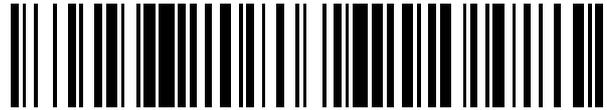


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 538 686**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/82** (2006.01)

**C07K 14/325** (2006.01)

**A01N 63/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.07.2011 E 11736494 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.04.2015 EP 2591110**

54 Título: **Control de plagas de insectos coleópteros**

30 Prioridad:

**07.07.2010 US 362109 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**23.06.2015**

73 Titular/es:

**SYNGENTA PARTICIPATIONS AG (100.0%)  
Schwarzwaldallee 215  
4058 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**GRASER, GERSON y  
BOUDREAU, ERIC**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**ES 2 538 686 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Control de plagas de insectos coleópteros

## CAMPO DE LA INVENCIÓN

5 La presente invención se refiere, en general, al control de plagas que provocan daños a plantas de cultivo debido a sus actividades alimentarias y, más particularmente, al control de plagas de coleópteros con composiciones que comprenden niveles sinérgicos de una toxina proteica activa contra coleópteros y una toxina proteica activa contra lepidópteros. La invención se refiere además a las composiciones y los métodos que emplean dichas composiciones que comprenden las toxinas proteicas.

## 10 ANTECEDENTES

15 Los insectos coleópteros se consideran una de las plagas más importantes de las plantas de cultivo. Por ejemplo, las especies de gusanos de las raíces del maíz son las plagas más destructivas del maíz que provocan pérdidas estimadas superiores a mil millones de dólares americanos al año. Las especies de plagas de gusanos de las raíces del maíz importantes incluyen *Diabrotica virgifera virgifera*, el gusano de las raíces del maíz del oeste; *D. longicornis barberi*, el gusano de las raíces del maíz del norte, *D. undecimpunctata howardi*, el gusano de las raíces del maíz del sur, y *D. virgifera zaeae*, el gusano de las raíces del maíz mexicano. El escarabajo de la papa de Colorado (EPC; *Leptinotarsa decemlineata*) es otro ejemplo de un insecto coleóptero que es una plaga importante de la papa, el tomate y la berenjena a nivel mundial.

20 Las plagas de coleópteros se controlan principalmente mediante aplicaciones intensivas de pesticidas químicos, que son activos mediante la inhibición del crecimiento de los insectos, la prevención de la alimentación o reproducción de los insectos, o provocan su muerte. Se puede lograr de esta forma un buen control de los insectos, pero, a veces, estos productos químicos pueden afectar también a otros insectos beneficiosos. Otro problema derivado de la extensa utilización de pesticidas químicos es la aparición de cepas de insectos resistentes. Esto se ha atenuado parcialmente mediante diversas prácticas de gestión agrícola, pero existe una creciente necesidad de agentes alternativos para el control de plagas.

30 Las proteínas Cry de *Bacillus thuringiensis* (Bt) (denominadas también  $\delta$ -endotoxinas) son proteínas que forman una matriz cristalina en *Bacillus* que se sabe que poseen actividad insecticida cuando son ingeridas por ciertos insectos. Se han identificado y denominado más de 180 proteínas Cry holotípicas en 58 familias. Las diferentes proteínas Cry han sido clasificadas según su espectro de actividad y homología secuencial. Hasta 1990, las clases principales fueron definidas por su espectro de actividad (Hofte and Whitely, 1989, Microbiol. Rev. 53:242-255), pero más recientemente se desarrolló una nueva nomenclatura que clasifica sistemáticamente las proteínas Cry en función de la homología entre secuencias de aminoácidos en vez de en función de sus especificidades para insectos diana (Crickmore *et al.* 1998, Microbiol. Molec. Biol. Rev. 62:807-813).

40 Se han aislado genes que codifican proteínas Cry y se ha demostrado que su expresión en plantas de cultivo proporciona otra herramienta para controlar de forma económica plagas de insectos importantes. Estas plantas transgénicas que expresan proteínas Cry se comercializan, lo cual permite que los agricultores reduzcan o aumenten las aplicaciones de agentes químicos para el control de insectos. Las proteínas Cry activas contra coleópteros útiles en plantas transgénicas incluyen, por ejemplo, Cry3A, Cry3B y el complejo Cry34/Cry35. Los ejemplos de proteínas Cry activas contra lepidópteros que han sido expresadas en plantas transgénicas incluyen, por ejemplo, Cry1A (p. ej., Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac), Cry1B, Cry1F y Cry2, entre otras.

45 También se ha identificado otra familia de proteínas insecticidas producidas por la especie *Bacillus* durante su estado vegetativo de crecimiento (proteínas insecticidas vegetativas (Vip)). Las Patentes de EE. UU. 5.877.012, 6.107.279 y 6.137.033 describen una nueva clase de proteínas insecticidas denominada Vip3. Otros informes, incluidos WO 98/18932, WO 98/33991, WO 98/00546 y WO 99/57282, también han identificado homólogos de la clase Vip3 de proteínas. Las secuencias codificantes de Vip3 codifican proteínas de aproximadamente 88 kDa que poseen actividad insecticida contra un amplio espectro de plagas de lepidópteros, incluidos, pero sin limitarse a, el gusano cortador negro (GCN, *Agrotis ipsilon*), gusano soldado de otoño (GSO, *Spodoptera frugiperda*), gusano de las yemas del tabaco (GYT, *Heliothis virescens*), barrenador de la caña de azúcar, (BCA, *Diatraea saccharalis*), barrenador menor del tallo del maíz (BMM, *Elasmopalpus lignosellus*) y gusano de la mazorca del maíz (GMM, *Helicoverpa zea*), y cuando se expresan en plantas transgénicas, por ejemplo, el maíz (*Zea mays*), confieren protección a la planta contra los daños producidos por la alimentación de insectos.

60 Se siguen necesitando composiciones y métodos para utilizar dichas composiciones con actividad insecticida, por ejemplo, para utilizar en la protección de cultivos o el control de enfermedades mediadas por insectos. Se requieren nuevas composiciones para superar el problema que supone la resistencia a los insecticidas existentes o prevenir el desarrollo de resistencia a los tratamientos con plantas transgénicas existentes. Lo ideal sería que estas

composiciones tuvieran una elevada toxicidad y fueran eficaces cuando la plaga diana las ingiriera por vía oral. Por lo tanto, una invención que proporcionara composiciones en las que se mejorase cualquiera de estas propiedades representaría un avance en la técnica.

5 **RESUMEN**

La presente invención proporciona métodos mejorados para controlar una plaga de insectos coleópteros que comprenden aplicar sobre el lugar en el que un insecto coleóptero se pudiera alimentar una cantidad sinérgicamente eficaz de al menos una toxina activa contra coleópteros y al menos una toxina activa contra lepidópteros, donde la proteína activa contra coleópteros es una proteína Cry3A modificada y donde la proteína activa contra lepidópteros es una proteína Cry1Ab.

**DEFINICIONES**

15 A efectos de claridad, se definen y presentan algunos términos usados en la descripción como se indica a continuación:

"Actividad" significa que las toxinas proteicas y las combinaciones de tales toxinas funcionan como agentes para el control de insectos oralmente activos, producen un efecto tóxico o son capaces de interrumpir o impedir la alimentación de los insectos, que pueden o no provocar la muerte de los insectos. Cuando se suministra una composición de la invención al insecto, el resultado suele ser la muerte del insecto o que el insecto no se alimente de la fuente que pone la composición a disposición del insecto. Dicha composición puede ser una planta transgénica que expresa las combinaciones de toxinas de la invención. Un ejemplo es una planta de maíz transgénica que expresa una proteína Cry3A y una proteína Cry1Ab modificadas, que producen una actividad sinérgica contra la alimentación del gusano de las raíces del maíz en la planta de maíz transgénica.

El "control" o "controlar" insectos significa inhibir, a través de un efecto tóxico, la capacidad de las plagas de insectos para sobrevivir, crecer, alimentarse y/o reproducirse, o limitar las pérdidas o los daños relacionados con los insectos en las plantas de cultivo. El "control" de insectos puede o no significar exterminar los insectos, aunque preferiblemente significa exterminar los insectos.

Como se utiliza en la presente, el término "maíz" quiere decir *Zea mays* e incluye todas las variedades de plantas que se pueden cruzar con el maíz, incluidas las especies de maíz naturales.

El "suministro" o "suministrar" una composición o toxina significa que la composición o toxina entra en contacto con un insecto, lo cual produce un efecto tóxico y el control del insecto. La composición o toxina puede ser suministrada en muchas formas reconocidas, p. ej., por vía oral mediante la ingestión por parte del insecto, a través de la expresión de una planta transgénica, una o más composiciones proteicas formuladas, una o más composiciones proteicas pulverizables, una matriz de cebo o cualquier otro sistema de suministro de toxinas reconocido en la técnica.

