salud humana, además de los problemas de resistencia emergentes, han estimulado la investigación y el desarrollo de pesticidas biológicos. Este esfuerzo de investigación resultó en el descubrimiento y uso progresivo de varias especies microbianas entomopatógenas, especialmente bacterias del género *Bacillus*.

[005] El paradigma de control biológico cambió cuando se reveló el potencial de las bacterias entomopatógenas, especialmente las bacterias pertenecientes al género *Bacillus*. La identificación del potencial entomopatógeno de varias cepas de bacterias *Bacillus*, especialmente *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), ha representado un gran avance en las técnicas de control de plagas de insectos. En diversas

cepas de bacterias *Bt* se ha identificado una amplia familia de proteínas con alta toxicidad contra insectos específicos. Entre otras, se han identificado delta-endotoxinas que se localizan dentro de cuerpos de inclusión cristalinos parasporales en el establecimiento de la esporulación y durante la fase de crecimiento estacionario (p. ej., proteínas Cry), así como proteínas insecticidas secretadas. Las proteínas insecticidas *Bt* ejercen sus efectos en la superficie del epitelio del intestino medio de los insectos después de la ingestión, alterando la membrana celular, lo que provoca la ruptura y muerte de la célula.

[006] Las proteínas insecticidas secretadas y cristalinas de *Bt* son altamente específicas para sus huéspedes y han sido mundialmente reconocidas y aceptadas como alternativas importantes a los insecticidas químicos. Por ejemplo, las proteínas insecticidas se utilizan en diversos cultivos agrícolas para proteger las plantas contra las infestaciones de insectos, reducir la necesidad de la aplicación de pesticidas químicos y aumentar la productividad. Las proteínas insecticidas *Bt* se usan para controlar plagas de plantas de cultivo relevantes desde el punto de vista agrícola aplicando composiciones agrícolas microbianas a las plantas y usando técnicas de transformación genética para obtener plantas y semillas transgénicas que expresen la proteína insecticida.

[007] El uso global de cultivos de plantas transgénicas resistentes a insectos y el número limitado de proteínas insecticidas utilizadas en estos cultivos han creado una presión de selección para alelos de resistencia de insectos a proteínas insecticidas utilizadas actualmente.

[008] El desarrollo de resistencia a proteínas insecticidas en plagas diana genera una demanda continua para la identificación y desarrollo de nuevas proteínas que controlen estas poblaciones de insectos resistentes. Nuevas proteínas insecticidas con eficacia mejorada y que presentan un espectro alternativo de actividad de especies de insectos

son importantes en el control de insectos resistentes. Además, el uso de dos o más proteínas insecticidas en la misma planta transgénica con diferentes modos de acción para la misma plaga de insectos reduce la probabilidad de resistencia en cualquier especie de insecto objetivo.

[009] En consecuencia, existe una demanda constante para la identificación de nuevas proteínas con propiedades insecticidas mejoradas, tales como eficacia, actividad contra más de una especie de plagas de insectos y diferentes modos de acción en comparación con las toxinas utilizadas actualmente en las prácticas agrícolas.

[0010] Para satisfacer esta demanda, la presente invención describe nuevas proteínas insecticidas quiméricas Cry que exhiben actividad contra especies importantes de plagas de insectos.

[0011] Crickmore, N., et al., 1998 propuso originalmente un sistema para denominar las proteínas Cry por similitud de aminoácidos. Revisión de la nomenclatura de las proteínas cristalinas pesticidas de *Bacillus thuringiensis*. Microbiol. Mol.Biol. Rev. 62, 807–813) y actualizado por Crickmore, N., et al., 2021. Una nomenclatura basada en la estructura para *Bacillus thuringiensis* y otras proteínas pesticidas derivadas de bacterias. *Journal of Invertebrate Pathology* Vol. 186, (107438).

[0012] En la clasificación más reciente, la clase de proteínas Cry representa proteínas originalmente aisladas de cristales de *B. thuringiensis* cuya forma precursora consta de dos mitades de tamaños cercanos: una porción activa amino-terminal subdividida en tres dominios basándose en la alineación de secuencia conservada o sustancialmente conservado y una porción carboxi-terminal que se sabe que estabiliza la formación de cristales y no exhibe actividad insecticida. El dominio I de la porción activa amino terminal comprende aproximadamente el primer tercio del segmento de toxina activa y se ha demostrado que es esencial para la formación de canales. Los dominios II y III de la porción activa amino-terminal han sido implicados en la unión

al receptor y en la especificidad de las especies de insectos, dependiendo del insecto y de la proteína insecticida que se esté examinando.

[0013] La probabilidad de crear arbitrariamente una proteína quimérica con propiedades mejoradas a partir de la variedad de estructuras de dominio de las numerosas proteínas insecticidas nativas conocidas en la técnica es remota. Esto es el resultado de la naturaleza compleja e impredecible de la estructura, oligomerización y activación de la proteína (incluido el procesamiento proteolítico correcto del precursor quimérico, si se expresa de tal manera) requerida para liberar un segmento de proteína insecticida. La creación de toxinas insecticidas quiméricas funcionales con actividad insecticida mejorada en comparación con las proteínas originales de las que se derivan las quimeras implica una selección cuidadosa de las subunidades y dominios y objetivos específicos dentro de cada proteína original.

[0014] Se sabe en la técnica que el reensamblaje de los dominios I, II y III de dos o más toxinas cualesquiera que sean diferentes entre sí a menudo da como resultado la construcción de proteínas que exhiben la formación de cristales con ausencia total de cualquier insecticida. actividad, detección dirigida a una especie de plaga de insecto objetivo preferida. Sólo mediante prueba y error se diseñan quimeras insecticidas eficaces, e incluso entonces, el experto en la técnica no puede garantizar que obtendrá una quimera que presente una actividad insecticida equivalente o mejorada en comparación con una proteína de toxina original única de la que se forma el constituyente. Es posible que se hayan derivado protoxina o dominios de toxina de la quimera. Por ejemplo, la literatura informa numerosos ejemplos de construcción o ensamblaje de proteínas quiméricas a partir de dos o más precursores de proteínas cristalinas. Véase, por ejemplo, Jacqueline S. Knight, *et al.* "A Strategy for Shuffling Numerous *Bacillus thuringiensis* Crystal Protein

Domains". *J. Economic Entomology*, 97 (6) (2004): páginas 1805 a 1813; Patente de EE.UU. 6.204.246; Patente de EE.UU. 6.017.534; y la patente estadounidense 10.233.217. En cada uno de estos ejemplos, muchas de las quimeras resultantes no exhibieron propiedades insecticidas o formadoras de cristales que fueran equivalentes o mejoradas en comparación con las proteínas precursoras de las que se derivaron los componentes de la quimera.

SUMARIO DE LA INVENCION

[0015] La presente invención proporciona nuevas proteínas Cry quiméricas truncadas, formadas a partir de la recombinación de los dominios I, II y III de la porción activa amino-terminal de las proteínas Cry *Bt* parentales Cry1Ab, Cry1B, Cry1C, Cry1Da, Cry1E, Cry1Fb y Cry2Aa en la ausencia de un dominio de protoxina carboxi-terminal. Las proteínas quiméricas truncadas de la presente invención exhiben actividad inhibidora y tóxica contra plagas de insectos de cultivos del orden Lepidoptera. También son objetos de la presente invención moléculas de ácido nucleico que codifican dichas proteínas quiméricas truncadas, casetes de expresión, células vegetales, plantas, partes de plantas y semillas que contienen una molécula de ácido nucleico recombinante que codifica una o más de las proteínas quiméricas truncadas.

[0016] Cada una de las proteínas insecticidas quiméricas truncadas se puede usar sola o en combinación con otras proteínas insecticidas y agentes inhibidores de insectos en formulaciones y para expresión en plantas. De esta manera, se proporcionan alternativas a las proteínas insecticidas y a los insecticidas químicos utilizados en los sistemas agrícolas.

[0017] En ciertas realizaciones descritas en el presente documento, una proteína insecticida quimérica truncada comprende (i) un Dominio I de la proteína Cry de cualquiera de SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 102,

SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 111 , SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 119 o SEQ ID NO: 123; (ii) un Dominio II de la proteína Cry de cualquiera de SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 116, SEQ ID NO: 120 o SEQ ID NO : 124; y (iii) un Dominio III de la proteína Cry de cualquiera de SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 121 o SEQ ID NO: 125 y carece de un dominio de protoxina carboxi-terminal.

[0018] En realizaciones preferidas, una proteína insecticida quimérica truncada comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en cualquiera de las SEQ ID NOs: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47 o 48, y carece de un dominio de protoxina carboxi-terminal.

[0019] Las proteínas insecticidas quiméricas exhiben actividad inhibidora contra una especie de insecto del orden Lepidopteras tales como, pero sin limitación, *Agrotis ipsilon*, *Agrotis subterranea*, *Agrotis orthogonia*, *Alabama argillacea*, *Anticarsia gemmatalis*, *Amyelois transitella*, *Archips argyrospila*, *Archips rosana*, *Chilo suppressalis*, *Chrysodeixis includens*, *Cnaphalocrocis medinalis*, *Crambus caliginosellus*, *Crambus teterrellus*, *Cydia pomonella*, *Diatraea saccharalis*, *Diatraea grandiosella*, *Earias vitela*, *Earias insulana*, *Earias vittella*, *Elasmopalpus lignosellus*, *Endopiza viteana*, *Grapholita molesta*, *Helicoverpa armigera*, *Helicoverpa gelotopon*, *Helicoverpa zea*, *Heliothis virescens*, *Herpetogramma licarsisalis*, *Homoeosoma electellum*, *Hypena scabra*, *Lobesia botrana*, *Lymantria dispar*, *Mamestra configurata*, *Ostrinia nubilalis*, *Pectinophora gossypiella*, *Pieris brassicae*, *Pieris rapae*, *Phyllocnistis citrella*, *Plutella xylostella*, *Pseudaletia unipuncta*, *Rachiplusia nu*, *Sesamia inferens*, *Spodoptera cosmioides*, *Spodoptera exigua*, *Spodoptera eridania*, *Spodoptera*

frugiperda, *Spodoptera litura*, *Suleima helianthana*, *Trichoplusia ni*, y *Tuta absoluta*.

[0020] En otra realización, se proporciona un polinucleótido que codifica una proteína insecticida quimérica truncada, en donde la proteína insecticida quimérica truncada comprende (i) un Dominio I de la proteína Cry de cualquiera de SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 119 o SEQ ID NO: 123; (ii) un Dominio II de la proteína Cry de cualquiera de SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 116, SEQ ID NO: 120 o SEQ ID NO : 124; y (iii) un Dominio III de la proteína Cry de cualquiera de SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 121 o SEQ ID NO: 125, en donde la proteína carece de un dominio de protoxina carboxi-terminal. En una realización preferida, la proteína quimérica insecticida comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47 o 48, en los que la secuencia de aminoácidos carece de un dominio de protoxina carboxi-terminal. También se proporciona un polinucleótido que codifica una proteína insecticida quimérica truncada, en donde el polinucleótido comprende una secuencia de nucleótidos que opcionalmente: se hibrida en condiciones estrictas con el complemento inverso de la secuencia de polinucleótidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95 o 96, en los que el polinucleótido carece de una región que codifica una protoxina carboxi-terminal dominio; o codifica la proteína insecticida quimérica truncada que comprende (i) un dominio I de la proteína Cry de cualquiera de SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 102,

SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 119 o SEQ ID NO: 123; (ii) un Dominio II de la proteína Cry de cualquiera de SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 116, SEQ ID NO: 120 o SEQ ID NO: 124; y (iii) un Dominio III de la proteína Cry de cualquiera de SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 121 o SEQ ID NO: 125, en donde la proteína carece de un dominio de protoxina carboxi-terminal. Preferiblemente, la proteína insecticida quimérica truncada comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47 o 48, en los que la secuencia de aminoácidos carece de un dominio de protoxina carboxi-terminal. En otra realización complementaria, se proporciona un casete de expresión que comprende un polinucleótido como se define anteriormente.

[0021] En otra realización, en el presente documento se proporciona una célula huésped que comprende el polinucleótido descrito anteriormente, en donde la célula huésped se selecciona del grupo que consiste en una célula huésped bacteriana o una célula huésped vegetal. Las células huésped bacterianas contempladas incluyen *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Erwinia*, en las que la especie de *Bacillus* es un *Bacillus cereus* o un *Bacillus thuringiensis*, *Brevibacillus* es preferiblemente *Brevibacillus laterosperous* y *Escherichia* es preferiblemente *Escherichia coli*. Las células vegetales contempladas incluyen monocotiledóneas y dicotiledóneas.

[0022] Otras realizaciones proporcionadas en el presente documento incluyen composiciones inhibidoras de insectos que comprenden una proteína insecticida quimérica truncada que

comprende (i) un Dominio I de la proteína Cry de cualquiera de SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 119 o SEQ ID NO: 123; (ii) un Dominio II de la proteína Cry de cualquiera de SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 116, SEQ ID NO: 120 o SEQ ID NO: 124; y (iii) un Dominio III de la proteína Cry de cualquiera de SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 121 o SEQ ID NO: 125, en donde la proteína carece de un dominio de protoxina carboxi-terminal; preferiblemente una proteína quimérica truncada que comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47 o 48, en los que la secuencia de aminoácidos carece de un dominio de protoxina carboxi-terminal. En determinadas realizaciones, la composición inhibidora de insectos comprende además al menos un agente inhibidor de insectos distinto de la proteína insecticida quimérica. Los agentes inhibidores de insectos contemplados distintos de la proteína insecticida quimérica incluyen una proteína inhibidora de insectos, una molécula de ARNbc inhibidora de insectos y un producto químico inhibidor de insectos. Estos agentes inhibidores de insectos distintos de la proteína insecticida quimérica pueden exhibir actividad contra una o más especies de plagas de los órdenes Lepidoptera, Coleoptera, Hemiptera, Homoptera o Thysanoptera.

[0023] En otra realización más descrita en el presente documento, una semilla que comprende una cantidad eficaz inhibidora de insectos de: una proteína insecticida quimérica que comprende (i) un Dominio I de la proteína Cry de cualquiera de SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 119

o SEQ ID NO: 123; (ii) un Dominio II de la proteína Cry de cualquiera de SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 116, SEQ ID NO: 120 o SEQ ID NO : 124; y (iii) un Dominio III de la proteína Cry de cualquiera de SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 121 o SEQ ID NO: 125, en donde la proteína carece de un dominio de protoxina carboxi-terminal; preferiblemente una proteína quimérica truncada que comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17. , 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42 , 43, 44, 45, 46, 47 o 48, en los que la secuencia de aminoácidos carece de un dominio de protoxina carboxi-terminal; o un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95 o 96, en los que el polinucleótido carece de una región que codifica un dominio de protoxina carboxi-terminal.