"Cantidad eficaz para controlar insectos" significa la concentración de una o más toxinas que inhibe, a través de un efecto tóxico, la capacidad de los insectos para sobrevivir, crecer, alimentarse y/o reproducirse, o que limita las pérdidas o los daños relacionados con los insectos en las plantas de cultivo. La "cantidad eficaz para controlar insectos" puede o no significar exterminar los insectos, aunque preferiblemente significa exterminar los insectos.

"Casete de expresión", como se utiliza en la presente, significa una secuencia de ácido nucleico capaz de dirigir la expresión de una secuencia de ácido nucleico particular en una célula huésped adecuada, que comprende un promotor unido operablemente a la secuencia de ácido nucleico de interés la cual está unida operablemente a señales de terminación. También comprende normalmente las secuencias necesarias para la correcta traducción de la secuencia de ácido nucleico. El casete de expresión que comprende la secuencia de ácido nucleico de interés puede ser quimérico, esto quiere decir que al menos uno de sus componentes es heterólogo con respecto a al menos uno de sus otros componentes. El casete de expresión también puede ser de origen natural, pero que se ha obtenido en una forma recombinante útil para la expresión heteróloga. Sin embargo, normalmente el casete de expresión es heterólogo con respecto al huésped, es decir, la secuencia de ácido nucleico particular del casete de expresión no se encuentra de forma natural en la célula huésped y debe haber sido introducido en la célula huésped o en un antecesor de la célula huésped mediante un evento de transformación. La expresión de la secuencia de ácido nucleico en el casete de expresión puede estar controlada por un promotor constitutivo o un promotor inducible que inicia la transcripción sólo cuando la célula huésped se expone a algunos estímulos externos particulares. En el caso de un organismo pluricelular, tal como una planta, el promotor también puede ser específico para un tejido u órgano particular, o una etapa de desarrollo.

"Evento MIR604" o "MIR604" se refiere a un evento de maíz transgénico, descrito en la Patente de EE. UU. 7.361.813, que ha incorporado a su genoma un transgen *cry3A055*, descrito en la Patente de EE. UU. 7.230.167, y

- 5 un transgen *pmi*, descrito en la Patente de EE. UU. N.º 5.767.378. Por lo tanto, MIR604 comprende un primer transgen que codifica una proteína Cry3A055 insecticida (Cry3A o mCry3A modificada), útil para controlar plagas del gusano de las raíces del maíz (*Diabrotica spp.*), y un segundo transgen que codifica una enzima fosfomanosa isomerasa (PMI, por sus siglas en inglés), útil como marcador seleccionable, y que permite que una planta de maíz utilice manosa como fuente de carbono.
- 10 "Evento MIR162" o "MIR162" se refiere al evento de maíz transgénico descrito en la Publicación Internacional N.º WO 07/142840 que ha incorporado a su genoma un transgen *vip3Aa20* y un transgen *pmi*. Por lo tanto, MIR162 comprende un primer transgen que codifica una proteína Vip3Aa20 insecticida, útil para controlar plagas de insectos lepidópteros, y un segundo transgen que codifica una enzima fosfomanosa isomerasa (PMI), útil como marcador seleccionable, y que permite que una planta de maíz utilice manosa como fuente de carbono.
- 15 "Evento Bt11" o "Bt11" se refiere al evento de maíz transgénico descrito en la Patente de EE. UU. 6.114.608 que ha incorporado a su genoma un transgen *cry1Ab* y un transgen *pat*. Por lo tanto, Bt11 comprende un primer transgen que codifica una proteína Cry1Ab insecticida, útil para controlar plagas de insectos lepidópteros, y un segundo transgen que codifica una enzima PAT, útil como marcador seleccionable, y que confiere tolerancia a herbicidas a la planta de maíz.
- 20 Un "gen" es una región definida que está situada dentro de un genoma y que, además de la secuencia de ácido nucleico codificante mencionada anteriormente, comprende otras secuencias de ácido nucleico, principalmente reguladoras, responsables del control de la expresión, es decir, la transcripción y la traducción, de la parte codificante. Un gen también puede comprender otras secuencias 5' y 3' no traducidas, y secuencias de terminación. Otros elementos que pueden estar presentes son, por ejemplo, los intrones.
- 25 "Gen de interés" se refiere a todo gen que, cuando se transfiere a una planta, confiere a la planta una característica deseada, tal como resistencia a antibióticos, resistencia a virus, resistencia a insectos, resistencia a enfermedades o resistencia a otras plagas, tolerancia a herbicidas, un mejor valor nutricional, un mejor rendimiento en un proceso industrial o capacidad reproductora alterada. El "gen de interés" también puede ser aquel que se transfiere a las plantas para producir enzimas o metabolitos de valor comercial en la planta.
- 30 Como se utiliza en la presente, el término "productor" se refiere a una persona o entidad que se dedica a la agricultura, explotando organismos vivos, tales como plantas de cultivo, para obtener alimentos y materias primas.
- 35 Una secuencia de ácido nucleico "heteróloga" es una secuencia de ácido nucleico asociada de forma no natural con una célula huésped en la cual se introduce, que incluye copias múltiples que no son de origen natural de una secuencia de ácido nucleico de origen natural.
- 40 Una secuencia de ácido nucleico "homóloga" es una secuencia de ácido nucleico asociada de forma natural con una célula huésped en la cual se introduce.
- "Insecticida" se define como una actividad biológica tóxica capaz de controlar insectos, preferentemente exterminándolos.
- 45 Una molécula de ácido nucleico "aislada" o una proteína aislada es una molécula de ácido nucleico o proteína que, debido a la intervención humana, existe en un entorno diferente de su entorno nativo y, por lo tanto, no es un producto natural. Una molécula de ácido nucleico o proteína aislada puede existir en una forma purificada o puede existir en un entorno no nativo tal como, por ejemplo, una célula huésped recombinante. Por ejemplo, una proteína Cry nativa en *Bacillus thuringiensis* no está aislada, pero la misma proteína Cry en una planta transgénica está aislada.
- 50 "Cry3A modificada (mCry3A)" se refiere a un gen o a una proteína descrita en la Patente de EE. UU. N.º 7.030.295, publicada el 18 de abril de 2006, útil para controlar plagas del gusano de las raíces del maíz (*Diabrotica spp.*).
- 55 Una "molécula de ácido nucleico" o "secuencia de ácido nucleico" es un segmento lineal de ADN o ARN mono- o bicatenario que se puede aislar de cualquier fuente. En el contexto de la presente invención, la molécula de ácido nucleico o la secuencia de ácido nucleico es preferentemente un segmento de ADN.
- Una "planta" es cualquier planta en cualquier etapa de desarrollo, en particular, una planta de semillas.
- 60 Una "célula vegetal" es una unidad estructural y fisiológica de una planta, que comprende un protoplasto y una pared celular. La célula vegetal puede estar en forma de una única célula aislada o una célula cultivada, o como una parte de una unidad más organizada tal como, por ejemplo, un tejido vegetal, un órgano vegetal o una planta entera.
- "Cultivo de células vegetales" significa los cultivos de unidades vegetales tales como, por ejemplo, protoplastos,

células de cultivo celular, células en los tejidos vegetales, polen, tubos polínicos, óvulos, sacos embrionarios, cigotos y embriones en diferentes etapas de desarrollo.

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

Un "órgano vegetal" es una parte distintiva visiblemente diferenciada y estructurada de una planta tal como una raíz, tallo, hoja, yema de la flor o embrión.

10 "Tejido vegetal", tal como se utiliza en la presente, significa un grupo de células vegetales organizadas en una unidad estructural y funcional. Quedan incluidos todos los tejidos vegetales *in planta* o en cultivo. Este término incluye, pero no se limita a, plantas enteras, órganos vegetales, semillas de las plantas, el cultivo tisular y cualesquiera grupos de células vegetales organizadas en unidades estructurales y/o funcionales. El uso de este término junto con, o en ausencia de, cualquier tipo específico de tejido vegetal, como los que se indican anteriormente o que estén contemplados por esta definición, no pretende ser exclusivo para cualquier otro tipo de tejido vegetal.

20 "Transformación" es un proceso para introducir ácido nucleico heterólogo en una célula u organismo huésped. En particular, "transformación" significa la integración estable de una molécula de ADN al genoma de un organismo de interés.

25 "Transformado/transgénico/recombinante" se refiere a un organismo huésped, tal como una bacteria o una planta, en el que se ha introducido una molécula de ácido nucleico heteróloga. La molécula de ácido nucleico se puede integrar de forma estable al genoma del huésped o la molécula de ácido nucleico también puede estar presente como una molécula extracromosómica. Dicha molécula extracromosómica puede autoreplicarse. Se sobreentenderá que las células, los tejidos o las plantas transformadas no engloban únicamente el producto final de un proceso de transformación, sino también la progenie transgénica de este. Un huésped "no transformado", "no transgénico" o "no recombinante" se refiere a un organismo natural, por ejemplo, una bacteria o planta, que no contiene la molécula de ácido nucleico heteróloga.

30 La clase "Vip3" de proteínas comprende, por ejemplo, Vip3Aa, Vip3Ab, Vip3Ac, Vip3Ad, Vip3Ae, Vip3Af, Vip3Ag, Vip3Ba y Vip3Bb, y sus homólogos. "Homóloga/o" quiere decir que la proteína o el polipéptido indicado guarda una relación definida con otros miembros de la clase Vip3 de proteínas. "Vip3Aa20" (N.º de acceso a GenBank DQ539888) es un homólogo de Vip3 exclusivo del evento MIR162. Fue generado por mutaciones espontáneas introducidas en el gen *vip3Aa19* optimizado para el maíz (N.º de acceso a GenBank DQ539887) durante el proceso de transformación de la planta.

40 La nomenclatura utilizada en la presente para bases de y aminoácidos de ADN es como la expuesta en 37 C.F.R. § 1.822.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA

45 Esta invención se refiere a métodos para controlar sinérgicamente una plaga de insectos coleópteros que comprenden aplicar sobre el lugar en el que un insecto coleóptero se pudiera alimentar una composición sinérgicamente eficaz de al menos una toxina activa contra coleópteros y al menos una toxina activa contra lepidópteros. En la técnica hay constancia de que si dos proteínas no relacionadas no son tóxicas por separado, no serán tóxicas combinadas. También hay constancia de que combinando una proteína que carece de actividad contra una plaga diana con una proteína activa contra la plaga diana, la proteína no activa no aumentará la actividad de la proteína que ya era activa.

50 De acuerdo con la invención, se ha descubierto que, inesperadamente, la aplicación de una combinación de al menos una toxina proteica activa contra coleópteros y al menos una toxina proteica activa contra lepidópteros presenta un efecto sinérgico significativo (es decir, el control de insectos coleópteros obtenido es muy superior al control de insectos coleópteros que cabría esperar utilizando únicamente la toxina activa contra coleópteros). Este efecto sinérgico ofrece un nivel de control de insectos coleópteros útil desde un punto de vista comercial y ayuda a evitar que los insectos desarrollen resistencia a una única toxina.

60 En una realización, la presente invención contempla un método para controlar una plaga de insectos coleópteros, comprendiendo dicho método suministrar a una plaga de coleópteros o uno de sus entornos una composición particular que comprende al menos una proteína activa contra coleópteros y al menos una proteína activa contra lepidópteros, donde dicha composición controla la plaga de coleópteros en mayor medida de lo que cabría esperar si contuviera solamente una proteína activa contra coleópteros individual, donde la proteína activa contra coleópteros es una proteína Cry3A modificada y donde la proteína activa contra lepidópteros es una proteína Cry1Ab.

Los ejemplos de una proteína Cry1Ab tienen los siguientes números de acceso a GenBank: Cry1Ab1 (AAA22330), Cry1Ab2 (AAA22613), Cry1Ab3 (AAA22561), Cry1Ab4 (BAA00071), Cry1Ab5 (CAA28405), Cry1Ab6 (AAA22420), Cry1Ab7 (CAA31620), Cry1Ab8 (AAA22551), Cry1Ab9 (CAA38701), Cry1Ab10 (A29125), Cry1Ab11 (I12419), Cry1Ab12 (AAC64003), Cry1Ab13 (AAN76494), Cry1Ab14 (AAG16877), Cry1Ab15 (AAO13302), Cry1Ab16 (AAK55546), Cry1Ab17 (AAT46415), Cry1Ab18 (AAQ88259), Cry1Ab19 (AAW31761), Cry1Ab20 (ABB72460), Cry1Ab21 (ABS18384), Cry1Ab22 (ABW87320), Cry1Ab23 (HQ439777), Cry1Ab24 (HQ439778), Cry1Ab25 (HQ685122) y Cry1Ab26 (HQ847729). En otra realización más, la proteína Cry1Ab es la proteína comprendida en el evento Bt11 y descrita en la Patente de EE. UU. 6.114.608.

5  
10 En otro aspecto más de esta realización, la plaga de coleópteros es un escarabajo de la papa de Colorado o un gusano de las raíces del maíz. En otra realización, el gusano de las raíces del maíz es un gusano de las raíces del maíz del oeste, un gusano de las raíces del maíz del norte, un gusano de las raíces del maíz del sur o un gusano de las raíces del maíz mexicano.

15 En otra realización del método contemplado, la composición es una planta transgénica que expresa la proteína activa contra coleópteros y la proteína activa contra lepidópteros. En un aspecto la planta transgénica se selecciona del grupo conformado por soja, algodón, colza, canola, hortalizas, girasol, tabaco, tomate, caña de azúcar, arroz, trigo, maíz, centeno, cebada, césped y un cultivo forrajero. En otro aspecto, la planta transgénica es una planta de maíz transgénica. En otro aspecto más, la planta de maíz transgénica es una combinación de cultivo que comprende los eventos de maíz transgénicos MIR604 y Bt11. En otro aspecto, la planta de maíz transgénica es una combinación de cultivo que comprende los eventos de maíz transgénicos MIR604, Bt11 y MIR162.

20  
25 En otra realización, la invención contempla un método para controlar una plaga del gusano de las raíces del maíz, comprendiendo dicho método suministrar a la plaga del gusano de las raíces del maíz o uno de sus entornos una composición que comprende una proteína Cry3A (mCry3A) modificada y una proteína Cry1Ab, donde la composición controla la plaga del gusano de las raíces del maíz en mayor medida de lo que cabría esperar solamente con la proteína mCry3A.

30 En otra realización, la composición es una planta de maíz transgénica. En otra realización más, la planta de maíz transgénica comprende el evento MIR604 y el evento Bt11.

También se describe una composición para controlar coleópteros que comprende al menos una proteína activa contra coleópteros y al menos una proteína activa contra lepidópteros, donde dicha composición controla una plaga de coleópteros en mayor medida de lo que cabría esperar si comprendiera solamente una proteína activa contra coleópteros individual.

35  
40 La proteína activa contra coleópteros es una Cry3A modificada y la proteína activa contra lepidópteros es Cry1Ab. Los ejemplos de una proteína Cry1Ab tienen los siguientes números de acceso a GenBank: Cry1Ab1 (AAA22330), Cry1Ab2 (AAA22613), Cry1Ab3 (AAA22561), Cry1Ab4 (BAA00071), Cry1Ab5 (CAA28405), Cry1Ab6 (AAA22420), Cry1Ab7 (CAA31620), Cry1Ab8 (AAA22551), Cry1Ab9 (CAA38701), Cry1Ab10 (A29125), Cry1Ab11 (I12419), Cry1Ab12 (AAC64003), Cry1Ab13 (AAN76494), Cry1Ab14 (AAG16877), Cry1Ab15 (AAO13302), Cry1Ab16 (AAK55546), Cry1Ab17 (AAT46415), Cry1Ab18 (AAQ88259), Cry1Ab19 (AAW31761), Cry1Ab20 (ABB72460), Cry1Ab21 (ABS18384), Cry1Ab22 (ABW87320), Cry1Ab23 (HQ439777), Cry1Ab24 (HQ439778), Cry1Ab25 (HQ685122) y Cry1Ab26 (HQ847729). En otro aspecto, la proteína Cry1Ab es la proteína comprendida en el evento Bt11 y descrita en la Patente de EE. UU. 6.114.608.

45  
50 En otro aspecto más, la plaga de coleópteros es un escarabajo de la papa de Colorado o un gusano de las raíces del maíz. En otro aspecto, el gusano de las raíces del maíz es un gusano de las raíces del maíz del oeste, un gusano de las raíces del maíz del norte, un gusano de las raíces del maíz del sur o un gusano de las raíces del maíz mexicano.

55 En un aspecto, la composición es una planta transgénica que expresa la proteína activa contra coleópteros y la proteína activa contra lepidópteros. En un aspecto la planta transgénica se selecciona del grupo conformado por soja, algodón, colza, canola, hortalizas, girasol, tabaco, tomate, caña de azúcar, arroz, trigo, maíz, centeno, cebada, césped y un cultivo forrajero. En otro aspecto, la planta transgénica es una planta de maíz transgénica. En otro aspecto, la planta transgénica es una planta de maíz transgénica. En otro aspecto, la planta de maíz transgénica es una combinación de cultivo que comprende los eventos de maíz transgénicos MIR604 y Bt11. En otro aspecto, la planta de maíz transgénica es una combinación de cultivo que comprende los eventos de maíz transgénicos MIR604, Bt11 y MIR162.