[0024] También se contemplan métodos para controlar una plaga de Lepidópteros que comprenden poner la plaga de Lepidópteros en contacto con una cantidad inhibidora de una proteína insecticida quimérica de la invención.

[0025] En otra realización, se proporciona un genoma vegetal que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína insecticida quimérica truncada según la presente invención o un casete de expresión que contiene dicha molécula de ácido nucleico.

[0026] La presente invención proporciona además una célula vegetal, planta o parte de planta transgénica que comprende una proteína insecticida quimérica o una molécula de ácido nucleico que codifica la misma, en la que: la proteína insecticida quimérica truncada

comprende (i) una proteína I de dominio Cry de cualquiera de SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 119 o SEQ ID NO: 123; (ii) un Dominio II de la proteína Cry de cualquiera de SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 116, SEQ ID NO: 120 o SEQ ID NO: 124; y un (iii) Dominio III de la proteína Cry de cualquiera de SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 121 o SEQ ID NO: 125, en donde la proteína carece de un dominio de protoxina carboxi-terminal; preferiblemente una proteína quimérica truncada que comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47 o 48, en los que la secuencia de aminoácidos carece de un dominio de protoxina carboxi-terminal.

[0027] En otra realización, se proporciona proteína insecticida quimérica que es: al menos 85% idéntica a SEQ ID NO: 1; al menos un 80% idéntico a SEQ ID NO: 2, al menos un 79% idéntico a SEQ ID NO: 3; al menos 82% idéntico a SEQ ID NO: 4; al menos 79% idéntico a SEQ ID NO: 5; al menos 87% idéntico a SEQ ID NO: 6; al menos 91% idéntico a SEQ ID NO: 7; al menos 77% idéntico a SEQ ID NO: 8; al menos 81% idéntico a SEQ ID NO: 9; al menos 82% idéntico a SEQ ID NO: 10; al menos 76% idéntico a SEQ ID NO: 11; al menos 91% idéntico a SEQ ID NO: 12; al menos 92% idéntico a SEQ ID NO: 13; al menos 86% idéntico a SEQ ID NO: 14; al menos 82% idéntico a SEQ ID NO: 15; al menos 88% idéntico a SEQ ID NO: 16; al menos 97% idéntico a SEQ ID NO: 17; al menos 81% idéntico a SEQ ID NO: 18; al menos 86% idéntico a SEQ ID NO: 19; al menos 76% idéntico a SEQ ID NO: 20; al menos 78% idéntico a SEQ ID NO: 21; al menos 78% idéntico a SEQ ID NO: 22; al menos 78% idéntico a SEQ ID NO: 23; al menos 86%

idéntico a SEQ ID NO:24; al menos 85% idéntico a SEQ ID NO: 25; al menos 83% idéntico a SEQ ID NO: 26; al menos un 83% idéntico a SEQ ID NO: 27, al menos un 85% idéntico a SEQ ID NO: 28, al menos un 79% idéntico a SEQ ID NO: 29, al menos un 85 % idéntico a SEQ ID NO: 30, al menos 80% idéntico a SEQ ID NO: 31, al menos 84% idéntico a SEQ ID NO: 33, al menos 78% idéntico a SEQ ID NO: 33, al menos 85% idéntico a SEQ ID NO: 34, al menos 80% idéntico a SEQ ID NO: 35, al menos 87% idéntico a SEQ ID NO: 36, al menos 93% idéntico a SEQ ID NO: 37, al menos 84% idéntico a SEQ ID NO: 38, al menos 81% idéntico a SEQ ID NO: 39, al menos 80% idéntica a SEQ ID NO: 40, al menos 84 % idéntica a SEQ ID NO: 41, al menos 93 % idéntica a SEQ ID NO: 42, al menos 86% idéntica a SEQ ID NO: 43, al menos 70% idéntico a SEQ ID NO: 44, al menos 75% idéntico a SEQ ID NO: 45, al menos 73% idéntico a SEQ ID NO: 46, al menos 50% idéntico a SEQ ID NO: 47, o al menos 50% idéntica a SEQ ID NO: 48, en la que la secuencia de aminoácidos carece de un dominio de protoxina carboxi-terminal. Además se proporcionan moléculas de ácido nucleico que codifican dichas proteínas, casetes de expresión, células vegetales, plantas, partes de plantas y semillas que contienen una molécula de ácido nucleico recombinante que codifica una o más de las proteínas quiméricas proporcionadas en el presente documento.

[0028] También se proporcionan métodos para controlar una plaga de Lepidópteros que comprenden exponer la plaga a una proteína quimérica truncada descrita en el presente documento, una célula vegetal, planta o parte de planta transgénica, en donde dicha célula vegetal, planta o parte de la planta expresa una proteína quimérica truncada descrita en el presente documento.

[0029] En otras realizaciones descritas en el presente documento, se proporcionan productos vegetales derivados de la célula vegetal, planta o parte de la planta, en los que el producto comprende una

cantidad detectable de la proteína insecticida quimérica. Los productos vegetales cubiertos incluyen biomasa vegetal, aceite, salvado, piensos, harina, copos, cáscaras y semillas procesadas.

[0030] Otro método descrito en el presente documento es un método para producir una semilla que comprende la proteína insecticida quimérica, comprendiendo el método: plantar al menos una semilla que comprende la proteína insecticida quimérica; cultivar plantas a partir de dicha semilla; y cosechar semillas de las plantas, comprendiendo dicha semilla cosechada la proteína insecticida quimérica.

[0031] Las moléculas de polinucleótidos recombinantes que codifican una proteína insecticida quimérica truncada comprenden una secuencia de nucleótidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95 o 96, en las que el polinucleótido carece de una región que codifica un dominio de protoxina carboxi-terminal; y, opcionalmente, también se contemplan en el presente documento una secuencia de polinucleótidos que codifica un agente inhibidor de insectos distinto de la proteína insecticida quimérica.

[0032] Otra molécula de ácido nucleico recombinante contemplada en el presente documento comprende un promotor heterólogo unido operativamente a un segmento de polinucleótido que codifica proteínas insecticidas quiméricas, en el que: la proteína insecticida quimérica truncada comprende (i) un dominio I de proteína Cry de cualquiera de SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 119 o SEQ ID NO: 123; (ii) un Dominio II de la proteína Cry de cualquiera de SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 116, SEQ ID NO: 120 o SEQ ID NO: 124; y un (iii) Dominio III de la proteína Cry de cualquiera de SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO:

109, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 121 o SEQ ID NO: 125, en donde la proteína carece de un dominio de protoxina carboxi-terminal; o la proteína insecticida quimérica truncada comprende una proteína que es: al menos un 85 % idéntica a la SEQ ID NO: 1; al menos un 80% idéntico a SEQ ID NO: 2, al menos un 79% idéntico a SEQ ID NO: 3; al menos 82% idéntico a SEQ ID NO: 4; al menos 79% idéntico a SEQ ID NO: 5; al menos 87% idéntico a SEQ ID NO: 6; al menos 91% idéntico a SEQ ID NO: 7; al menos 77% idéntico a SEQ ID NO: 8; al menos 81% idéntico a SEQ ID NO: 9; al menos 82% idéntico a SEQ ID NO: 10; al menos 76% idéntico a SEQ ID NO: 11; al menos 91% idéntico a SEQ ID NO: 12; al menos 92% idéntico a SEQ ID NO: 13; al menos 86% idéntico a SEQ ID NO: 14; al menos 82% idéntico a SEQ ID NO: 15; al menos 88% idéntico a SEQ ID NO: 16; al menos 97% idéntico a SEQ ID NO: 17; al menos 81% idéntico a SEQ ID NO: 18; al menos 86% idéntico a SEQ ID NO: 19; al menos 76% idéntico a SEQ ID NO: 20; al menos 78% idéntico a SEQ ID NO: 21; al menos 78% idéntico a SEQ ID NO: 22; al menos 78% idéntico a SEQ ID NO: 23; al menos 86% idéntico a SEQ ID NO: 24; al menos 85% idéntico a SEQ ID NO: 25; al menos 83% idéntico a SEQ ID NO: 26; al menos un 83% idéntico a SEQ ID NO: 27, al menos un 85% idéntico a SEQ ID NO: 28, al menos un 79% idéntico a SEQ ID NO: 29, al menos un 85% idéntico a SEQ ID NO: 30, al menos 80% idéntico a SEQ ID NO: 31, al menos 84% idéntico a SEQ ID NO: 33, al menos 78% idéntico a SEQ ID NO: 33, al menos 85% idéntico a SEQ ID NO: 34, al menos 80% idéntico a SEQ ID NO: 35, al menos 87% idéntico a SEQ ID NO: 36, al menos 93 % idéntico a SEQ ID NO: 37, al menos 84% idéntico a SEQ ID NO: 38, al menos 81 % idéntico a SEQ ID NO: 39, al menos 80% idéntica a SEQ ID NO: 40, al menos 84% idéntica a SEQ ID NO: 41, al menos 93% idéntica a SEQ ID NO: 42, al menos 86% idéntica a SEQ ID NO: 43, al menos 70% idéntico a SEQ ID NO: 44, al menos 75% idéntico a SEQ ID NO: 45, al

menos 73% idéntico a SEQ ID NO: 46, al menos 50% idéntico a SEQ ID NO: 47, o al menos 50% idéntico a SEQ ID NO: 48; o el segmento de polinucleótido se hibrida con un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95 o 96, en los que el polinucleótido carece de una región que codifica un dominio de protoxina carboxi-terminal.

[0033] Otras realizaciones, características y ventajas de la invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada, ejemplos y reivindicaciones.

BREVE DESCRIPCIÓN DE SECUENCIAS

[0034] SEQ ID NO: 1 es la secuencia de aminoácidos de la proteína quimérica truncada EMS_Q1.

[0035] SEQ ID NO: 2 es la secuencia de aminoácidos de la proteína quimérica truncada EMS_Q2.

[0036] SEQ ID NO: 3 es la secuencia de aminoácidos de la proteína quimérica truncada EMS_Q3.

[0037] SEQ ID NO: 4 es la secuencia de aminoácidos de la proteína quimérica truncada EMS_Q4.

[0038] SEQ ID NO: 5 es la secuencia de aminoácidos de la proteína quimérica truncada EMS_Q5.

[0039] SEQ ID NO: 6 es la secuencia de aminoácidos de la proteína quimérica truncada EMS_Q6.

[0040] SEQ ID NO: 7 es la secuencia de aminoácidos de la proteína quimérica truncada EMS_Q7.

[0041] SEQ ID NO: 8 es la secuencia de aminoácidos de la proteína quimérica truncada EMS_Q8.

[0042] SEQ ID NO: 9 es la secuencia de aminoácidos de la proteína quimérica truncada EMS_Q9.

[0043] SEQ ID NO: 10 es la secuencia de aminoácidos de la proteína quimérica truncada EMS_Q10.

[0044] SEQ ID NO: 11 es la secuencia de aminoácidos de la proteína quimérica truncada EMS_Q11.

[0045] SEQ ID NO: 12 es la secuencia de aminoácidos de la proteína quimérica truncada EMS_Q12.

[0046] SEQ ID NO: 13 es la secuencia de aminoácidos de la proteína quimérica truncada EMS_Q13.

[0047] SEQ ID NO: 14 es la secuencia de aminoácidos de la proteína quimérica truncada EMS_Q14.

[0048] SEQ ID NO: 15 es la secuencia de aminoácidos de la proteína quimérica truncada EMS_Q15.

[0049] SEQ ID NO: 16 es la secuencia de aminoácidos de la proteína quimérica truncada EMS_Q16.

[0050] SEQ ID NO: 17 es la secuencia de aminoácidos de la proteína quimérica truncada EMS_Q17.

[0051] SEQ ID NO: 18 es la secuencia de aminoácidos de la proteína quimérica truncada EMS_Q18.

[0052] SEQ ID NO: 19 es la secuencia de aminoácidos de la proteína quimérica truncada EMS_Q19.

[0053] SEQ ID NO: 20 es la secuencia de aminoácidos de la proteína quimérica truncada EMS_Q20.

[0054] SEQ ID NO: 21 es la secuencia de aminoácidos de la proteína quimérica truncada EMS_Q21.

[0055] SEQ ID NO: 22 es la secuencia de aminoácidos de la proteína quimérica truncada EMS_Q22.

[0056] SEQ ID NO: 23 es la secuencia de aminoácidos de la proteína quimérica truncada EMS_Q23.

[0057] SEQ ID NO: 24 es la secuencia de aminoácidos de la proteína quimérica truncada EMS_Q24.

[0058] SEQ ID NO: 25 es la secuencia de aminoácidos de la proteína quimérica truncada EMS_Q25.

[0059] SEQ ID NO: 26 es la secuencia de aminoácidos de la proteína quimérica truncada EMS_Q26.

[0060] SEQ ID NO: 27 es la secuencia de aminoácidos de la proteína quimérica truncada EMS_Q27.

[0061] SEQ ID NO: 28 es la secuencia de aminoácidos de la proteína quimérica truncada EMS_Q28.

[0062] SEQ ID NO: 29 es la secuencia de aminoácidos de la proteína quimérica truncada EMS_Q29.

[0063] SEQ ID NO: 30 es la secuencia de aminoácidos de la proteína quimérica truncada EMS_Q30.

[0064] SEQ ID NO: 31 es la secuencia de aminoácidos de la proteína quimérica truncada EMS_Q31.

[0065] SEQ ID NO: 32 es la secuencia de aminoácidos de la proteína quimérica truncada EMS_Q32.

[0066] SEQ ID NO: 33 es la secuencia de aminoácidos de la proteína quimérica truncada EMS_Q33.

[0067] SEQ ID NO: 34 es la secuencia de aminoácidos de la proteína quimérica truncada EMS_Q34.

[0068] SEQ ID NO: 35 es la secuencia de aminoácidos de la proteína quimérica truncada EMS_Q35.

[0069] SEQ ID NO: 36 es la secuencia de aminoácidos de la proteína quimérica truncada EMS_Q36.

[0070] SEQ ID NO: 37 es la secuencia de aminoácidos de la proteína quimérica truncada EMS_Q37.