60 También se describe un método para proporcionar a un productor una forma de controlar una plaga de una población de insectos coleópteros que comprende suministrar o vender al productor una semilla transgénica que comprende un ácido nucleico que codifica al menos una proteína activa contra coleópteros y al menos una proteína activa contra lepidópteros, donde las plantas transgénicas cultivadas a partir de dicha semilla controlan una plaga de

coleópteros en mayor medida de lo que cabría esperar si comprendiera solamente una proteína activa contra coleópteros individual.

La proteína activa contra coleópteros es una Cry3A modificada y la proteína activa contra lepidópteros es Cry1Ab. Los ejemplos de una proteína Cry1Ab tienen los siguientes números de acceso a GenBank: Cry1Ab1 (AAA22330), Cry1Ab2 (AAA22613), Cry1Ab3 (AAA22561), Cry1Ab4 (BAA00071), Cry1Ab5 (CAA28405), Cry1Ab6 (AAA22420), Cry1Ab7 (CAA31620), Cry1Ab8 (AAA22551), Cry1Ab9 (CAA38701), Cry1Ab10 (A29125), Cry1Ab11 (I12419), Cry1Ab12 (AAC64003), Cry1Ab13 (AAN76494), Cry1Ab14 (AAG16877), Cry1Ab15 (AAO13302), Cry1Ab16 (AAK55546), Cry1Ab17 (AAT46415), Cry1Ab18 (AAQ88259), Cry1Ab19 (AAW31761), Cry1Ab20 (ABB72460), Cry1Ab21 (ABS18384), Cry1Ab22 (ABW87320), Cry1Ab23 (HQ439777), Cry1Ab24 (HQ439778), Cry1Ab25 (HQ685122) y Cry1Ab26 (HQ847729). En otro aspecto más, la proteína Cry1Ab es la proteína comprendida en el evento Bt11 y descrita en la Patente de EE. UU. 6.114.608.

En otro aspecto más, la plaga de coleópteros es un escarabajo de la papa de Colorado o un gusano de las raíces del maíz. En un aspecto, el gusano de las raíces del maíz es un gusano de las raíces del maíz del oeste, un gusano de las raíces del maíz del norte, un gusano de las raíces del maíz del sur o un gusano de las raíces del maíz mexicano.

En un aspecto, la semilla de la planta transgénica y la planta se seleccionan del grupo conformado por soja, algodón, colza, canola, hortalizas, girasol, tabaco, tomate, caña de azúcar, arroz, trigo, maíz, centeno, cebada, césped y un cultivo forrajero. En otro aspecto, la semilla de la planta transgénica y la planta son una semilla y una planta de maíz transgénicas.

La expresión conjunta de al menos una proteína activa contra coleópteros y al menos una proteína activa contra lepidópteros en la misma planta transgénica se puede conseguir por modificación genética de una planta para que contenga y exprese todos los genes necesarios en lo que se denomina una combinación molecular. Como alternativa, una planta, Madre 1, se puede modificar genéticamente para que exprese ciertos genes que codifican las proteínas insecticidas de la invención. Una segunda planta, Madre 2, se puede modificar genéticamente para que exprese otros genes diferentes que codifican las proteínas insecticidas de la invención. Al cruzar Madre 1 con Madre 2, se obtiene una progenie de plantas que expresan todos los genes introducidos en las Madres 1 y 2, denominadas en la presente "combinación de cultivo". Dicha combinación de cultivo para crear una composición de la invención se puede conseguir cruzando una planta de maíz que comprende el evento MIR604 con una planta de maíz que comprende el evento Bt11. Por lo tanto, la progenie de la combinación de cultivo comprende una proteína mCry3A y una proteína Cry1Ab descritas en la presente para proporcionar un control sinérgico de plagas de insectos coleópteros.

Las composiciones, por ejemplo, una semilla de una planta transgénica también se puede tratar con un recubrimiento insecticida para semillas tal como se describe en las Patentes de EE. UU. N.<sup>os</sup> 5.849.320 y 5.876.739. Cuando tanto el recubrimiento insecticida para semillas como la semilla transgénica de la invención sean activos contra el mismo insecto diana, la combinación es útil (i) en un método para mejorar aún más la actividad de la composición sinérgica contra el insecto diana y (ii) en un método para prevenir el desarrollo de resistencia a la composición ofreciendo otro mecanismo de acción adicional contra el insecto diana. Por lo tanto, se describe un método para mejorar la actividad contra un insecto diana o prevenir el desarrollo de resistencia en este, por ejemplo, el gusano de las raíces del maíz, que comprende aplicar un recubrimiento insecticida para semillas sobre una semilla transgénica. Tales tratamientos químicos pueden incluir insecticidas, fungicidas o nematocidas. Los ejemplos de dichos insecticidas incluyen, pero no se limitan a, dinotefurano, tal como tiametoxam, imidacloprid, acetamiprid, nitenpiram, nidinotefurano, clorfenapir, tebufenpirad, tebufenozida, metoxifenozida, halofenozida, triazamato, avermectina, spinosad, fiprinol, acefato, fenamifos, diazinón, clorpirifós, clorpirifon-metil, malatión, carbarilo, aldicarb, carbofurano, tiodicarb y oxamilo. Incluso cuando el recubrimiento insecticida para semillas es activo contra un insecto diferente, el recubrimiento insecticida para semillas es útil para expandir el rango de control de insectos, por ejemplo, añadiendo a la semilla transgénica, la cual presenta actividad contra insectos coleópteros, un recubrimiento insecticida para semillas que presenta actividad contra insectos lepidópteros, la semilla transgénica recubierta controló tanto las plagas de insectos lepidópteros como de coleópteros.

## EJEMPLOS

La invención se describirá además haciendo referencia a los siguientes ejemplos detallados. Estos ejemplos se proporcionan únicamente a efectos ilustrativos y no se pretende que sean limitantes a menos que se especifique lo contrario. Las técnicas de clonación molecular y de ADN recombinante estándares usadas en la presente son de uso común en la técnica y han sido descritas por J. Sambrook, *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3.<sup>a</sup> Ed., Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001); por T.J. Silhavy, M.L. Berman, y L.W. Enquist, *Experiments with Gene Fusions*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) y por Ausubel, F.M. *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, New York, John Wiley and Sons Inc., (1988), Reiter, *et al.*, *Methods in Arabidopsis Research*, World Scientific Press (1992), y Schultz *et al.*, *Plant Molecular Biology Manual*, Kluwer

Academic Publishers (1998).

Ejemplo 1. Interacción entre toxinas contra el escarabajo de la papa de Colorado

5 En este ejemplo los efectos de mCry3A sobre la toxicidad de Cry1Ab y los efectos de Cry1Ab sobre la toxicidad de mCry3A se evalúan con bioensayos estudiando las proteínas insecticidas solas o combinadas. El maíz del evento Bt11 y el maíz del evento MIR604 expresan las proteínas insecticidas Cry1Ab y Cry3A modificada (mCry3A), respectivamente. Cry1Ab es activa contra ciertos lepidópteros, mientras que mCry3A es activa contra algunas especies de coleópteros. En los Estados Unidos (EE. UU.), el uso principal del maíz Bt11 es para controlar el barrenador del maíz europeo (*Ostrinia nubilalis*; BME) y las dianas principales de MIR604 de maíz son el gusano de las raíces del maíz del oeste (*Diabrotica virgifera virgifera*; GRO) el gusano de las raíces del maíz del norte (*Diabrotica longicornis barberi*; GRN). Mediante combinaciones de cultivo convencionales de plantas Bt11 y MIR604, se crearon híbridos de maíz Bt11 x MIR604 combinados que producían tanto Cry1Ab como mCry3A. Estos híbridos de maíz proporcionan control de BME así como también GRO y GRN.

15 Los organismos indicadores utilizados son BME en el estadio inicial, que es muy sensible a Cry1Ab, y el escarabajo de la papa de Colorado en el estadio inicial (*Leptinotarsa decemlineata*; EPC), que es muy sensible a mCry3A. BME no es sensible a mCry3A y EPC es inmune a Cry1Ab. Aunque EPC no es una plaga diana de maíz MIR604 ni Bt11 x MIR604, es más sensible a las pruebas de laboratorio que las especies del gusano de las raíces atacadas por mCry3A. Tanto larvas de BME como de EPC se bioensayan fácilmente utilizando dietas artificiales estándares en las mismas condiciones de laboratorio. Debido a que los estadios iniciales de estas especies son muy sensibles a Cry1Ab o mCry3A, se maximiza la capacidad para detectar muchos cambios significativos en la toxicidad de cada proteína. En cada bioensayo combinatorio, cada especie sensible se expone a una concentración alta y una baja de la toxina, representada por la CL70 y CL30, respectivamente, combinada con una concentración alta de la no toxina, representada por la CL90 de la especie sensible correspondiente.