[0071] SEQ ID NO: 38 es la secuencia de aminoácidos de la proteína quimérica truncada EMS_Q38.

[0072] SEQ ID NO: 39 es la secuencia de aminoácidos de la proteína quimérica truncada EMS_Q39.

[0073] SEQ ID NO: 40 es la secuencia de aminoácidos de la proteína quimérica truncada EMS_Q40.

[0074] SEQ ID NO: 41 es la secuencia de aminoácidos de la proteína quimérica truncada EMS_Q41.

[0075] SEQ ID NO: 42 es la secuencia de aminoácidos de la proteína quimérica truncada EMS_Q42.

[0076] SEQ ID NO: 43 es la secuencia de aminoácidos de la proteína quimérica truncada EMS_Q43.

[0077] SEQ ID NO: 44 es la secuencia de aminoácidos de la proteína quimérica truncada EMS_Q44.

[0078] SEQ ID NO: 45 es la secuencia de aminoácidos de la proteína quimérica truncada EMS_Q45.

[0079] SEQ ID NO: 46 es la secuencia de aminoácidos de la proteína quimérica truncada EMS_Q46.

[0080] SEQ ID NO: 47 es la secuencia de aminoácidos de la proteína quimérica truncada EMS_Q47.

[0081] SEQ ID NO: 48 es la secuencia de aminoácidos de la proteína quimérica truncada EMS_Q48.

[0082] SEQ ID NO: 49 es la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína quimérica truncada EMS_1.

[0083] SEQ ID NO: 50 es la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína quimérica truncada EMS_2.

[0084] SEQ ID NO: 51 es la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína quimérica truncada EMS_3.

[0085] SEQ ID NO: 52 es la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína quimérica truncada EMS_4.

[0086] SEQ ID NO: 53 es la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína quimérica truncada EMS_5.

[0087] SEQ ID NO: 54 es la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína quimérica truncada EMS_6.

- [0088] SEQ ID NO: 55 es la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína quimérica truncada EMS_7.
- [0089] SEQ ID NO: 56 es la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína quimérica truncada EMS_8.
- [0090] SEQ ID NO: 57 es la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína quimérica truncada EMS_9.
- [0091] SEQ ID NO: 58 es la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína quimérica truncada EMS_10.
- [0092] SEQ ID NO: 59 es la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína quimérica truncada EMS_11.
- [0093] SEQ ID NO: 60 es la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína quimérica truncada EMS_12.
- [0094] SEQ ID NO: 61 es la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína quimérica truncada EMS_13.
- [0095] SEQ ID NO: 62 es la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína quimérica truncada EMS_14.
- [0096] SEQ ID NO: 63 es la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína quimérica truncada EMS_15.
- [0097] SEQ ID NO: 64 es la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína quimérica truncada EMS_16.
- [0098] SEQ ID NO: 65 es la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína quimérica truncada EMS_17.
- [0099] SEQ ID NO: 66 es la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína quimérica truncada EMS_18.
- [00100] SEQ ID NO: 67 es la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína quimérica truncada EMS_19.
- [00101] SEQ ID NO: 68 es la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína quimérica truncada EMS_20.
- [00102] SEQ ID NO: 69 es la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína quimérica truncada EMS_21.

- [00103] SEQ ID NO: 70 es la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína quimérica truncada EMS_22.
- [00104] SEQ ID NO: 71 es la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína quimérica truncada EMS_23.
- [00105] SEQ ID NO: 72 es la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína quimérica truncada EMS_24.
- [00106] SEQ ID NO: 73 es la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína quimérica truncada EMS_25.
- [00107] SEQ ID NO: 74 es la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína quimérica truncada EMS_26.
- [00108] SEQ ID NO: 75 es la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína quimérica truncada EMS_27.
- [00109] SEQ ID NO: 76 es la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína quimérica truncada EMS_28.
- [00110] SEQ ID NO: 77 es la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína quimérica truncada EMS_29.
- [00111] SEQ ID NO: 78 es la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína quimérica truncada EMS_30.
- [00112] SEQ ID NO: 79 es la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína quimérica truncada EMS_31.
- [00113] SEQ ID NO: 80 es la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína quimérica truncada EMS_32.
- [00114] SEQ ID NO: 81 es la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína quimérica truncada EMS_33.
- [00115] SEQ ID NO: 82 es la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína quimérica truncada EMS_34.
- [00116] SEQ ID NO: 83 es la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína quimérica truncada EMS_35.
- [00117] SEQ ID NO: 84 es la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína quimérica truncada EMS_36.

- [00118] SEQ ID NO: 85 es la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína quimérica truncada EMS_37.
- [00119] SEQ ID NO: 86 es la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína quimérica truncada EMS_38.
- [00120] SEQ ID NO: 87 es la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína quimérica truncada EMS_39.
- [00121] SEQ ID NO: 88 es la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína quimérica truncada EMS_40.
- [00122] SEQ ID NO: 89 es la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína quimérica truncada EMS_41.
- [00123] SEQ ID NO: 90 es la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína quimérica truncada EMS_42.
- [00124] SEQ ID NO: 91 es la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína quimérica truncada EMS_43.
- [00125] SEQ ID NO: 92 es la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína quimérica truncada EMS_44.
- [00126] SEQ ID NO: 93 es la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína quimérica truncada EMS_45.
- [00127] SEQ ID NO: 94 es la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína quimérica truncada EMS_46.
- [00128] SEQ ID NO: 95 es la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína quimérica truncada EMS_47.
- [00129] SEQ ID NO: 96 es la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína quimérica truncada EMS_48.
- [00130] SEQ ID NO: 97 es la secuencia de aminoácidos de la proteína parental Cry1C.
- [00131] SEQ ID NO: 98 es la secuencia de aminoácidos del Dominio I de Cry1C.
- [00132] SEQ ID NO: 99 es la secuencia de aminoácidos del Dominio II de Cry1C.

[00133] SEQ ID NO: 100 es la secuencia de aminoácidos del Dominio III de Cry1C.

[00134] SEQ ID NO: 101 es la secuencia de aminoácidos de la proteína parental Cry1B.

[00135] SEQ ID NO: 102 es la secuencia de aminoácidos del Dominio I de Cry1B.

[00136] SEQ ID NO: 103 es la secuencia de aminoácidos del Dominio II de Cry1B.

[00137] SEQ ID NO: 104 es la secuencia de aminoácidos del Dominio III de Cry1B.

[00138] SEQ ID NO: 105 es la secuencia de aminoácidos de la proteína parental Cry1Ab.

[00139] SEQ ID NO: 106 es la secuencia de aminoácidos del Dominio I de Cry1Ab.

[00140] SEQ ID NO: 107 es la secuencia de aminoácidos del Dominio II de Cry1Ab.

[00141] SEQ ID NO: 108 es la secuencia de aminoácidos del Dominio III_a de Cry1Ab.

[00142] SEQ ID NO: 109 es la secuencia de aminoácidos del Dominio III_b de Cry1Ab.

[00143] SEQ ID NO: 110 es la secuencia de aminoácidos de la proteína parental Cry1E.

[00144] SEQ ID NO: 111 es la secuencia de aminoácidos del Dominio I de Cry1E.

[00145] SEQ ID NO: 112 es la secuencia de aminoácidos del Dominio II de Cry1E.

[00146] SEQ ID NO: 113 es la secuencia de aminoácidos del Dominio III de Cry1E.

[00147] SEQ ID NO: 114 es la secuencia de aminoácidos de la proteína parental Cry1Da.

[00148] SEQ ID NO: 115 es la secuencia de aminoácidos del Dominio I de Cry1Da.

[00149] SEQ ID NO: 116 es la secuencia de aminoácidos del Dominio II de Cry1Da.

[00150] SEQ ID NO: 117 es la secuencia de aminoácidos del Dominio III de Cry1Da.

[00151] SEQ ID NO: 118 es la secuencia de aminoácidos de la proteína parental Cry1Fb.

[00152] SEQ ID NO: 119 es la secuencia de aminoácidos del Dominio I de Cry1Fb.

[00153] SEQ ID NO: 120 es la secuencia de aminoácidos del Dominio II de Cry1Fb.

[00154] SEQ ID NO: 121 es la secuencia de aminoácidos del Dominio III de Cry1Fb.

[00155] SEQ ID NO: 122 es la secuencia de aminoácidos de la proteína parental Cry2Aa.

[00156] SEQ ID NO: 123 es la secuencia de aminoácidos del Dominio I de Cry2Aa.

[00157] SEQ ID NO: 124 es la secuencia de aminoácidos del Dominio II de Cry2Aa.

[00158] SEQ ID NO: 125 es la secuencia de aminoácidos del Dominio III de Cry2Aa.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[00159] Las Figuras 1-4 muestran los resultados de las pruebas informadas en el Ejemplo 5.

[00160] Figura 1: Resultado gráfico de la puntuación promedio de lesión (escala Davis) entre 3 evaluaciones (7, 14 y 21 días después de la infestación) de la prueba de invernadero con infestación artificial de *Spodoptera frugiperda* en 44 macetas con eventos de maíz que contienen la secuencia codificante. para la proteína quimérica EMS_Q6

(SEQ ID NO: 6). Se añadió maíz L3 no transgénico como control negativo (C-) y un maíz transgénico comercial con resistencia a *S. frugiperda* como control positivo (C+).

[00161] Figura 2. Resultado gráfico de la puntuación promedio de lesión (escala Davis) entre 3 evaluaciones (7, 14 y 21 días después de la infestación) de la prueba de campo con infestación artificial de *S. frugiperda* en 22 eventos (Ev1 a Ev22) de maíz que contiene la secuencia codificante de la proteína quimérica EMS_Q6 (SEQ ID NO: 6). Como controles negativos y positivos se evaluaron dos maíces no transgénicos (C-) y dos maíces transgénicos comerciales (C+), respectivamente.

[00162] Figura 3: Resultado representativo de la prueba de campo con infestación artificial y natural de *S. frugiperda* en **(A)** maíz transgénico, que expresa la proteína quimérica EMS_Q6 (SEQ ID NO: 6) y **(B)** maíz control no transgénico. Se observa que la planta de maíz transgénico no presenta daños, mientras que la planta de maíz convencional presenta daños foliares provocados por el ataque de *S. frugiperda*.

[00163] Figura 4: Resultado del bioensayo realizado en laboratorio con hojas de maíz después de cinco días de infestación con larvas neonatales de *S. frugiperda*. **(A)** maíz transgénico, que expresa la proteína quimérica EMS_Q6 (SEQ ID NO: 6) y **(B)** maíz control no transgénico (C-). Se observa que en la hoja de maíz que expresa la proteína EMS_Q6 hubo mortalidad total de las orugas y ningún daño en la hoja. En el maíz testigo hubo daños evidentes por la alimentación y la presencia de orugas vivas y bien desarrolladas.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[00164] El problema en la técnica de control de plagas de insectos agrícolas se puede definir como la necesidad de nuevas proteínas insecticidas que sean efectivas contra plagas de insectos objetivo,

exhiban toxicidad de amplio espectro contra especies de plagas de insectos objetivo, tengan la capacidad de expresarse en plantas. sin causar problemas agronómicos indeseables, y proporcionar un modo de acción alternativo en comparación con las proteínas utilizadas actualmente en la agricultura. Las proteínas insecticidas quiméricas truncadas descritas en el presente documento abordan cada una de estas necesidades, particularmente contra un amplio espectro de plagas de insectos Lepidópteros.

[00165] Para evitar el desarrollo o eludir la resistencia de los insectos contra las proteínas insecticidas utilizadas actualmente, se necesitan nuevas proteínas insecticidas con diferentes modos de acción, así como un amplio espectro y eficacia, para el control de Lepidópteros. Una forma de abordar esta necesidad es intercambiar segmentos entre varias proteínas *Bt* que exhiben similitudes estructurales para crear nuevas proteínas *Bt* con propiedades inhibitoras de insectos. Sin embargo, la probabilidad de crear una proteína quimérica con propiedades mejoradas a partir de la variedad de estructuras de dominio de las numerosas proteínas insecticidas nativas conocidas en la técnica es remota. Véase, por ejemplo, Jacqueline S. Knight, *et al.* "A Strategy for Shuffling Numerous *Bacillus thuringiensis* Crystal Protein Domains". *J. Economic Entomology*, 97 (6) (2004): páginas 1805 a 1813.

[00166] En el presente documento se describen secuencias de moléculas de ácido nucleico recombinantes que codifican nuevas proteínas insecticidas quiméricas. Estas proteínas insecticidas abordan la necesidad actual en la técnica de proporcionar proteínas insecticidas tóxicas adicionales con propiedades insecticidas mejoradas tales como mayor eficacia, actividad contra un espectro más amplio de especies de plagas de insectos objetivo y diferentes modos de acción. Los miembros de este grupo de proteínas, que incluyen las proteínas ejemplificadas y proporcionadas en el presente documento, exhiben actividad insecticida

contra especies de plagas de insectos Lepidópteros.

[00167] El término "segmento" o "fragmento" se usa en esta solicitud para describir secuencias consecutivas de aminoácidos o ácidos nucleicos que son más cortas que la secuencia completa de aminoácidos o ácidos nucleicos que describe una proteína insecticida quimérica divulgada. En la presente solicitud también se divulga un segmento o fragmento que exhibe actividad inhibidora de insectos si la alineación de dicho segmento o fragmento, con la sección correspondiente de la proteína insecticida quimérica, da como resultado una identidad de secuencia de aminoácidos de cualquier fracción porcentual de aproximadamente 50% a aproximadamente 100% entre el segmento o fragmento y la sección correspondiente de la proteína insecticida quimérica.