30 Se dispone de varios diseños experimentales para estudiar las interacciones entre toxinas. El diseño depende del modelo utilizado para predecir los efectos de mezclas de toxinas, sin interacción, a partir de los efectos de los compuestos solos; se detecta una interacción cuando los efectos observados para la mezcla difieren de las predicciones del modelo. Cuando las toxinas tienen efectos similares, de forma que se puede sustituir un compuesto como una proporción constante del otro, el modelo nulo se denomina acción conjunta similar. Cuando se aplica este modelo, una prueba para determinar la interacción determina la respuesta a la dosis para una proporción fija de los compuestos (p. ej., Tabashnik, 1992). Cuando las toxinas actúan independientemente (diferentes modos de acción), el mejor modelo es acción conjunta independiente y una prueba para determinar la interacción examina los efectos de proporciones variables de los compuestos en un diseño factorial (p. ej., Tajima *et al.*, 2002). Conjuntos de datos exhaustivos para Cry1Ab y mCry3A indican que los organismos sensibles a una proteína no serán sensibles a la otra proteína; en otras palabras, solo un compuesto es tóxico para un organismo particular y la hipótesis nula es que la mezcla no tiene efecto adicional. En estas situaciones, se demuestra que existe una interacción por una diferencia entre la toxicidad de la proteína A sola y su toxicidad en presencia de la proteína B. De hecho, para un organismo sensible a la proteína A no existe respuesta a la dosis para la proteína B y, por lo tanto, no hay razón para esperar que la concentración de la proteína B afecte a la toxicidad de la proteína A. Por consiguiente, estudiar el efecto de la proteína B en una concentración fija es un método simple y eficaz para determinar si existe una interacción. Este método se asemeja más al "método empírico simple" descrito por Tabashnik (1992).

45 La interacción entre dos proteínas insecticidas se detecta como una diferencia estadísticamente significativa entre la mortalidad observada únicamente con la proteína tóxica y la mortalidad observada cuando se añade la segunda proteína combinada con la proteína tóxica. BME en el estadio inicial se exponen a Cry1ab con una concentración CL30 y CL70, sola y combinada con una concentración alta de mCry3A, correspondiente con la CL90 para EPC en el estadio inicial. Consecuentemente, EPC en el estadio inicial se exponen a mCry3A con una concentración CL30 y CL70, sola y combinada con una concentración alta de Cry1Ab, correspondiente con la CL90 para BME en el primer estadio.

55 La exposición de la especie sensible tanto en su CL30 como su CL70 permite evaluar la interacción potencial con la segunda proteína en dos puntos diferentes en la curva de respuesta a la dosis. La exposición de la especie sensible a la segunda proteína en una concentración que es muy tóxica (CL90) proporciona una exposición suficientemente alta para detectar cualquier toxicidad biológicamente relevante si existe interacción entre las dos proteínas.

60 Las fuentes de Cry1Ab y mCry3A utilizadas en los bioensayos son sustancias de ensayo producidas mediante la sobreexpresión de cada proteína en *E. coli* recombinante seguida de purificación. Cry1Ab y mCry3A tal y como están contenidas en estas sustancias de ensayo son sustancialmente equivalentes a las proteínas insecticidas tal y como se expresan en plantas de maíz transgénicas Bt11 y MIR604, respectivamente. El uso de proteínas purificadas en microbios es preferible a utilizar preparados de Cry1Ab y mCry3A procedentes de plantas. La pureza relativamente elevada de las sustancias de ensayo procedentes de microbios permitió llevar a cabo determinaciones más precisas de la toxicidad, sin la interferencia de sustancias procedentes de plantas. Estas sustancias vegetales

puede que no estén presentes en cantidades iguales en materiales procedentes de Bt11 ni de MIR604, así como tampoco en materiales de control, y pueden complicar la interpretación de los resultados de los bioanálisis.

Producción de sustancia de ensayo de Cry1Ab: Se determina que la sustancia de ensayo de Cry1Ab contiene aproximadamente 127 µg de Cry1Ab/mL de sustancia de ensayo (0.0127% p/v). Una vez preparada, la sustancia de ensayo se conserva a aproximadamente 4 °C. La Cry1Ab truncada por acción de la tripsina en la sustancia de ensayo corresponde aproximadamente a la Cry1Ab truncada codificada en maíz Bt11. La proteína Cry1Ab truncada codificada en maíz Bt11 representa los primeros 615 aminoácidos N-terminales de la proteína Cry1Ab nativa completa de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*. Por analogía, la forma predominante de la Cry1Ab truncada por acción de la tripsina en la sustancia de ensayo es una proteína de 587 aminoácidos, que representa la misma proteína Cry1Ab truncada presente en maíz Bt11, menos los primeros 28 aminoácidos N-terminales (Kramer, 2006). La tripsinación de Cry1Ab en maíz Bt11 elimina estos 28 aminoácidos N-terminales (que no se requieren para la actividad insecticida), y demuestra además la equivalencia sustancial entre la Cry1Ab truncada por acción de la tripsina producida en *E. coli* y la Cry1Ab truncada producida en Bt11, según se determina mediante SDSPAGE, análisis de Western blot, secuenciación N-terminal, mapeo peptídico, actividad biológica contra larvas neonatas de BME y ausencia de glicosilación detectable. Por lo tanto, la proteína Cry1Ab truncada presente en la sustancia de ensayo se puede considerar sustancialmente equivalente a la proteína Cry1Ab truncada codificada en maíz Bt11.

Producción de sustancia de ensayo de mCry3A: Se determina que la sustancia de ensayo de mCry3A contiene aproximadamente un 90% de proteína mCry3A en peso para presentar bioactividad contra una especie de coleópteros sensible y se demuestra que es sustancialmente equivalente a mCry3A tal y como se produce en maíz del evento MIR604, según se evaluó mediante diferentes parámetros bioquímicos y funcionales. Una vez preparada, la sustancia de ensayo de mCry3A se conserva a aproximadamente -20 °C.

Estimación de CL30, CL70 y CL90 para la respuesta de BME a la dosis de Cry1Ab: La bioactividad de Cry1Ab se determina en ensayos de alimentación de insectos utilizando larvas de BME en el estadio inicial de acuerdo con los métodos estándares conocidos en la técnica. Resumiendo, los bioensayos se llevan a cabo en placas de 24 pocillos Costar (Fisher Scientific, # de catálogo PD 10-047 -05). Las soluciones de ensayo se prepararon diluyendo la sustancia de ensayo Cry1Ab líquida en tampón de carbonato de amonio 0.6 µM. Se añaden 100 µL de cada dilución a 100 µL de dieta de BME (dieta general para lepidópteros de BioServe, Inc.; Frenchtown, NJ, EE. UU.) y se mezclan bien. La dieta de los insectos BME se prepara de acuerdo con los métodos conocidos en la técnica. Cada pocillo contiene 200 µL de dieta de insectos que contiene concentraciones de Cry1Ab que varían de 3 a 372 ng/mL de dieta. Cada tratamiento consiste en 24 pocillos repetidos que contienen una larva BME por pocillo. Las placas se mantienen en condiciones ambientales de laboratorio respecto a la temperatura, luz y humedad relativa. Para controlar las posibles desviaciones, las larvas se asignan aleatoriamente a grupos de tratamiento. Como controles, se exponen larvas a la dieta de los insectos sin sustancia de ensayo (dieta únicamente); a la dieta de los insectos tratada con la misma concentración de tampón utilizada en la aplicación más alta de la sustancia de ensayo a la dieta (100 µL de tampón aprox. 0.6 µM preparado a partir de NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 50 mM, pH 9.25/100 mL de dieta); y a la dieta tratada con una solución de la sustancia de ensayo de Cry1Ab inactivada térmicamente (30 minutos a 100 °C) en una concentración equivalente a la concentración más alta de la sustancia de ensayo (372 ng de Cry1Ab/mL de dieta) utilizada en el bioensayo. El tratamiento con proteína inactivada térmicamente sirve como un control de los efectos potenciales de la proteína añadida en la dieta de los insectos e impurezas (es decir, componentes que no pertenecen a Cry1Ab) en la sustancia de ensayo. La mortalidad se evalúa a aproximadamente 144 h.

El programa de análisis probit de la EPA de EE. UU., versión 1.5, EPA de EE. UU., 1992, se utiliza para determinar los valores de la CL50 y CL90; además, se utilizó la ecuación de la pendiente para la regresión de la relación entre log-dosis y probit para determinar los valores de la CL30 y CL70 junto con una tabla de distribución probit normal (Geigy Scientific Tables, Lentner, 1982). También se pueden utilizar otros programas probit.

Estimación de CL30, CL70 y CL90 para la respuesta de EPC a la dosis de mCry3A: Utilizando la sustancia de ensayo de mCry3A, la CL30, CL70 y CL90 de mCry3A para EPC en el estadio inicial se determinan de la misma forma que se describió anteriormente para BME mediante métodos estándares conocidos en la técnica. Las soluciones de ensayo se preparan disolviendo la sustancia de ensayo liofilizada en agua MilliQ<sup>®</sup>. Se añaden 100 µg de cada dilución a 100 µg de dieta de EPC (BioServe, Inc., Frenchtown, Nueva Jersey, EE. UU.) y se mezclan bien. La dieta de los insectos EPC se prepara utilizando métodos conocidos en la técnica. Cada pocillo contiene 200 µL de dieta de insectos con concentraciones de mCry3A que varían de 0.01 a 5 µg/mL de dieta. Como controles, se exponen larvas a la dieta de los insectos sin sustancia de ensayo añadida (dieta únicamente); a la dieta de los insectos tratada con el mismo volumen de agua MilliQ utilizado en la aplicación de la sustancia de ensayo a la dieta únicamente; y a la dieta tratada con una solución de proteína mCry3A inactivada térmicamente de la sustancia de ensayo (30 minutos a 100 °C) en una concentración equivalente a la concentración más alta de la sustancia de ensayo (5 µg de mCry3A/mL de dieta) utilizada en el bioensayo. La mortalidad se evalúa a 96 h.

Evaluación del efecto mCry3A sobre la toxicidad de Cry1Ab: El efecto de mCry3A sobre la toxicidad de Cry1Ab se mide exponiendo BME en el estadio inicial a la CL30 (equivalente a 27 ng de Cry1Ab/mL de dieta) y CL70 (equivalente a 70 ng de Cry1Ab/mL de dieta) de Cry1Ab, y comparando la mortalidad en presencia y ausencia de mCry3A. La concentración de mCry3A correspondiente a la CL90 de EPC (equivalente a 2.4 µg de mCry3A/mL de dieta) se determina como se describe anteriormente.

El bioensayo para determinar la interacción se lleva a cabo utilizando los mismos procedimientos y condiciones de cultivo descritos anteriormente, salvo que se utilizan placas de cultivo de 24 pocillos por triplicado para cada tratamiento. Cada placa de tratamiento contiene 24 larvas hasta un total de 72 larvas por tratamiento. Como controles, se exponen larvas a la dieta de los insectos sin sustancia de ensayo (dieta únicamente); a la dieta de los insectos tratada con la misma concentración de tampón utilizada en la aplicación de la concentración más alta de la sustancia de ensayo a la dieta (100 µL de tampón de aprox. 0.6 µM preparado a partir de NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 50 mM, pH 9.25/100 mL de dieta); a la dieta tratada con una solución de Cry1Ab inactivada térmicamente (30 minutos a 100 °C) en una concentración equivalente a la concentración más alta de Cry1Ab (372 ng de Cry1Ab/mL de dieta) utilizada en el bioensayo; y a mCry3A en una dosis de 2.4 µg/mL de dieta, correspondiente a la CL90 de mCry3A contra EPC. La dieta de EPC tratada con la CL70 (equivalente a 1.4 µg de mCry3A/mL de dieta) de mCry3A contra EPC se utiliza como control positivo concurrente para confirmar la actividad insecticida de mCry3A. La mortalidad se evalúa después de aproximadamente 144 y 168 horas. El bioensayo para determinar la interacción completo con BME se repite dos veces.

Evaluación del efecto Cry1Ab sobre la toxicidad de mCry3A: El efecto de Cry1Ab sobre la toxicidad de mCry3A se mide exponiendo EPC en el estadio inicial a las concentraciones CL30 (equivalente a 0.62 µg de mCry3A/mL de dieta) y CL70 (equivalente a 1.35 µg de mCry3A/mL de dieta) de mCry3A, y comparando la mortalidad en presencia y en ausencia de Cry1Ab. La concentración de Cry1Ab es la CL90 de BME (equivalente a 142 ng de Cry1Ab/mL de dieta). El número de tratamientos repetidos y el análisis de los datos de mortalidad de EPC son los mismos que se describieron anteriormente.

Los bioensayos para determinar la interacción se llevan a cabo utilizando los mismos procedimientos y condiciones de cultivo descritos anteriormente, salvo que se utilizan placas de cultivo de 24 pocillos por triplicado para cada tratamiento. Cada placa de tratamiento contiene 24 larvas hasta un total de 72 larvas por tratamiento. Como controles, se exponen larvas a la dieta de los insectos sin sustancia de ensayo (dieta únicamente); a la dieta de los insectos tratada con el mismo volumen de agua MilliQ utilizado en la aplicación de la sustancia de ensayo a la dieta únicamente; a la dieta tratada con una solución de Cry1Ab inactivada térmicamente (30 minutos a 100 °C) en una concentración equivalente a la concentración más alta de mCry3A (5 µg de mCry3A/mL de dieta) utilizada en el bioensayo; y a Cry1Ab en una dosis de 142 ng/mL de dieta correspondiente a la CL90 de Cry1Ab contra BME. La dieta de BME tratada con la concentración CL70 (equivalente a 70 ng de Cry1Ab/mL de dieta) de Cry1Ab contra BME se utiliza como control positivo concurrente para confirmar la actividad insecticida de Cry1Ab utilizada en el bioensayo combinatorio. La mortalidad se evalúa después de aproximadamente 72 y 96 horas. El bioensayo para determinar la interacción completo con BME se repite dos veces.

Métodos estadísticos: En cada estudio, se deben cumplir varios criterios para que el diseño experimental y el análisis de datos que se describen a continuación sean una prueba válida y eficaz para determinar la interacción entre las proteínas: (1) No hay efecto del tampón utilizado para disolver las proteínas; (2) No hay efecto de la adición de proteína *per se*; o (3) La "no toxina" no es tóxica para la especie inmune del bioensayo en las concentraciones utilizadas en este experimento. Tanto para el experimento de BME como para el de EPC se cumplen estos criterios.

Una vez que se detecta mortalidad en los bioensayos, la mortalidad se registra cada día hasta que haya aproximadamente un 30% de mortalidad en el tratamiento con CL30 y un 70% de mortalidad en el tratamiento con CL70. Los datos de cada una de las tomas de muestras en cada estudio para determinar la interacción entre las proteínas se analizan por separado. En cada toma, se llevan a cabo análisis independientes para cada ensayo por separado y los datos combinados de ambos ensayos.

En cada toma de cada bioensayo, la respuesta analizada es la proporción transformada en arcoseno de la raíz cuadrada de larvas muertas por repetición. Los efectos de los diferentes tratamientos se evalúan mediante ANOVA. Para ambos experimentos (BME y EPC), los dos ensayos se analizan por separado y se combinan (si es válido). Una consideración decisiva de ANOVA es que la homogeneidad de la varianza entre los tratamientos y los errores de ajuste están distribuidos normalmente. Esto es poco probable si se incluyen los tratamientos de control negativo, ya que la proporción de larvas muertas es cero en muchas de las repeticiones. Este es un problema particular para ANOVA de datos transformados en arcoseno de la raíz cuadrada. Por lo tanto, los datos de control negativo se excluye del análisis, ya que su validación de las consideraciones del método es clara sin análisis estadístico. Para los ensayos analizados por separado, se lleva a cabo ANOVA con un efecto para el tratamiento. La prueba de Levene (SAS, 2002-2003) se utiliza para comprobar la consideración de homogeneidad de la varianza en cada uno de los cuatro tratamientos, y la prueba de Shapiro-Wilks (SAS, 2002-2003) se utiliza para comprobar la consideración de errores de ajuste distribuidos normalmente. Para el análisis de los ensayos

combinados, se lleva a cabo ANOVA con efectos para el ensayo y el tratamiento. La prueba de Shapiro-Wilks se utiliza para comprobar la consideración de errores de ajuste distribuidos normalmente. No se lleva a cabo una prueba formal de la consideración de homogeneidad de las varianzas, ya que la prueba de Levene no se puede aplicar si existe más de un efecto en el análisis de las varianzas (SAS, 2002-2003). Sin embargo, la comparación visual de las representaciones gráficas de los datos transformados en arcoseno de la raíz cuadrada se utiliza para confirmar que la consideración de la homogeneidad de la varianza es válida para los datos combinados.