[00168] La referencia en esta solicitud a los términos "activo(a)" o "actividad"; "actividad plaguicida" o "pesticida"; o "actividad insecticida", "inhibidor de insectos", "insecticida", se refiere a la eficacia de un agente tóxico, tal como una proteína insecticida, en la inhibición (inhibición del crecimiento, alimentación, fecundidad o viabilidad), en la supresión (supresión de plagas infestación, suprimiendo las actividades de alimentación de las plagas en un cultivo particular que contiene una cantidad efectiva de una proteína insecticida) o matando (causando morbilidad, mortalidad o fecundidad reducida) de una plaga. Estos términos pretenden incluir el resultado de suministrar una cantidad eficaz de una proteína insecticida a una plaga donde la exposición de la plaga a la proteína insecticida produce morbilidad, mortalidad, fecundidad reducida o retraso del crecimiento. Estos términos también incluyen la repulsión de la plaga de la planta, un tejido vegetal, una parte de la planta, la semilla, las células vegetales o la ubicación geográfica particular donde se puede estar cultivando la planta, como resultado de suministrar una cantidad efectiva. como pesticida a partir de la proteína

insecticida dentro o sobre la planta. En términos generales, la actividad pesticida se refiere a la capacidad de una proteína insecticida de ser eficaz para inhibir el crecimiento, el desarrollo, la viabilidad, el comportamiento alimentario, el comportamiento de apareamiento, la fecundidad o cualquier disminución mensurable de los efectos adversos causados por los insectos que se alimentan de esta proteína. fragmento, segmento proteico o polinucleótido de una plaga objetivo particular, incluyendo, sin limitación, insectos del orden Lepidoptera. La proteína insecticida puede ser producida por la planta o puede aplicarse a la planta o al entorno dentro del lugar donde se encuentra la planta. El término "bioactividad", "eficacia" o variaciones de los mismos también son términos usados indistintamente en esta solicitud para describir los efectos de las proteínas insecticidas quiméricas truncadas de la presente invención sobre plagas de insectos objetivo.

[00169] Los términos "truncado" o "truncada" se refieren a secuencias de aminoácidos de proteínas que, en relación con las correspondientes secuencias naturales y/o parentales, carecen de la porción carboxi-terminal de la protoxina presente en el Cry1 natural y/o natural. y proteínas Cry2 parentales. Los términos "truncada" o "truncado" se refieren además a secuencias de nucleótidos que codifican proteínas truncadas y, por lo tanto, carecen de una región que codifique un dominio de protoxina carboxi-terminal.

[00170] Una cantidad eficaz como pesticida de un agente tóxico, cuando se proporciona en la dieta de una plaga objetivo, exhibe actividad pesticida cuando el agente tóxico entra en contacto con la plaga. Un agente tóxico puede ser una proteína insecticida o uno o más agentes químicos conocidos en la técnica. Los agentes insecticidas químicos y los agentes insecticidas proteicos se pueden usar solos o en combinación entre sí. Los agentes químicos incluyen, entre otros, moléculas de ARNbc que se dirigen a genes específicos para la

supresión de una plaga objetivo, organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretroides, neonicotinoides y rianoides. Los agentes insecticidas proteicos incluyen las proteínas insecticidas quiméricas descritas en esta solicitud, así como otros agentes tóxicos proteicos que incluyen aquellos que se dirigen a especies de plagas de Lepidópteros, así como toxinas proteicas que se usan para controlar otras plagas de plantas, tales como las proteínas Cry disponibles en la técnica. para uso en el control de especies de Coleoptera, Tisanoptera, Hemiptera y Homoptera.

[00171] La referencia a una plaga, particularmente una plaga agrícola, significa plagas de insectos de cultivos, particularmente plagas de insectos Lepidópteros, que están controladas por las proteínas insecticidas quiméricas truncadas descritas en el presente documento. Sin embargo, la referencia a una plaga también puede incluir plagas de insectos de plantas coleópteros, hemípteros y homópteros, así como nematodos, cuando los agentes tóxicos contra estas plagas se combinan con o están presentes junto con la proteína insecticida quimérica truncada o una que es 50% a aproximadamente 100% idéntica a la proteína insecticida quimérica truncada.

[00172] Las proteínas insecticidas quiméricas truncadas descritas en el presente documento exhiben actividad insecticida contra plagas de insectos de especies de Lepidoptera, incluidos adultos, pupas, larvas y recién nacidos, así como especies de Hemiptera, incluidos adultos y ninfas. Los insectos del orden Lepidoptera incluyen, entre otros, *Agrotis ipsilon*, *Agrotis subterranea*, *Agrotis orthogonia*, *Alabama argillacea*, *Anticarsia gemmatalis*, *Amyelois transitella*, *Archips argyrospila*, *Archips rosana*, *Chilo supresalis*, *Chrysodeixis includens*, *Cnaphalocrocis medinalis*, *Crambus caliginosellus*, *Crambus teterrellus*, *Cydia pomonella*, *Diatraea saccharalis*, *Diatraea grandiosella*, *Earias vitela*, *Earias insulana*, *Earias vittella*, *Elasmopalpus lignosellus*, *Endopiza*

viteana, *Grapholita molesta*, *Helicoverpa armigera*, *Helicoverpa icetopeon*, *Helicoverpa zea*, *Heliothis virescens*, *Herpetogramma licarsisalis*, *Homoeosoma electellum*, *Hypen una scabra*, *lobesia botrana*, *Lymantria dispar*, *Mamestra configurata*, *Ostrinia nubilalis*, *Pectinophora gossypiella*, *Pieris brassicae*, *Pieris rapae*, *Phyllocnistis citrella*, *Plutella xylostella*, *Pseudaletia unipuncta*, *Rachiplusia nu*, *Sesamia inferens*, *Spodoptera cosmioides*, *Spodoptera exigua*, *Spodoptera eridania*, *Spodoptera frugiperda*, *Spodoptera litura*, *Suleima helianthana*, *Trichoplusia ni* y *Tuta absoluta*.

[00173] La referencia en esta solicitud a una “molécula de ADN aislada”, o un término o frase equivalente, significa que la molécula de ADN está presente sola o en combinación con otras composiciones, pero no dentro de su entorno natural. Por ejemplo, los elementos de ácido nucleico, como una secuencia codificante, una secuencia de intrones, una secuencia principal no traducida, una secuencia promotora, una secuencia de terminación de la transcripción y similares, que se encuentran naturalmente en el ADN del genoma de un organismo no se consideran "aislados" ya que el elemento se encuentra dentro del genoma del organismo y en el lugar dentro del genoma donde se encuentra de forma natural. Sin embargo, cada uno de estos elementos, y subpartes de estos elementos, estarían “aislados” dentro del alcance de este documento, siempre y cuando el elemento no esté dentro del genoma del organismo y en la ubicación dentro del genoma en la que se encuentra naturalmente. De manera similar, una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína insecticida o cualquier variante insecticida natural de esa proteína sería una secuencia de nucleótidos aislada, siempre que la secuencia de nucleótidos no esté dentro del ADN de la bacteria de la que se deriva la secuencia que codifica la proteína. encontrado naturalmente. Una secuencia de nucleótidos sintética que codifica la secuencia de aminoácidos de la proteína

insecticida natural se consideraría aislada para los fines de este documento. Para los fines del presente documento, cualquier secuencia de nucleótidos recombinante, por ejemplo, la secuencia de nucleótidos de ADN insertada en el genoma de células de una planta o bacteria, o presente en un vector extracromosómico, se consideraría una secuencia de nucleótidos aislada si está presente dentro de del plásmido o estructura similar utilizada para transformar células, dentro del genoma de la planta o bacteria, o presente en cantidades detectables en tejidos, progenie, muestras biológicas o productos de consumo derivados de la planta o bacteria.

[00174] Como se describe adicionalmente en los Ejemplos, a través de un esfuerzo de desarrollo de secuencias quiméricas se construyeron alrededor de cuarenta y ocho (48) secuencias de nucleótidos que codifican proteínas insecticidas quiméricas truncadas a partir de los dominios de toxina de proteínas insecticidas conocidas (llamadas en este documento "proteínas parentales"), y expresado y probado en el bioensayo de actividad contra Lepidoptera. Las proteínas quiméricas truncadas construidas de acuerdo con las enseñanzas del presente documento mostraron una actividad superior en el control de Lepidópteros en comparación con las proteínas progenitoras de las que se derivaron sus componentes de toxina.

[00175] Estas proteínas insecticidas quiméricas con actividad de Lepidoptera mejorada o un espectro de Lepidoptera mejorado se construyeron a partir de los siguientes dominios de toxina amino-terminal de las proteínas *Bt* Cry parentales Cry1Ab, Cry1B, Cry1C, Cry1Da, Cry1E, Cry1Fb y Cry2Aa. Específicamente, las nuevas proteínas quiméricas insecticidas de la presente invención con actividad de Lepidópteros mejorada o un espectro de Lepidópteros mejorado comprenden las siguientes combinaciones de dominios: Dominio I de Cry1C (SEQ ID NO: 98), Cry1B (SEQ ID NO: 102), Cry1Ab (SEQ ID NO:

106), Cry1E (SEQ ID NO: 111), Cry1Da (SEQ ID NO: 115), Cry1Fb (SEQ ID NO: 119), Cry2Aa (SEQ ID NO: 123); Dominio II de Cry1C (SEQ ID NO: 99), Cry1B (SEQ ID NO: 103), Cry1Ab (SEQ ID NO: 107), Cry1E (SEQ ID NO: 112), Cry1Da (SEQ ID NO: 116), Cry1Fb (SEQ ID NO: 120), Cry2Aa (SEQ ID NO: 124); y Dominio III de Cry1C (SEQ ID NO: 100), Cry1B (SEQ ID NO: 104), Cry1Ab_a (SEQ ID NO: 108), Cry1Ab_b (SEQ ID NO: 109), Cry1E (SEQ ID NO: 113), Cry1Da (SEQ ID NO: 117), Cry1Fb (SEQ ID NO: 121), Cry2Aa (SEQ ID NO: 125).

[00176] Las proteínas quiméricas truncadas ejemplares según la presente invención se denominaron EMS_Q1 (SEQ ID NO: 1), EMS_Q2 (SEQ ID NO: 2), EMS_Q3 (SEQ ID NO: 3), EMS_Q4 (SEQ ID NO: 4), EMS_Q5 (SEQ ID NO: 5), EMS_Q6 (SEQ ID NO: 6), EMS_Q7 (SEQ ID NO: 7), EMS_Q8 (SEQ ID NO: 8), EMS_Q9 (SEQ ID NO: 9), EMS_Q10 (SEQ ID NO: 10), EMS_Q11 (SEQ ID NO: 11), EMS_Q12 (SEQ ID NO: 12), EMS_Q13 (SEQ ID NO: 13), EMS_Q14 (SEQ ID NO: 14), EMS_Q15 (SEQ ID NO: 15), EMS_Q16 (SEQ ID NO: 16), EMS_Q17 (SEQ ID NO: 17), EMS_Q18 (SEQ ID NO: 18), EMS_Q19 (SEQ ID NO: 19), EMS_Q20 (SEQ ID NO: 20), EMS_Q21 (SEQ ID NO: 21), EMS_Q22 (SEQ ID NO: 22), EMS_Q23 (SEQ ID NO: 23), EMS_Q24 (SEQ ID NO: 24), EMS_Q25 (SEQ ID NO: 25), EMS_Q26 (SEQ ID NO: 26), EMS_Q27 (SEQ ID NO: 27), EMS_Q28 (SEQ ID NO: 28), EMS_Q29 (SEQ ID NO: 29), EMS_Q30 (SEQ ID NO: 30), EMS_Q31 (SEQ ID NO: 31), EMS_Q32 (SEQ ID NO: 32), EMS_Q33 (SEQ ID NO: 33), EMS_Q34 (SEQ ID NO: 34), EMS_Q35 (SEQ ID NO: 35), EMS_Q36 (SEQ ID NO: 36), EMS_Q37 (SEQ ID NO: 37), EMS_Q38 (SEQ ID NO: 38), EMS_Q39 (SEQ ID NO: 39), EMS_Q40 (SEQ ID NO: 40), EMS_Q41 (SEQ ID NO: 41), EMS_Q42 (SEQ ID NO: 42), EMS_Q43 (SEQ ID NO: 43), EMS_Q44 (SEQ ID NO: 44), EMS_Q45 (SEQ ID NO: 45), EMS_Q46 (SEQ ID NO: 46), EMS_Q47 (SEQ ID NO: 47), y EMS_Q48 (SEQ ID NO: 48).

[00177] Muchas de las proteínas insecticidas quiméricas truncadas demuestran actividad insecticida contra múltiples especies de plagas de insectos Lepidópteros. Específicamente, las proteínas insecticidas quiméricas truncadas descritas en la presente solicitud exhibieron actividad contra *S. frugiperda*. Por lo tanto, las proteínas ejemplificadas descritas en esta solicitud están relacionadas por una función común y exhiben actividad insecticida contra plagas de insectos de especies de insectos Lepidoptera, incluidos adultos, larvas y pupas.

[00178] Las proteínas insecticidas quiméricas se pueden identificar mediante comparación entre sí utilizando diversos algoritmos informáticos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la identidad de la secuencia de aminoácidos de proteínas relacionadas con proteínas insecticidas quiméricas truncadas se puede analizar utilizando una alineación Clustal W utilizando estos parámetros predeterminados: matriz de peso: blosum, penalización por apertura de hueco: 10,0, penalización por extensión de hueco: hueco: 0,05, huecos hidrófilos : Residuos hidrofílicos unidos: GPSNDQERK, Penalizaciones por brechas de residuos específicos: Bound (Thompson, *et al* (1994) Nucleic Acids Research, 22: 4673 a 4680). El porcentaje de identidad de aminoácidos se calcula además mediante el producto del 100% multiplicado por (identidades de aminoácidos/longitud de la proteína en cuestión). Otros algoritmos de alineación también están disponibles en la técnica, proporcionan resultados similares a los obtenidos usando una alineación Clustal W y se contemplan en esta solicitud.

[00179] En esta solicitud se describe una proteína de consulta que exhibe actividad inhibidora de insectos si la alineación de dicha proteína de consulta con las proteínas insecticidas quiméricas truncadas expuestas en las SEQ ID NOs: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47 o 48 y da como

resultado al menos aproximadamente el 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87 %, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o aproximadamente 100% de identidad de secuencia de aminoácidos (o cualquier fracción porcentual en este rango) entre la proteína de consulta y la materia.