La estructura factorial de los tratamientos permite investigar tres efectos: (1) El principal efecto de la proteína tóxica (¿influye la concentración de la toxina en la respuesta?); (2) El principal efecto de la proteína no tóxica (¿influye la presencia de la no toxina en la respuesta?) y (3) La interacción entre la concentración de la toxina y la presencia de la no toxina (¿depende el efecto de la no toxina de la concentración de la toxina o depende el efecto de la concentración de la toxina de la presencia de la no toxina?).

Los efectos se investigan estableciendo contrastes de tratamiento que se centran en ese efecto al mismo tiempo que eliminan los demás efectos. Esto se consigue examinando combinaciones adecuadas de las medias de tratamiento (una combinación de medias de tratamiento se conoce como un contraste). Cada contraste es la suma de los coeficientes de contraste individuales multiplicados por sus medias de tratamiento asociadas. La importancia estadística de cada contraste se puede evaluar aplicando una hipótesis nula adecuada. Las hipótesis nulas para los tres objetos son las siguientes: (1)  $H_0$ : la respuesta en concentraciones altas y bajas de la proteína tóxica es la misma; (2)  $H_0$ : la respuesta es la misma con o sin la proteína no tóxica; y (3)  $H_0$ : cualesquiera efectos de la proteína tóxica y la no tóxica actúan independientemente unos de otros.

Cada contraste se evalúa con una tasa de error de tipo I del 5% utilizando la estimación de error de ANOVA. El contraste del tratamiento 2 comprueba si existe sinergia (o antagonismo) entre las dos proteínas. Por lo tanto, si la hipótesis nula para el contraste 2 se rechaza, entonces los datos proporcionan pruebas evidentes de sinergia (o antagonismo). Un examen más completo de la señal de cualesquiera contrastes significativos determina si existe sinergia o antagonismo (por ejemplo, un valor positivo de contraste 2 implica una mayor mortalidad cuando la proteína no tóxica está presente, es decir, sinergia).

Los valores de las medias y las desviaciones estándares de los bioensayos combinatorios se calculan utilizando Microsoft Excel®.

## RESULTADO

Estimación de CL30, CL70 y CL90 para Cry1Ab frente a BME: La estimación de la bioactividad de Cry1Ab frente a larvas del barrenador del maíz europeo mostró una CL30 de aprox. 27, una CL70 de aprox. 70 y una CL90 de aprox. 142 ng de Cry1Ab/mL de dieta después de 144 horas. Las dietas de los controles negativos mostraron únicamente una mortalidad baja del 8% para el tratamiento únicamente con dieta, del 4% para la dieta tratada con tampón y del 4% para la dieta tratada con Cry1Ab inactivada.

Estimación de CL30, CL70 y CL90 para mCry3A frente a EPC: La estimación de la bioactividad de mCry3A frente a larvas del escarabajo de la papa de Colorado mostró una CL30 de aprox. 0.6, una CL70 de aprox. 1.4 y una CL90 de aprox. 2.4  $\mu\text{g}$  de mCry3A/mL de dieta después de 96 horas. Las dietas de los controles negativos no mostraron mortalidad o únicamente una mortalidad baja del 0% para el tratamiento únicamente con dieta, del 8% para la dieta tratada con agua y del 4% para la dieta tratada con mCry3A inactivada.

Evaluación del efecto mCry3A sobre la toxicidad de Cry1Ab: Hubo una baja mortalidad media (menor o igual al 7%) con la dieta únicamente, con la dieta tratada con tampón, con la dieta tratada con Cry1Ab inactivada térmicamente y con la dieta tratada con mCry3A con la concentración CL90 de EPC (2.4  $\mu\text{g}$  de mCry3A/mL de dieta) después de 168 horas. Además, existía una diferencia clara entre las dietas tratadas con toxina y las dietas de control negativo. Por lo tanto, se demostraron diversas condiciones necesarias para que el diseño experimental fuera válido.

En ambos ensayos, después de 144 h, las mortalidades en los tratamientos con CL30 y CL70 (ambos con y sin mCry3A) fueron desde un punto de vista estadístico significativamente inferiores al 30% y al 70%, respectivamente. Por lo tanto, los ensayos continuaron hasta alcanzar los objetivos de toxicidad deseados del experimento. Después de 168 h, se alcanzaron los objetivos (es decir, el 30% y el 70% de mortalidad en los tratamientos con Cry1Ab únicamente con una concentración CL30 y Cry1Ab únicamente con una concentración CL70, respectivamente). Se consideró que los datos después de 144 horas podían detectar los efectos de mCry3A sobre Cry1Ab.

Los resultados de los datos combinados demostraron que los efectos de la concentración de Cry1Ab y la presencia de mCry3A eran independientes después de 144 horas y 168 horas ( $p > 0.05$ ) frente al barrenador del maíz europeo. Por consiguiente, el efecto de la concentración de Cry1Ab se podría estudiar mediante el análisis conjunto de los datos con y sin mCry3A. De forma análoga, el efecto de mCry3A se podría estudiar mediante el análisis conjunto de los datos de CL30 y CL70.

En los datos combinados hubo un efecto estadísticamente significativo de la concentración de Cry1Ab ( $p < 0.05$ ). Después de 144 h y después de 168 h, el efecto de la concentración de Cry1Ab era estadísticamente significativo en los datos combinados. Estos datos indican que BME respondía como cabía esperar a diferentes concentraciones de Cry1Ab.

En los datos combinados, no se detectó ningún efecto estadísticamente significativo de mCry3A sobre la toxicidad de Cry1Ab después de 144 h o después de 168 h ( $p > 0.05$ ). Como no se detectó ningún efecto de mCry3A únicamente para BME en este estudio, estos resultados no proporcionan pruebas evidentes de que exista una interacción entre Cry1Ab y mCry3A en la exterminación o el control del barrenador del maíz europeo.

Evaluación del efecto Cry1Ab sobre la toxicidad de mCry3A: Para los ensayos de EPC hubo una baja mortalidad media (menor o igual al 4%) con la dieta únicamente, con la dieta tratada con agua, con la dieta tratada con Cry1Ab inactivada térmicamente y con la dieta tratada con Cry1Ab con la concentración CL90 de BME (142 ng de Cry1Ab/mL de dieta) después de 96 horas. Además, existía una diferencia clara entre las dietas tratadas con toxina y las dietas de control negativo. Por lo tanto, se demostraron diversas condiciones necesarias para que el diseño experimental fuera válido.

En ambos bioensayos de EPC, después de 72 h se detectó algo de mortalidad; sin embargo, las mortalidades en los tratamientos con CL30 y CL70 fueron desde un punto de vista estadístico significativamente inferiores al 30% y al 70%, respectivamente, en al menos un bioensayo. Por lo tanto, los ensayos continuaron hasta alcanzar los objetivos de mortalidad deseados del experimento. Después de 96 h, se alcanzaron los objetivos (es decir, el 30% y el 70% de mortalidad en los tratamientos con mCry3A únicamente con una concentración CL30 y mCry3A únicamente con una concentración CL70, respectivamente). Se consideró que los datos después de 72 horas podían detectar los efectos de mCry3A sobre Cry1Ab. Para los ensayos separados y los datos combinados, los criterios de normalidad y homogeneidad de la varianza se cumplieron tanto después de 72 h como después de 96 h.

En los datos combinados, los efectos de la concentración de mCry3A y la presencia de Cry1Ab fueron independientes después de 72 horas y 96 horas ( $p > 0.05$ ). Por consiguiente, el efecto de la concentración de mCry3A se podría estudiar mediante el análisis conjunto de los datos con y sin Cry1Ab. De forma análoga, el efecto de Cry1Ab se podría estudiar mediante el análisis conjunto de los datos de CL30 y CL70.

En los datos combinados hubo un efecto estadísticamente significativo de la concentración de mCry3A después de 72 h y después de 96 h ( $p < 0.05$ ). Estos datos indican que EPC respondía como cabía esperar a diferentes concentraciones de mCry3A.

En los datos combinados, no se detectó ningún efecto estadísticamente significativo de Cry1Ab sobre la toxicidad de mCry3A después de 96 h ( $p > 0.05$ ). Sin embargo, en los datos combinados después de 72 h, se detectó un efecto estadísticamente significativo de Cry1Ab ( $p < 0.05$ ). Por consiguiente, esto indicó que existía una interacción entre mCry3A y Cry1Ab después de 72 h en los datos combinados. El aumento de la mortalidad en presencia de Cry1Ab indica que el efecto es sinergia (de acuerdo con la definición de Tabashnik, 1992) o potenciación (de acuerdo con la definición de Haghdoost *et al.*, 1997). Así pues, Cry1Ab potencia o sinergiza la actividad de mCry3A, lo cual hace que mCry3A trabaje más rápido contra insectos coleópteros diana de lo que cabría esperar con mCry3A solo. A escala comercial, una exterminación más rápida se traduce en menor daño para la planta y menos oportunidades para que las plagas de insectos coleópteros desarrollen resistencia.