[00180] Como se describe adicionalmente en los ejemplos de la presente solicitud, se han diseñado secuencias sintéticas o artificiales que codifican proteínas insecticidas quiméricas para su uso en plantas. Secuencias de nucleótidos sintéticas ejemplares que se han diseñado para su uso en plantas establecidas son EMS_Q1 (SEQ ID NO: 49), EMS_Q2 (SEQ ID NO: 50), EMS_Q3 (SEQ ID NO: 51), EMS_Q4 (SEQ ID NO: 52), EMS_Q5 (SEQ ID NO: 53), EMS_Q6 (SEQ ID NO: 54), EMS_Q7 (SEQ ID NO: 55), EMS_Q8 (SEQ ID NO: 56), EMS_Q9 (SEQ ID NO: 57), EMS_Q10 (SEQ ID NO: 58), EMS_Q11 (SEQ ID NO: 59), EMS_Q12 (SEQ ID NO: 60), EMS_Q13 (SEQ ID NO: 61), EMS_Q14 (SEQ ID NO: 62), EMS_Q15 (SEQ ID NO: 63), EMS_Q16 (SEQ ID NO: 64), EMS_Q17 (SEQ ID NO: 65), EMS_Q18 (SEQ ID NO: 66), EMS_Q19 (SEQ ID NO: 67), EMS_Q20 (SEQ ID NO: 68), EMS_Q21 (SEQ ID NO: 69), EMS_Q22 (SEQ ID NO: 70), EMS_Q23 (SEQ ID NO: 71), EMS_Q24 (SEQ ID NO: 72), EMS_Q25 (SEQ ID NO: 73), EMS_Q26 (SEQ ID NO: 74), EMS_Q27 (SEQ ID NO: 75), EMS_Q28 (SEQ ID NO: 76), EMS_Q29 (SEQ ID NO: 77), EMS_Q30 (SEQ ID NO: 78), EMS_Q31 (SEQ ID NO: 79), EMS_Q32 (SEQ ID NO: 80), EMS_Q33 (SEQ ID NO: 81), EMS_Q34 (SEQ ID NO: 82), EMS_Q35 (SEQ ID NO: 83), EMS_Q36 (SEQ ID NO: 84), EMS_Q37 (SEQ ID NO: 85), EMS_Q38 (SEQ ID NO: 86), EMS_Q39 (SEQ ID NO: 87), EMS_Q40 (SEQ ID NO: 88), EMS_Q41 (SEQ ID NO: 89), EMS_Q42 (SEQ ID NO: 90), EMS_Q43 (SEQ ID NO: 91), EMS_Q44 (SEQ ID NO:

92), EMS_Q45 (SEQ ID NO: 93), EMS_Q46 (SEQ ID NO: 94), EMS_Q47 (SEQ ID NO: 95), y EMS_Q48 (SEQ ID NO: 96).

[00181] Para la expresión en células vegetales, se pueden expresar proteínas insecticidas quiméricas para que residan en el citosol o se dirijan a diversos orgánulos de la célula vegetal. Por ejemplo, dirigir una proteína al cloroplasto puede dar como resultado un aumento en los niveles de proteína expresada en una planta transgénica, evitando que se produzcan diferentes fenotipos. La focalización también puede resultar en una mayor efectividad de la resistencia a las plagas en un evento transgénico. Un péptido diana o péptido de tránsito es una cadena peptídica corta (de 3 a 70 aminoácidos de longitud) que dirige el transporte de una proteína a una región específica de la célula, incluido el núcleo, las mitocondrias, el retículo endoplásmico (RE), los cloroplastos, el apoplasto, peroxisoma y membrana plasmática. Algunos péptidos de tránsito son escindidos de la proteína por la peptidasa después de transportar las proteínas. Para dirigirse al cloroplasto, las proteínas contienen péptidos de tránsito que tienen entre 40 y 50 aminoácidos de longitud. La descripción del uso de péptidos de tránsito de cloroplastos se proporciona, por ejemplo, en los documentos WO2013116758, US 5.188.642 y US 5.728.925 y US 9.150.625. Muchas proteínas localizadas en el cloroplasto se expresan a partir de genes nucleares como precursores y se dirigen al cloroplasto mediante un péptido de tránsito de cloroplasto (CTP). Ejemplos de tales proteínas de cloroplasto aisladas incluyen, entre otras, aquellas asociadas con la subunidad pequeña (SSU) de ribulosa-1,5, carboxilasa-bifosfato, ferredoxina, ferredoxina oxidoreductasa, la proteína de recolección I y la proteína II complejas, tioredoxina F. y enolpiruvil shikimato fosfato sintasa (EPSPS). Se ha demostrado *in vivo* e *in vitro* que las proteínas no expresadas en el cloroplasto pueden dirigirse al cloroplasto mediante el uso de fusiones de proteínas con un CTP heterólogo y que el CTP es

suficiente para dirigir una proteína al cloroplasto. Se ha demostrado que la incorporación de un péptido de tránsito al cloroplasto adecuado tal como EPSPS CTP (CTP2) de *Arabidopsis thaliana* (véase, Klee *et al.*, *Mol. Gen Genet.* 210: páginas 437 a 442, 1987) o EPSPS CTP (CTP4) de *Petunia hybrida* (ver, Della-Cioppa *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: páginas 6.873 a 6.877, 1986) dirige secuencias de proteínas EPSPS heterólogas a cloroplastos en plantas transgénicas (ver, US 5.627.061; US 5.633.435; y US 5.312.910; y EP0218571; EP189707; EP508909; y EP924299). Para dirigir las proteínas insecticidas quiméricas al cloroplasto, se coloca una secuencia que codifica un péptido de tránsito al cloroplasto en un enlace operable en la posición 5' de la secuencia codificante sintética que codifica la proteína insecticida quimérica que fue diseñada para su expresión en células vegetales.

[00182] Se construyeron casetes de expresión y vectores que contienen estas secuencias de nucleótidos sintéticas o artificiales y se introdujeron en células vegetales de *E. coli* y maíz (*Zea mays*), de acuerdo con los métodos y conjuntos de procedimientos de transformación que se conocen en la técnica. Las células de maíz transformadas se regeneraron en plantas transformadas que expresaban la proteína insecticida quimérica truncada. Para probar la actividad pesticida, se realizaron bioensayos en presencia de larvas neonatales (1 día de edad) de plagas de Lepidópteros. Se contemplan composiciones de moléculas de ácido nucleico recombinantes que codifican proteínas insecticidas quiméricas. Por ejemplo, las proteínas insecticidas quiméricas se pueden expresar con construcciones de ADN recombinante, en las que una molécula de polinucleótido que tiene un ORF que codifica la proteína insecticida quimérica unida operativamente a elementos de expresión génica tales como un promotor y cualquier otro elemento regulador necesario para la expresión en el sistema para el cual se pretende la construcción. Los

ejemplos no limitantes incluyen un promotor funcional de planta unido operativamente a la proteína insecticida quimérica sintética que codifica secuencias para la expresión de la proteína insecticida quimérica en plantas o un promotor funcional en *Bt* unido operativamente a una proteína insecticida quimérica que codifica la secuencia para la expresión de la proteína en Bacterias *Bt* u otras especies de *Bacillus*. Otros elementos pueden unirse operativamente a proteínas insecticidas quiméricas que codifican secuencias que incluyen, sin limitación, potenciadores, intrones, líderes no traducidos, péptidos de inmovilización de proteínas codificados (etiqueta HIS), péptidos de translocación (es decir, péptidos de tránsito de plastidios, péptidos señal), polipéptidos. secuencias para enzimas de modificación postraducciona, sitios de unión ribosómica y sitios diana de ARNi.

[00183] Las moléculas de polinucleótidos recombinantes ejemplares proporcionadas en el presente documento incluyen, sin limitación, un promotor heterólogo unido operativamente a un polinucleótido tal como SEQ ID NOs: 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95 o 96, que codifica el polipéptido o proteína que tiene la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NOs: 1 (EMS_Q1), 2 (EMS_Q2), 3 (EMS_Q3), 4 (EMS_Q4), 5 (EMS_Q5), 6 (EMS_Q6), 7 (EMS_Q7), 8 (EMS_Q8), 9 (EMS_Q9), 10 (EMS_Q10), 11 (EMS_Q11), 12 (EMS_Q12), 13 (EMS_Q13), 14 (EMS_Q14), 15 (EMS_Q15), 16 (EMS_Q16), 17 (EMS_Q17), 18 (EMS_Q18), 19 (EMS_Q19), 20 (EMS_Q20), 21 (EMS_Q21), 22 (EMS_Q22), 23 (EMS_Q23), 24 (EMS_Q24), 25 (EMS_Q25), 26 (EMS_Q26), 27 (EMS_Q27), 28 (EMS_Q28), 29 (EMS_Q29), 30 (EMS_Q30), 31 (EMS_Q31), 32 (EMS_Q32), 33 (EMS_Q33), 34 (EMS_Q34), 35 (EMS_Q35), 36 (EMS_Q36), 37 (EMS_Q37), 38 (EMS_Q38), 39 (EMS_Q39), 40 (EMS_Q40), 41

(EMS_Q41), 42 (EMS_Q42), 43 (EMS_Q43), 44 (EMS_Q44), 45 (EMS_Q45), 46 (EMS_Q46), 47 (EMS_Q47), y 48 (EMS_Q48). Un promotor heterólogo también puede unirse operativamente a secuencias codificantes de ADN sintético que codifican una proteína insecticida quimérica truncada dirigida a plastidio y una proteína insecticida quimérica truncada no dirigida. Se contempla que los codones de una molécula de ácido nucleico recombinante que codifica una proteína insecticida quimérica descrita en el presente documento puedan reemplazarse por codones sinónimos (conocido en la técnica como sustitución silenciosa). En la técnica se conocen métodos de optimización de codones para la expresión génica en células huésped de especies de interés, incluidas bacterias y plantas, tales como dicotiledóneas y monocotiledóneas. El técnico de la materia sabrá, por ejemplo, utilizar el software Optimizer (<http://genomes.urv.es/OPTIMIZER/Form.php>) (Puigbo P., Guzmén E. Romeu A. y García-Vallve S 2007 OPTIMIZER: A web server for optimizing the codon usage of DNA sequences. *Nucleic Acids Research*, 35:W126-W131), seleccionando parámetros para la célula huésped de interés.

[00184] Una molécula de ADN recombinante, construcción o casete de expresión que codifica una proteína insecticida quimérica truncada puede comprender además una región de ADN que codifica uno o más tóxicos que pueden configurarse para expresar o coexpresar concomitantemente una secuencia de ADN que codifica una proteína insecticida quimérica, una proteína distinta de una proteína insecticida quimérica, una molécula de ARNbc inhibidora de insectos o una proteína complementaria. Las proteínas complementarias incluyen, sin limitación, cofactores, enzimas, compañeros de unión u otros agentes que funcionan para ayudar a la eficacia de un agente inhibidor de insectos, por ejemplo, para ayudar a su expresión, influir en su

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

[00185] Se puede ensamblar una molécula, construcción o casete de expresión de ADN recombinante de modo que todas las proteínas o moléculas de ARNbc se expresen a partir del mismo promotor o cada proteína o molécula de ARNbc esté bajo el control de un promotor separado o alguna combinación de ellos. Las proteínas de esta invención se pueden expresar a partir de un sistema de expresión multigénico en el que una proteína insecticida quimérica se expresa a partir de un segmento de nucleótido común, que también contiene otros marcos de lectura abiertos y promotores, dependiendo del tipo de sistema de expresión seleccionado. En otro ejemplo, un sistema de expresión de genes múltiples de plantas puede utilizar múltiples casetes de expresión no unidos, cada uno de los cuales expresa una proteína diferente u otro agente tóxico, tal como una o más moléculas de ARNbc.

[00186] Las moléculas de ácido nucleico recombinantes o construcciones de ADN recombinante que comprenden una secuencia que codifica una proteína insecticida quimérica se pueden administrar a células huésped mediante vectores, por ejemplo, plásmido, baculovirus, cromosoma sintético, virión, cósmido, fagémido, fago o vector viral. Dichos vectores pueden usarse para lograr la expresión estable o transitoria de una secuencia codificante de una proteína insecticida quimérica en una célula huésped, o la expresión posterior del polipéptido codificado. Un polinucleótido recombinante exógeno o una construcción de ADN recombinante que comprende una secuencia codificante de una proteína insecticida quimérica y que se introduce en una célula huésped también se denomina en el presente documento

"transgén".

[00187] En el presente documento se proporcionan bacterias transgénicas, células vegetales transgénicas, plantas transgénicas y partes de plantas transgénicas que contienen un polinucleótido que codifica una cualquiera o más de las proteínas insecticidas quiméricas. El término "célula bacteriana" o "bacteria" puede incluir, sin limitación, una célula de *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Pseudomonas* o *Rhizobium*. El término "célula vegetal" o "planta" puede incluir, sin limitación, una célula dicotiledónea o una célula monocotiledónea. Las plantas y células vegetales contempladas incluyen, entre otras, acelgas, berros, lechuga, alfalfa, algodón, escarola, alstroemeria, maní, arroz, avena, patatas, boca de dragón, brachiaria, brócoli, café, caña de azúcar, hierba, zanahoria, centeno, cebada, achicoria, coco, repollo, coliflor, crisantemo, spathiphyllum, espinacas, stevia, frijoles, tabaco, gerbera, gypsophyll, lisianthus, ricino, yuca, maracuyá, mijo, maíz, mostaza, pastos, pimienta, pimientos, repollo, rosa, rúcula, caucho, soja, sorgo, tomate, trigo, triticale, frutas y verduras. En determinadas realizaciones, se proporcionan plantas transgénicas y partes de plantas transgénicas regeneradas a partir de una célula vegetal transgénica. En determinadas realizaciones, las plantas transgénicas se pueden obtener a partir de una semilla transgénica o plántula de una planta transgénica. En determinadas realizaciones, la parte de la planta puede ser una semilla, una cápsula, una hoja, una flor, un tallo, una raíz o cualquier porción de la misma, o una porción no regenerable, de una parte de la planta transgénica. En el contexto de este documento, una porción "no regenerable" de una parte de una planta transgénica es una porción que no puede inducirse a formar una planta completa o que no puede inducirse a formar una planta completa capaz de reproducción sexual o asexual. En ciertas realizaciones, una porción no regenerable de una parte de la planta es

una porción de una semilla, cápsula, hoja, flor, tallo o raíz transgénica.

[00188] El presente documento proporciona además métodos para producir plantas transgénicas que comprenden cantidades inhibitoras de lepidópteros de proteínas insecticidas quiméricas truncadas. Dichas plantas se pueden producir introduciendo un polinucleótido que codifica las proteínas insecticidas quiméricas proporcionadas en esta solicitud en una célula vegetal, y seleccionando una planta derivada de dicha célula vegetal que exprese una cantidad inhibidora de insectos o Lepidópteros de la proteína insecticida quimérica. Las plantas pueden derivarse de células vegetales mediante técnicas de regeneración, semillas, polen o transformación de meristemas. Se conocen en la técnica métodos para transformar plantas. Por ejemplo, la transformación mediada por *Agrobacterium* se describe, por ejemplo, en los documentos US 8.404.930 (maíz), US 2009/0142837 (maíz), WO2011095460, US 2009/0138985 (soja), US 2008/0280361 (soja), WO2000071733 (algodón) y US 2008/0256667 (algodón).

[00189] Las plantas que expresan proteínas insecticidas quiméricas se pueden cruzar mediante reproducción con eventos transgénicos que expresan otras proteínas insecticidas y/o que expresan otros rasgos transgénicos tales como otros rasgos de control de insectos, genes de tolerancia a herbicidas, genes que confieren rasgos de rendimiento o tolerancia al estrés y similares, o dichos rasgos se pueden combinar en un solo vector para que todos los rasgos estén vinculados.

[00190] En esta solicitud también se describen productos vegetales procesados, en los que el producto procesado comprende una cantidad detectable de una proteína insecticida quimérica truncada. En determinadas realizaciones, el producto procesado se selecciona del grupo que consiste en partes de plantas, biomasa vegetal, aceite, harina, azúcar, pienso, salvado, hojuelas, cáscaras, semillas procesadas y semillas. En determinadas realizaciones, el producto

procesado no es regenerable. El producto vegetal puede comprender productos básicos u otros productos de bienes de consumo derivados de una planta transgénica o una parte de una planta transgénica, en donde el producto de bienes de consumo u otros productos pueden rastrearse a través del comercio mediante la detección de segmentos de nucleótidos o ARN o proteínas expresados que codifican o comprenden porciones distintivas de una proteína insecticida quimérica.

[00191] En esta solicitud también se describen métodos para controlar insectos, en particular, infestaciones de cultivos por lepidópteros, con proteínas insecticidas quiméricas. Dichos métodos pueden comprender cultivar una planta que comprende una cantidad inhibidora de insectos de la proteína insecticida quimérica. En ciertas realizaciones, tales métodos pueden comprender además uno o más de: (i) aplicar cualquier composición que comprenda o codifique una proteína insecticida quimérica a una planta o una semilla que da lugar a una planta; y (ii) transformar una planta o una célula vegetal que da lugar a una planta con un polinucleótido que codifica una proteína insecticida quimérica. En general, se contempla que la proteína insecticida quimérica se puede proporcionar en una composición, en un microorganismo o en una planta transgénica para impartir actividad inhibidora de insectos contra insectos lepidópteros.

[00192] En determinadas realizaciones, la proteína insecticida quimérica es el ingrediente activo insecticida de una composición inhibidora de insectos preparada cultivando *Bacillus* recombinante o cualquier otra célula bacteriana recombinante transformada para expresar una proteína insecticida quimérica truncada en condiciones adecuadas para la expresión. Dicha composición se puede preparar desecando, liofilizando, homogeneizando, extrayendo, filtrando, centrifugando, sedimentando o concentrando un cultivo de dichas células recombinantes que expresan/producen la proteína insecticida

quimérica. Tal proceso puede dar como resultado un extracto de células de *Bacillus* u otro extracto de células bacterianas entomopatógenas, una suspensión celular, un homogeneizado celular, un lisado celular, un sobrenadante celular, un filtrado celular o un sedimento celular. Al obtener la proteína insecticida quimérica tal como se produce, una composición que incluye la proteína insecticida quimérica puede incluir células bacterianas, esporas bacterianas y cuerpos de inclusión paraesporales y puede formularse para diversos usos, incluyendo aerosoles inhibidores de insectos agrícolas o formulaciones inhibidoras de insectos en bioensayos dietéticos.

[00193] La composición o formulación mencionada anteriormente puede comprender además un vehículo agrícolamente aceptable, tal como un cebo, un polvo, una pastilla, un gránulo, un aerosol, una emulsión, una suspensión coloidal, una solución acuosa, una preparación de esporas o cristales de *Bacillus* o un tratamiento de semillas. La composición o formulación también puede comprender además una célula vegetal, tejido vegetal, semilla o planta recombinante transformada para expresar una o más de las proteínas; o bacterias transformadas para expresar una o más de las proteínas. Dependiendo del nivel de inhibición insecticida o de inhibición de insectos inherente al polipéptido recombinante y el nivel de compuesto o formulación a aplicar a una prueba de planta o dieta, la composición o formulación puede incluir diversas cantidades en peso del polipéptido recombinante, por ejemplo de 0,0001% a 0,001% a 0,01% a 1% a 99% en peso del polipéptido recombinante.

[00194] En una realización, para reducir la probabilidad de desarrollar resistencia, una composición inhibidora de insectos o plantas transgénicas que comprende una proteína insecticida quimérica puede comprender además al menos un agente tóxico adicional que exhiba actividad inhibidora de insectos contra la misma especie de insecto

Lepidoptera, pero que es diferente de la proteína insecticida quimérica. Posibles tóxicos adicionales para tal composición incluyen una proteína inhibidora de insectos y una molécula de ARNbc inhibidora de insectos. Un ejemplo del uso de tales secuencias de ribonucleótidos para controlar plagas de insectos se describe en el documento US 2006/0021087. Dichos polipéptidos adicionales para el control de plagas de Lepidópteros pueden seleccionarse del grupo que consiste en una proteína inhibidora de insectos, tal como, sin limitación, Cry1A (US 5,880,275), Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1A.105, Cry1Ae, Cry1B (US 10/525,318), Cry1C (US 6,033,874), quimeras Cry1D, Cry1E, Cry1F e Cry1A/F (US 7,070,982; US 6,962,705; e US 6,713,063), Cry1G, Cry1H, Cry1I, Cry1J, Cry1K, Cry1L, Cry2A, Cry2Ab (US 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, e AXMI-045 (US 2013/0117884), AXMI-52, AXMI-58, AXMI-88, AXMI-97, AXMI-102, AXMI-112, AXMI-117, AXMI-100 (US 2013/0310543), AXMI-115, AXMI-113, AXMI-005 (US 2013/0104259), AXMI-134 (US 2013/0167264), AXMI-150 (US2010/0160231), AXMI-184 (US 2010/0004176), AXMI-196, AXMI-204, AXMI-207, AXMI-209 (US 2011/0030096), AXMI-218, AXMI-220 (US 2014/0245491), AXMI-221z, AXMI-222z, AXMI-223z, AXMI-224z, AXMI-225z (US 2014/0196175), AXMI-238 (US 2014/0033363), AXMI-270 (US 2014/0223598), AXMI-345 (US 2014/0373195), DIG-3 (US 2013/0219570), DIG-5 (US 2010/0317569), DIG-11 (US 2010/0319093), AfIP-1A y derivados del mismo (US 2014/0033361), AfIP-1B y derivados del mismo (US 2014/0033361), PIP-1A/PIP-1B (US 2014/0007292), PSEEN3174 (US 2014/0007292), AECFG-592740 (US 2014/0007292), Pput_1063 (US 2014/0007292), Pput_1064 (US 2014/0007292), GS-135 y derivados del mismo (US 2012/0233726), GS153 y derivados del mismo (US 2012/0192310),

GS154 y derivados del mismo (US 2012/0192310), GS155 y derivados del mismo (US 2012/0192310), SEQ ID NO: 2 y derivados del mismo como se describe en US 2011/0154536, SEQ ID NO:2 y derivados del mismo como se describe en US 2011/0112013, SEQ ID NO: 2 y 4 y derivados del mismo como se describe en US 2010/0192256, SEQ ID NO: 2 y derivados del mismo como se describe en US 2010/0077507, SEQ ID NO: 2 y derivados del mismo como se describe en US 2010/0077508, SEQ ID NO: 2 y derivados del mismo como se describe en US 2009/0313721, SEQ ID NO: 2 o 4 y derivados del mismo como se describe en US 2010/0269221, SEQ ID NO:2 y derivados del mismo como se describe en US 7,772,465, CF161_0085 y derivados del mismo como se describe en el documento WO2014/008054, proteínas tóxicas de Lepidópteros y derivados de los mismos como se describe en los documentos US 2008/0172762, US 2011/0055968 y US 2012/0117690; SEQ ID NO: 2 y derivados del mismo como se describe en US 7.510.878, SEQ ID NO: 2 y derivados del mismo como se describe en US 7,510,878, SEQ ID NO: 2 y derivados de los mismos como se describe en US 7,812,129; TIC1100, TIC860, TIC867, TIC868, TIC869, TIC836, TIC713, TIC843, TIC862, TIC1099, TIC1103, TIC845, TIC846, TIC858, TIC866, TIC838, TIC841, TIC842, TIC850, TIC859, TIC861, TIC848, TIC849, y TIC847 como se describe en el documento WO2016/061391 y similares.

[00195] En otras realizaciones, una composición inhibidora de insectos o una planta transgénica puede comprender además al menos un tóxico adicional que exhibe actividad inhibidora de insectos para una plaga de insectos que no es inhibida por las proteínas insecticidas quiméricas de la presente invención (tales como plagas de coleoptera, hemiptera y homoptera), con el fin de ampliar el espectro de inhibición de insectos obtenido.

[00196] Dicho agente tóxico adicional para controlar plagas de

coleópteros se puede seleccionar del grupo que consiste en una proteína inhibidora de insectos, tal como, sin limitación, Cry3Bb (US 6,501,009), variantes Cry1C, variantes Cry3A, Cry3, Cry3B, Cry34/35, 5307, AXMI-134 (US 2013/0167264), AXMI-184 (US 2010/0004176), AXMI-205 (US 2014/0298538), AXMI207 (US 2013/0303440), AXMI-218, AXMI-220 (US 2014/0245491), AXMI-221z, AXMI-223z (US 2014-0196175), AXMI-279 (US 2014/0223599), AXMI-R1 y variantes de las mismas (US 2010/0197592, TIC407, TIC417, TIC431, TIC807, TIC853, TIC901, TIC1201, TIC3131, DIG-10 (US 2010/0319092), eHIPs (US 2010/0017914), IP3 y variantes de las mismas (US 2012/0210462), y $\square$ -Hexatoxina-Hv1a (US 2014/0366227).

[00197] Dicho agente tóxico adicional para controlar plagas de hemípteros se puede seleccionar del grupo que consiste en proteínas activas en hemípteros, tales como, sin limitación, TIC1415 (US 2013/0097735), TIC807 (US 8.609.936), TIC834 (US 2013/0269060).), AXMI-036 (US 2010/0137216) y AXMI-171 (US 2013/0055469). Se pueden encontrar polipéptidos adicionales para el control de insectos coleópteros, Lepidópteros y hemípteros en las páginas web de nomenclatura de toxinas de *Bacillus thuringiensis* (http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/ y <https://www.bpprc.org/>).

[00198] Las secuencias codificantes de proteínas insecticidas quiméricas y las secuencias que tienen un porcentaje sustancial de identidad con proteínas insecticidas quiméricas se pueden identificar usando métodos conocidos por los expertos en la técnica tales como reacción en cadena de la polimerasa (PCR), amplificación térmica e hibridación. Por ejemplo, se pueden usar proteínas insecticidas quiméricas para producir anticuerpos que se unan específicamente a proteínas relacionadas y se pueden usar para buscar y encontrar otras proteínas que estén estrechamente relacionadas.

[00199] Además, las secuencias de nucleótidos que codifican proteínas insecticidas quiméricas se pueden usar como sondas y cebadores para el cribado para identificar otros miembros de la clase usando métodos de amplificación e hibridación de ciclos térmicos o isotérmicos. Por ejemplo, se pueden usar oligonucleótidos derivados de secuencias de cualquiera de las SEQ ID NO: 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95 o 96 para determinar la presencia o ausencia de un transgén insecticida quimérico en una muestra de ácido desoxirribonucleico derivada de un producto de bienes de consumo. Dada la sensibilidad de ciertos métodos de detección de ácidos nucleicos que emplean oligonucleótidos, se anticipa que los oligonucleótidos se derivarán de secuencias como se establece en cualquiera de las SEQ ID NO: 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95 o 96 pueden usarse para detectar un ácido nucleico que codifica una proteína insecticida quimérica truncada en productos vegetales de una planta transgénica.

EJEMPLOS

[00200] Considerando lo anterior, el experto en la técnica entenderá que las realizaciones descritas a continuación son simplemente representativas de la invención, que se pueden implementar de varias maneras. En consecuencia, los detalles estructurales y funcionales específicos aquí revelados no deben considerarse limitativos.

EJEMPLO 1

CREACIÓN DE SECUENCIAS CODIFICANTES DE PROTEÍNAS DE INSECTICIDA QUIMÉRICAS TRUNCADAS ACTIVAS CONTRA LEPIDOPTERA

[00201] Este Ejemplo ilustra la creación de proteínas insecticidas

quiméricas truncadas.

[00202] Se construyeron secuencias de ácido nucleico recombinantes a partir de genes Cry obtenidos a partir de la secuenciación de cepas de *Bacillus thuringiensis*. Inicialmente, los dominios de protoxina C-terminal se eliminaron de cada proteína Cry, generando las proteínas Cry parentales truncadas Cry1C (SEQ ID NO: 97), Cry1B (SEQ ID NO: 101), Cry1Ab (SEQ ID NO: 105), Cry1E (SEQ ID NO: 110), Cry1Da (SEQ ID NO: 114), Cry1Fb (SEQ ID NO: 118) y Cry2Aa (SEQ ID NO: 122). Luego se identificaron los dominios I, II y III mediante alineamientos de secuencias de proteínas con bases de datos de dominios de proteínas (Pfam o NCBI-BlastP). La Tabla 1 detalla las identificaciones de cada proteína Cry truncada y sus respectivos dominios. Se ensamblaron proteínas quiméricas truncadas combinando dominios como se ilustra en la Tabla 2. Las secuencias de polinucleótidos resultantes se sintetizaron con optimización de codones para la expresión en *Escherichia coli* y se clonaron en un vector plasmídico de expresión y se transformaron en *E. coli*. Se utilizaron preparaciones de proteínas expresadas en *E. coli* en bioensayos contra orugas y diversas plagas de Lepidópteros para verificar la actividad insecticida y la inhibición del crecimiento.

TABLA 1. PROTEÍNAS PESTICIDAS QUIMÉRICAS TRUNCADAS Y SUS COMPONENTES.