Ejemplo ilustrativo 2. Interacción entre toxinas contra el gusano de las raíces del maíz

Este ejemplo investiga si existe una interacción, con respecto a la actividad insecticida, entre una mezcla proteica activa contra lepidópteros que comprende Cry1Ab y Vip3Aa20 ("Composición Lep") y una mezcla proteica activa contra coleópteros que comprende mCry3A ("Composición Col").

Los efectos de la Composición Lep sobre una plaga sensible de la especie del barrenador del maíz europeo (*Ostrinia nubilalis*; BME) se investigan en presencia o ausencia de la Composición Col. Se utilizan larvas en el estadio inicial para llevar a cabo el bioensayo de incorporación a la dieta del BME. El porcentaje de mortalidad de BME se evalúa 120 h después de la infestación. Se establece primero una curva de respuesta a la dosis para BME con ocho concentraciones de la Composición Lep. De la curva de respuesta a la dosis se seleccionan dos dosis, Dosis 1 para BME y Dosis 2 para BME, de la Composición Lep que ofrecen un nivel intermedio de respuesta para llevar a cabo el bioensayo para determinar la interacción entre proteínas activas contra lepidópteros y activas contra coleópteros. La Dosis 1 para BME comprende aproximadamente 25 ng de Cry1Ab y aproximadamente 12.5 ng de Vip3Aa20 por mL de dieta y la Dosis 2 para BME comprende aproximadamente 50 ng de Cry1Ab y aproximadamente 25 ng de Vip3Aa20 por mL de dieta. Por lo tanto, la Dosis 2 para BME tiene aproximadamente 2X la cantidad de proteína Cry1Ab y Vip3Aa20 que la Dosis 1 para BME.

Los resultados del bioensayo para BME se muestran en la Tabla 1. No se detecta ningún aumento estadísticamente significativo en el porcentaje de mortalidad de BME cuando la Dosis 2 para GRO de la Composición Col está presente, lo cual indica que no existe interacción entre la Composición Col que comprende mCry3A y la Composición Lep que comprende Cry1Ab + Vip3Aa20 basándose en el bioensayo para BME.

5

Tabla 1. Resultados del bioensayo para BME

Tratamiento	Porcentaje de mortalidad de BME
Dosis 1 para BME	21
Dosis 1 para BME + Dosis 2 para GRO	22
Dosis 2 para BME	36
Dosis 2 para BME + Dosis 2 para GRO	40
Dosis 2 para GRO	4
Tampón Lep (control negativo)	1
Tampón Lep + Col (control negativo)	4

Los efectos de la Composición Col sobre la plaga sensible de la especie del gusano de las raíces del maíz del oeste (GRO; *Diabrotica virgifera*) se investigan en presencia o ausencia de la Composición Lep. Se utilizan larvas en el estadio inicial para llevar a cabo el bioensayo de incorporación a la dieta del GRO. El porcentaje de mortalidad de GRO se evalúa 120 h después de la infestación. Se establece primero una curva de respuesta a la dosis para GRO con ocho concentraciones de la Composición Col. De la curva de respuesta a la dosis se seleccionan dos dosis, Dosis 1 para GRO y Dosis 2 para GRO, de la Composición Col que ofrecen un nivel intermedio de respuesta para llevar a cabo el bioensayo para determinar la interacción entre la Composición Lep y la Composición Col. La Dosis 1 para GRO comprende aproximadamente 50 µg de mCry3A por mL de dieta y la Dosis 2 de GRO comprende aproximadamente 200 µg de mCry3A por mL de dieta. Por lo tanto, la Dosis 2 para GRO tiene aproximadamente 4X la cantidad de proteína mCry3A que la Dosis 1 para GRO.

Los resultados del bioensayo para GRO se muestran en la Tabla 2. Estos resultados indican que el porcentaje de mortalidad de GRO es mayor cuando la Dosis 2 de la Composición Lep que comprende Cry1Ab + Vip3Aa20 está presente, lo cual indica que la combinación de la Composición Lep y la Composición Col extermina GRO en mayor medida de lo que cabría esperar con la Composición Col sola.

25

Tabla 2. Resultados del bioensayo para GRO

Tratamiento	Porcentaje de mortalidad de GRO
Dosis 1 para GRO	17
Dosis 1 para GRO + Dosis 2 para BME	46
Dosis 2 para GRO	48
Dosis 2 para GRO + Dosis 2 para BME	65
Dosis 2 para BME	1
Tampón Col (control negativo)	1
Tampón Col + Lep (control negativo)	1

Se debe sobreentender que los ejemplos y las realizaciones descritos en la presente se presentan a efectos

meramente ilustrativos.

Todas las publicaciones y solicitudes de patente mencionadas en esta memoria descriptiva son indicativas del nivel de experiencia de los expertos en la técnica a la que se refiere esta invención.

5

#### Referencias

Haghdoust, N.R., Newman, L.M. and Johnson, E.M. (1997) Multiple chemical exposures: synergism vs. individual exposure levels. *Reproductive Toxicology* **11**: 9-27.

10

MacIntosh, S.C., Stone, T.B., Sims, S.R., Hunst, P.L., Greenplate, J.T., Marrone, P.G., Perlak, F.J., Fiscoff, D.A. and Fuchs, R.L. (1990) Specificity and efficacy of purified *Bacillus thuringiensis* proteins against agronomically important insects. *Journal of Invertebrate Pathology* **56**: 258-266.

15

Software SAS, versión 9.1 del sistema SAS para Windows. Copyright (C) 2002-2003 SAS Institute Inc. SAS y todos los demás nombres de productos o servicios del SAS Institute Inc. son marcas registradas del SAS Institute Inc, Cary, NC, EE. UU.

20

Tabashnik, B. (1992) Evaluation of synergism among *Bacillus thuringiensis* toxins. *Applied and Environmental Microbiology* **58**: 3343-3346.

25

Tajima, O., Schoen, E.D., Feron, V.J. and Groten, J.P. (2002) Statistically designed experiments in a tiered approach to screen mixtures of *Fusarium* mycotoxins for possible interactions. *Food and Chemical Toxicology* **40**: 685-695.

30

Programa de análisis probit de la EPA, versión 1.5, EPA de EE. UU. (1992). División de Investigación del Monitoreo Ecológico, Laboratorio de Sistemas de Monitoreo Medioambiental, Agencia para la Protección Medioambiental de EE. UU., Cincinnati, OH, EE. UU.

30

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un método para controlar una plaga de insectos coleópteros, comprendiendo dicho método suministrar a una plaga de coleópteros o uno de sus entornos una composición que comprende al menos una proteína activa contra coleópteros y al menos una proteína activa contra lepidópteros, donde la composición controla la plaga de coleópteros en mayor medida de lo que cabría esperar si contuviera solamente una proteína activa contra coleópteros individual, donde la proteína activa contra coleópteros es una proteína Cry3A modificada y donde la proteína activa contra lepidópteros es una proteína Cry1Ab.
- 10 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, donde la plaga de coleópteros es un escarabajo de la papa de Colorado o un gusano de las raíces del maíz.
- 15 3. El método de acuerdo con la reivindicación 2, donde el gusano de las raíces del maíz se selecciona del grupo conformado por el gusano de las raíces del maíz del oeste, el gusano de las raíces del maíz del norte, el gusano de las raíces del maíz del sur y el gusano de las raíces del maíz mexicano.
- 20 4. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la composición es una planta transgénica que expresa la proteína activa contra coleópteros y la proteína activa contra lepidópteros.
5. El método de acuerdo con la reivindicación 4, donde la planta transgénica es una planta de maíz transgénica.
- 25 6. El método de acuerdo con la reivindicación 5, donde la planta de maíz transgénica es una combinación de cultivo que comprende los eventos de maíz transgénicos MIR604 y Bt11.
7. El método de acuerdo con la reivindicación 6, donde la planta de maíz transgénica comprende además el evento de maíz transgénico MIR162.
- 30 8. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde el insecto coleóptero es una plaga del gusano de la raíz del maíz y donde dicho método comprende suministrar a la plaga del gusano de la raíz del maíz o a un entorno de esta una composición que comprende una proteína Cry3A modificada (mCry3A) y una proteína Cry1Ab, donde la composición controla la plaga del gusano de la raíz del maíz en mayor medida de lo que cabría esperar con la proteína mCry3A sola.

35