Proteína Cry	SEQ ID NO
Cry1C_T (Parental)	SEQ ID NO: 97
Cry1C_T_Dominio I	SEQ ID NO: 98
Cry1C_T_Dominio II	SEQ ID NO: 99
Cry1C_T_Dominio III	SEQ ID NO: 100
Cry1B_T (Parental)	SEQ ID NO: 101
Cry1B_T_Dominio I	SEQ ID NO: 102
Cry1B_T_Dominio II	SEQ ID NO: 103
Cry1B_T_Dominio III	SEQ ID NO: 104
Cry1Ab_T (Parental)	SEQ ID NO: 105
Cry1Ab_T_Dominio I	SEQ ID NO: 106
Cry1Ab_T_Dominio II	SEQ ID NO: 107

Cry1Ab_T_Dominio III_a*	SEQ ID NO: 108
Cry1Ab_T_Dominio III_b*	SEQ ID NO: 109
Cry1E_T (Parental)	SEQ ID NO: 110
Cry1E_T_Dominio I	SEQ ID NO: 111
Cry1E_T_Dominio II	SEQ ID NO: 112
Cry1E_T_Dominio III	SEQ ID NO: 113
Cry1Da_T (Parental)	SEQ ID NO: 114
Cry1Da_T_Dominio I	SEQ ID NO: 115
Cry1Da_T_Dominio II	SEQ ID NO: 116
Cry1Da_T_Dominio III	SEQ ID NO: 117
Cry1Fb_T (Parental)	SEQ ID NO: 118
Cry1Fb_T_Dominio I	SEQ ID NO: 119
Cry1Fb_T_Dominio II	SEQ ID NO: 120
Cry1Fb_T_Dominio III	SEQ ID NO: 121
Cry2Aa_T (Parental)	SEQ ID NO: 122
Cry2Aa_T_Dominio I	SEQ ID NO: 123
Cry2Aa_T_Dominio II	SEQ ID NO: 124
Cry2Aa_T_Dominio III	SEQ ID NO: 125

TABELA 2. PROTEÍNAS PESTICIDAS QUIMÉRICAS TRUNCADAS E SEUS COMPONENTES.

Proteína	SEQ ID NO:	Dominio I - SEQ ID NO/Proteína parental	Dominio II - SEQ ID NO/Proteína parental	Dominio III - SEQ ID NO/Proteína parental	Protoxina
EMS_Q1	1	98/Cry1C	99/Cry1C	104/Cry1B	ND
EMS_Q2	2	98/Cry1C	103/Cry1B	100/Cry1C	ND
EMS_Q3	3	98/Cry1C	103/Cry1B	104/Cry1B	ND
EMS_Q4	4	102/Cry1B	99/Cry1C	100/Cry1C	ND
EMS_Q5	5	102/Cry1B	99/Cry1C	104/Cry1B	ND
EMS_Q6	6	102/Cry1B	103/Cry1B	100/Cry1C	ND
EMS_Q7	7	106/Cry1Ab	107/Cry1Ab	104/Cry1B	ND
EMS_Q8	8	106/Cry1Ab	103/Cry1B	108/Cry1Ab_a	ND
EMS_Q9	9	106/Cry1Ab	103/Cry1B	104/Cry1B	ND
EMS_Q10	10	102/Cry1B	107/Cry1Ab	108/Cry1Ab_a	ND
EMS_Q11	11	102/Cry1B	107/Cry1Ab	104/Cry1B	ND
EMS_Q12	12	102/Cry1B	103/Cry1B	108/Cry1Ab_a	ND
EMS_Q13	13	106/Cry1Ab	107/Cry1Ab	113/Cry1E	ND
EMS_Q14	14	111/Cry1E	112/Cry1E	109/Cry1Ab_b	ND
EMS_Q15	15	111/Cry1E	107/Cry1Ab	113/Cry1E	ND
EMS_Q16	16	111/Cry1E	107/Cry1Ab	109/Cry1Ab_b	ND
EMS_Q17	17	106/Cry1Ab	112/Cry1E	113/Cry1E	ND
EMS_Q18	18	106/Cry1Ab	112/Cry1E	109/Cry1Ab_b	ND

Proteína	SEQ ID NO:	Dominio I - SEQ ID NO/Proteína parental	Dominio II - SEQ ID NO/Proteína parental	Dominio III - SEQ ID NO/Proteína parental	Protoxina
EMS_Q19	19	111/Cry1E	112/Cry1E	104/Cry1B	ND
EMS_Q20	20	111/Cry1E	103/Cry1B	113/Cry1E	ND
EMS_Q21	21	111/Cry1E	103/Cry1B	104/Cry1B	ND
EMS_Q22	22	102/Cry1B	112/Cry1E	113/Cry1E	ND
EMS_Q23	23	102/Cry1B	112/Cry1E	104/Cry1B	ND
EMS_Q24	24	102/Cry1B	103/Cry1B	113/Cry1E	ND
EMS_Q25	25	98/Cry1C	99/Cry1C	109/Cry1Ab_b	ND
EMS_Q26	26	98/Cry1C	107/Cry1Ab	100/Cry1C	ND
EMS_Q27	27	98/Cry1C	107/Cry1Ab	109/Cry1Ab_b	ND
EMS_Q28	28	106/Cry1Ab	99/Cry1C	100/Cry1C	ND
EMS_Q29	29	106/Cry1Ab	99/Cry1C	109/Cry1Ab_b	ND
EMS_Q30	30	106/Cry1Ab	107/Cry1Ab	100/Cry1C	ND
EMS_Q31	31	119/Cry1Fb	116/Cry1Da	117/Cry1Da	ND
EMS_Q32	32	115/Cry1Da	116/Cry1Da	121/Cry1Fb	ND
EMS_Q33	33	115/Cry1Da	120/Cry1Fb	117/Cry1Da	ND
EMS_Q34	34	115/Cry1Da	120/Cry1Fb	121/Cry1Fb	ND
EMS_Q35	35	119/Cry1Fb	116/Cry1Da	121/Cry1Fb	ND
EMS_Q36	36	119/Cry1Fb	120/Cry1Fb	117/Cry1Da	ND
EMS_Q37	37	111/Cry1E	112/Cry1E	100/Cry1C	ND
EMS_Q38	38	111/Cry1E	99/Cry1C	113/Cry1E	ND
EMS_Q39	39	111/Cry1E	99/Cry1C	100/Cry1C	ND
EMS_Q40	40	98/Cry1C	112/Cry1E	113/Cry1E	ND
EMS_Q41	41	98/Cry1C	112/Cry1E	100/Cry1C	ND
EMS_Q42	42	98/Cry1C	99/Cry1C	113/Cry1E	ND
EMS_Q43	43	123/Cry2Aa	124/Cry2Aa	100/Cry1C	ND
EMS_Q44	44	123/Cry2Aa	99/Cry1C	125/Cry2Aa	ND
EMS_Q45	45	123/Cry2Aa	99/Cry1C	100/Cry1C	ND
EMS_Q46	46	98/Cry1C	124/Cry2Aa	125/Cry2Aa	ND
EMS_Q47	47	98/Cry1C	124/Cry2Aa	100/Cry1C	ND
EMS_Q48	48	98/Cry1C	99/Cry1C	125/Cry2Aa	ND

EJEMPLO 2

TESTE PARA ACTIVIDAD DE LAS PROTEÍNAS QUIMÉRICAS TRUNCADAS CONTRA *S. FRUGIPERDA*

[00203] Este ejemplo ilustra la prueba de las proteínas quiméricas truncadas descritas en el Ejemplo 1 para determinar la actividad

insecticida contra *S. frugiperda*.

[00204] Las secuencias de polinucleótidos que codifican las proteínas quiméricas truncadas se expresaron en *E. coli* y se usaron en bioensayos con orugas neonatales de *S. frugiperda*. La actividad se determinó evaluando las puntuaciones de mortalidad o la inhibición del crecimiento larvario durante un período de 5 a 7 días de alimentación con una dieta artificial que contenía la preparación de proteína quimérica recombinante. La Tabla 3 ilustra los resultados de la actividad insecticida de cada proteína quimérica contra *S. frugiperda*. La actividad insecticida está representada por signos "+". El signo "-" indica que no se observó actividad insecticida y NT significa que la proteína no fue analizada. Se utilizaron como controles negativos agua destilada y *E. coli* que contenía el vector de expresión vacío. La mortalidad de los controles fue inferior al 15%.

TABELA 3 TABLA 3 ACTIVIDAD INSECTICIDA (MORTALIDAD O INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO) DE LAS PROTEÍNAS QUIMÉRICAS TRUNCADAS CONTRA *S. FRUGIPERDA* A PARTIR DE LA EXPRESIÓN EN *E. COLI*.

SEQ ID NO de la proteína	ID de la proteína	Actividad contra <i>S. frugiperda</i>
SEQ ID NO: 1	EMS_Q1	+
SEQ ID NO: 2	EMS_Q2	+
SEQ ID NO: 3	EMS_Q3	+
SEQ ID NO: 4	EMS_Q4	+
SEQ ID NO: 5	EMS_Q5	+
SEQ ID NO: 6	EMS_Q6	+
SEQ ID NO: 7	EMS_Q7	-
SEQ ID NO: 8	EMS_Q8	+
SEQ ID NO: 9	EMS_Q9	-
SEQ ID NO: 10	EMS_Q10	+
SEQ ID NO: 11	EMS_Q11	-
SEQ ID NO: 12	EMS_Q12	+
SEQ ID NO: 13	EMS_Q13	-
SEQ ID NO: 14	EMS_Q14	-
SEQ ID NO: 15	EMS_Q15	+
SEQ ID NO: 16	EMS_Q16	-

SEQ ID NO de la proteína	ID de la proteína	Actividad contra <i>S. frugiperda</i>
SEQ ID NO: 17	EMS_Q17	-
SEQ ID NO: 18	EMS_Q18	-
SEQ ID NO: 19	EMS_Q19	+
SEQ ID NO: 20	EMS_Q20	+
SEQ ID NO: 21	EMS_Q21	+
SEQ ID NO: 22	EMS_Q22	+
SEQ ID NO: 23	EMS_Q23	-
SEQ ID NO: 24	EMS_Q24	+
SEQ ID NO: 25	EMS_Q25	+
SEQ ID NO: 26	EMS_Q26	+
SEQ ID NO: 27	EMS_Q27	-
SEQ ID NO: 28	EMS_Q28	+
SEQ ID NO: 29	EMS_Q29	-
SEQ ID NO: 30	EMS_Q30	-
SEQ ID NO: 31	EMS_Q31	-
SEQ ID NO: 32	EMS_Q32	+
SEQ ID NO: 33	EMS_Q33	+
SEQ ID NO: 34	EMS_Q34	NT
SEQ ID NO: 35	EMS_Q35	+
SEQ ID NO: 36	EMS_Q36	-
SEQ ID NO: 37	EMS_Q37	+
SEQ ID NO: 38	EMS_Q38	-
SEQ ID NO: 39	EMS_Q39	-
SEQ ID NO: 40	EMS_Q40	-
SEQ ID NO: 41	EMS_Q41	-
SEQ ID NO: 42	EMS_Q42	+
SEQ ID NO: 43	EMS_Q43	+
SEQ ID NO: 44	EMS_Q44	NT
SEQ ID NO: 45	EMS_Q45	NT
SEQ ID NO: 46	EMS_Q46	-
SEQ ID NO: 47	EMS_Q47	-
SEQ ID NO: 48	EMS_Q48	+

EJEMPLO 3

SÍNTESIS DE GENES QUE CODIFICAN PROTEÍNAS INSECTICIDAS QUIMÉRICAS TRUNCADAS PARA SU EXPRESIÓN EN PLANTAS

[00205] Este Ejemplo ilustra la síntesis de polinucleótidos que codifican las proteínas insecticidas quiméricas para su expresión en plantas.

[00206] La modificación de codones de genes se realizó con la ayuda del software Optimizer (<http://genomes.urv.es/OPTIMIZER/Form.php>)

(Puigbo P., Guzman E. Romeu A. y García-Vallve S 2007 OPTIMIZER: Un servidor web para optimizar el uso de codones de secuencias de ADN. *Nucleic Acids Research*, 35:W126-W131), dirigido a los codones más compatibles con el maíz (*Zea mays*), y las secuencias fueron enviadas digitalmente para su síntesis comercial. El gen optimizado se sintetizó en el plasmídeo pBS y se clonó en el vector binario p7i2x-UibZm (<https://dna-cloning.com/binaries/>). Las secuencias sintetizadas se confirmaron mediante secuenciación, de acuerdo con técnicas estándar.

TABELA 4. SECUENCIAS DE POLINUCEOTIDAS QUE CODIFICAN NUEVAS PROTEÍNAS QUIMÉRICAS PARA SU EXPRESIÓN EN PLANTAS.

ID de la proteína	SEQ ID NO: de quimera	SEQ ID NO: de ADN
EMS_Q1	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 49
EMS_Q2	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 50
EMS_Q3	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 51
EMS_Q4	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 52
EMS_Q5	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 53
EMS_Q6	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 54
EMS_Q7	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 55
EMS_Q8	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 56
EMS_Q9	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 57
EMS_Q10	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 58
EMS_Q11	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 59
EMS_Q12	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 60
EMS_Q13	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 61
EMS_Q14	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 62
EMS_Q15	SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 63
EMS_Q16	SEQ ID NO: 16	SEQ ID NO: 64
EMS_Q17	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 65
EMS_Q18	SEQ ID NO: 18	SEQ ID NO: 66
EMS_Q19	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 67
EMS_Q20	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 68
EMS_Q21	SEQ ID NO: 21	SEQ ID NO: 69
EMS_Q22	SEQ ID NO: 22	SEQ ID NO: 70
EMS_Q23	SEQ ID NO: 23	SEQ ID NO: 71
EMS_Q24	SEQ ID NO: 24	SEQ ID NO: 72
EMS_Q25	SEQ ID NO: 25	SEQ ID NO: 73
EMS_Q26	SEQ ID NO: 26	SEQ ID NO: 74
EMS_Q27	SEQ ID NO: 27	SEQ ID NO: 75
EMS_Q28	SEQ ID NO: 28	SEQ ID NO: 76
EMS_Q29	SEQ ID NO: 29	SEQ ID NO: 77

ID de la proteína	SEQ ID NO: de quimera	SEQ ID NO: de ADN
EMS_Q30	SEQ ID NO: 30	SEQ ID NO: 78
EMS_Q31	SEQ ID NO: 31	SEQ ID NO: 79
EMS_Q32	SEQ ID NO: 32	SEQ ID NO: 80
EMS_Q33	SEQ ID NO: 33	SEQ ID NO: 81
EMS_Q34	SEQ ID NO: 34	SEQ ID NO: 82
EMS_Q35	SEQ ID NO: 35	SEQ ID NO: 83
EMS_Q36	SEQ ID NO: 36	SEQ ID NO: 84
EMS_Q37	SEQ ID NO: 37	SEQ ID NO: 85
EMS_Q38	SEQ ID NO: 38	SEQ ID NO: 86
EMS_Q39	SEQ ID NO: 39	SEQ ID NO: 87
EMS_Q40	SEQ ID NO: 40	SEQ ID NO: 88
EMS_Q41	SEQ ID NO: 41	SEQ ID NO: 89
EMS_Q42	SEQ ID NO: 42	SEQ ID NO: 90
EMS_Q43	SEQ ID NO: 43	SEQ ID NO: 91
EMS_Q44	SEQ ID NO: 44	SEQ ID NO: 92
EMS_Q45	SEQ ID NO: 45	SEQ ID NO: 93
EMS_Q46	SEQ ID NO: 46	SEQ ID NO: 94
EMS_Q47	SEQ ID NO: 47	SEQ ID NO: 95
EMS_Q48	SEQ ID NO: 48	SEQ ID NO: 96

EJEMPLO 4.

CASSETTES DE EXPRESIÓN PARA LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS INSECTICIDAS QUIMÉRICAS EN PLANTAS

[00207] Este ejemplo ilustra la construcción de casetes de expresión que comprenden secuencias de polinucleótidos para su uso en plantas que codifican proteínas insecticidas quiméricas truncadas.

[00208] Se construyeron diversos casetes de expresión de plantas con las secuencias de polinucleótidos enumeradas en la Tabla 4. Los genes optimizados se insertaron en el vector binario p7i2x-UibZm (<https://dna-cloning.com/binaries/>) que contiene el promotor de el gen de la ubiquitina del maíz (*ubi*) y el terminador del gen de la nopalina sintasa (*nos*), generando una serie de plásmidos diseñados para permitir que la proteína se traduzca y permanezca en el citosol de la planta. Los plásmidos resultantes que contienen los genes que codifican las proteínas quiméricas se usaron para transformar la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* EHA101 mediante electroporación (BioRad/MicroPulser). Las bacterias transformadas, que contenían los casetes de expresión, se utilizaron en la transformación genética del

maíz.

EJEMPLO 5

ACTIVIDAD DE LEPIDÓPTERA DE PROTEÍNAS INSECTICIDAS QUIMÉRICAS EN MAÍZ PROCESADO ESTABLEMENTE

[00209] Este ejemplo ilustra la prueba de las nuevas proteínas quiméricas descritas en el Ejemplo 1, expresadas en maíz, para determinar la actividad insecticida contra plagas de Lepidópteros en plantas.

[00210] De los vectores de transformación contruidos y descritos en el Ejemplo 4, se seleccionó el que contiene la secuencia polinucleotídica SEQ ID NO: 54 para la transformación de la variedad de maíz Hill (Armstrong CL, Grenn CE, Phillips RL (1991). Development and availability of germplasm with high type II culture formation response. Maize Genet. Coop. Newsl. 65:92-93). El protocolo de transformación fue el descrito por Frame *et al.* *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of maize embryos using a standard binary vector system. Plant Physiol. 2002 May;129(1):13-22, con modificaciones menores. Brevemente, para la transformación de este genotipo, se recolectaron embriones inmaduros de entre 1,8 y 2,0 mm de longitud (10 a 12 días después de la polinización). Las mazorcas utilizadas para la recolección de embriones se sumergieron en una solución 1:1 de lejía comercial (hipoclorito de sodio al 2,5%) y agua destilada con 1-2 gotas de Tween 20 durante 20 minutos. Luego se enjuagaron con agua destilada estéril durante 5 minutos, dos veces.

[00211] Los embriones inmaduros se recogieron con la ayuda de una espátula a partir de un corte superficial en los granos. Para transferir la construcción genética al maíz, se utilizó *Agrobacterium tumefaciens* EHA101. A partir de un cultivo madre de *A. tumefaciens* que contenía la construcción genética de interés, conservado en glicerol a -80 °C, se hizo una racha em médio YEP (5 g.L⁻¹ de extracto de levedura; 10 g.L⁻¹

¹ de peptona; 5 g.L⁻¹ de NaCl; 15 g.L⁻¹ de bactoagar) que contenía los antibióticos necesarios (espectinomicina 100 mg.L⁻¹ Y 50 mg.L⁻¹ kanamicina) y se incubó la placa durante 2 a 3 días a 28 °C placa madre).

[00212] Para la transformación genética, se realizó una raya de *Agrobacterium* em medio YEP que contenía los antibióticos necesarios, utilizando una colonia aislada de la placa madre. La placa se incubó durante 2 a 5 días a 19 °C. Luego, se resuspendió *Agrobacterium* foi resuspendida en medio de infección (4,0 g.L⁻¹ de N6 sais; 68,4 g.L⁻¹ de sacarosa; 36,0 g.L⁻¹ de glucosa; 0,7 g.L⁻¹ de prolina; 1,5 mg.L⁻¹ de 2,4-D; 1,0 mL.L⁻¹ N6 vitaminas (1000X = 1,0 g.L⁻¹ de tiamina HCl; 0,5 g.L⁻¹ de piridoxina HCl; 0,5 g.L⁻¹ ácido nicotínico); pH 5,2) suplementado com 100 µM de acetoseringona hasta alcanzar uma OD550 = 0,3-0,4 y se incubaron en un agitador a aproximadamente 150 rpm, 23 °C por 2 horas.

[00213] Para la infección de embriones de maíz inmaduros, se recogieron de 50 a 100 embriones en 1 mL de medio de infección más acetosiringona. Después de la recolección, los embriones se enjuagaron dos veces, se añadió 1 mL de cultivo bacteriano y la suspensión se incubó durante cinco minutos a 23 °C. Después de la infección, los embriones fueron transferidos a la superficie de medio de cocultivo (4,0 g.L⁻¹ de sales N6; 1,5 mg.L⁻¹ de 2,4-D; 30,0 g.L⁻¹ de sacarosa; 0,7 g.L⁻¹ de prolina; 1,0 mL.L⁻¹ N6 vitaminas (1000X); 0,85 mg.L⁻¹ de AgNO₃; 100 µM de acetoseringona; 300 mg.L⁻¹ de L-cisteína; 3,0 g.L⁻¹ de phytigel; pH 5,8) con el escutelo hacia arriba. Las placas se incubaron en la oscuridad a 20°C durante 3 a 5 días. Luego del cocultivo, los embriones fueron transferidos a medio de reposo (4,0 g.L⁻¹ de sales N6; 1,5 mg.L⁻¹ de 2,4-D; 30,0 g.L⁻¹ de sacarose; 0,5 g.L⁻¹ de MES; 0,7 g.L⁻¹ de prolina; 1,0 mL.L⁻¹ N6 vitaminas (1000X); 0,85 mg.L⁻¹ de AgNO₃; 100 mg.L⁻¹ de Tioxina; 3,0 g.L⁻¹ de phytigel; pH 5,8) a 28°C

(oscuro) por 7 a 15 días. Luego, los embriones fueron transferidos al medio de selección (4,0 g.L⁻¹ de sales N6; 1,5 mg.L⁻¹ de 2,4-D; 30,0 g.L⁻¹ de sacarosa; 0,5 g.L⁻¹ de MES; 0,7 g.L⁻¹ de prolina; 1,0 mL.L⁻¹ N6 vitaminas (1000X); 0,85 mg.L⁻¹ de AgNO₃; 100 mg.L⁻¹ de Tioxina; 1,5 e 3,0 mg/L de bialafos; 3,0 g.L⁻¹ de phytigel; pH 5,8) (25 embriones/placa). Se realizan subcultivos de estos embriones en medio selectivo cada 15 días hasta que el callo seleccionado crezca vigorosamente.

[00214] Los callos seleccionados se transfirieron a medio de regeneración (4,62 g.L⁻¹ de sales MS; 60,0 g.L⁻¹ de sacarosa; 100 mg.L⁻¹ de mioinositol; 1,0 mL.L⁻¹ de vitaminas MS (1000X); 1,5 mg/L de bialafos; 4,0 g.L⁻¹ de phytigel; pH 5,8) se incubaron a 26 ± 2 °C (oscuro) por 15 a 21 días. Callos listos para germinar, de apariencia seca y color blanco opaco, se transfirieron al medio de germinación (4,62 g.L⁻¹ de sales MS; 30,0 g.L⁻¹ de sacarosa; 100 mg.L⁻¹ de mioinositol; 1,0 mL.L⁻¹ de vitaminas MS (1000X = 0,5 g.L⁻¹ de tiamina HCl; 0,5 g.L⁻¹ de piridoxina HCl; 0,05 g.L⁻¹ ácido nicotínico); 3,0 g.L⁻¹ de phytigel; pH 5,8) (12 callos por placa), 25 °C, 80-100 µE/m²/sec de intensidad luminosa, 16 horas de fotoperiodo). Las plántulas con hojas y raíces se transfirieron al invernadero en un plazo de 14 a 20 días.

[00215] Cuando las raíces estuvieron bien desarrolladas y las estructuras foliares midieron aproximadamente 5 cm de longitud, las plántulas se trasplantaron a macetas en un invernadero que contenía una mezcla de tierra y materia orgánica (2/3 de tierra y 1/3 de materia orgánica) (TDP 30/15) producido comercialmente.

[00216] Se utilizaron plantas de maíz genéticamente modificadas que contenían el gen que codifica la proteína quimérica (SEQ ID NO: 6) para pruebas de infestación en el campo y en invernadero, así como para bioensayos de alimentación en orugas con hojas desprendidas.

[00217] En la prueba de invernadero, se plantaron 44 macetas que

contenían eventos de maíz que contenían la secuencia codificante para la proteína quimérica EMS_Q6 (SEQ ID NO: 6). Se añadió maíz L3 no transgénico como control negativo (C-) y un maíz transgénico comercial con resistencia a *S. frugiperda* como control positivo (C+). El ensayo se infestó artificialmente con orugas neonatales de *S. frugiperda* en la etapa V4-V6 de desarrollo del maíz y las plantas se evaluaron mediante puntuaciones de daño a los 13 días después de la infestación en la escala de Davis (Davis, *et. al.* 1992), donde se nota 0 no representa ningún daño visible y la puntuación 9 representa la planta completamente destruida). La Figura 1 ilustra el resultado de las puntuaciones de lesión, en la que una serie de eventos que expresan la proteína quimérica EMS_Q6 presentaron una puntuación de lesión de 0, al igual que los vasos comerciales de control positivo, mientras que los controles negativos presentaron puntuaciones de lesión de 8 a 9.

[00218] En la prueba de campo, se plantaron 22 eventos (Ev1 a Ev22) de maíz que contenía la secuencia codificante para la proteína quimérica EMS_Q6 (SEQ ID NO: 6), dos controles positivos (maíz transgénico comercial resistente a *S. frugiperda*) y dos controles negativos (maíz no transgénico). El ensayo se infestó artificialmente con orugas neonatales de *S. frugiperda* en la etapa V4-V6 de desarrollo del maíz y las plantas se evaluaron mediante puntuaciones de daño a los 7, 14 y 21 días después de la infestación en la escala de Davis (Davis, F. M.; NG, S.; Williams, W. P. 1992. Visual rating scales for screening whole-stage corn resistance to fall armyworm. Mississippi: Mississippi State University, Technical Bulletin, v. 186. 9p), donde una puntuación de 0 representa ningún daño visible y una puntuación de 9 representa la planta completamente destruida). La Figura 2 ilustra el resultado de las puntuaciones de lesiones representadas por la media aritmética entre las 3 evaluaciones. Se observa que la mayoría de los eventos transgénicos que contienen la proteína EMS_Q6 obtuvieron

puntuaciones promedio más bajas que los controles negativos y algunos de ellos obtuvieron puntuaciones más bajas que los productos transgénicos comerciales evaluados. La Figura 3 ilustra una fotografía representativa del daño causado por *S. frugiperda* en una planta control, en comparación con una planta transgénica que expresa la proteína quimérica EMS_Q6 (SEQ ID NO: 6). Se observa que la planta de maíz transgénico no presenta daños, mientras que la planta de maíz convencional muestra daños foliares evidentes provocados por el ataque de *S. frugiperda*.

[00219] También se llevó a cabo un bioensayo en laboratorio con infestación de hojas desprendidas de uno de los eventos de maíz que contiene la secuencia codificante para la proteína quimérica EMS_Q6 (SEQ ID NO: 6) y un control de maíz no transgénico. Para realizar esta prueba se utilizaron hojas intactas de aproximadamente 15 cm de largo, procedentes de uno de los eventos que contenían la proteína quimérica EMS_Q6 (SEQ ID NO: 6) y un control negativo (C-), plantadas en invernadero. Las hojas se enrollaron individualmente y se colocaron en vasos de plástico transparentes de 50 ml. Se colocaron 15 orugas neonatales de *S. frugiperda* en cada hoja y las copas se colocaron en una cámara climáticamente controlada con temperatura constante de 25°C, 70% de humedad y un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. Después de 5 días, se evaluó el número de orugas vivas presentes en cada copa. La Figura 4 ilustra el resultado del bioensayo. Se observa que en la hoja de maíz que expresa la proteína EMS_Q6 hubo mortalidad total de las orugas y ningún daño en la hoja. En el maíz testigo hubo daños evidentes por la alimentación y la presencia de orugas vivas y bien desarrolladas.

[00220] Todas las composiciones divulgadas y reivindicadas en el presente documento se pueden preparar y realizar sin experimentación indebida a la luz de la presente divulgación. Aunque las composiciones

de esta invención se han descrito en términos de las realizaciones ilustrativas anteriores, será evidente para los expertos en la técnica que se pueden aplicar variaciones, cambios, modificaciones y alteraciones a las composiciones descritas en el presente documento sin apartarse del verdadero concepto, esencia y alcance de la invención divulgación. Más específicamente, será evidente que ciertos agentes que están química y fisiológicamente relacionados pueden sustituirse por los agentes descritos en el presente documento mientras se lograrían resultados iguales o similares. Todos estos sustitutos y modificaciones similares evidentes para los expertos en la técnica se consideran dentro de la esencia, alcance y concepto de la invención tal como se define en las reivindicaciones adjuntas.

[00221] Todas las publicaciones y documentos de patente publicados en la especificación se incorporan aquí como referencia en su totalidad como si cada publicación o solicitud de patente individual estuviera específica o individualmente indicada para incorporarse como referencia.