

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 644 945**

51 Int. Cl.:

C07K 14/325 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

A01N 63/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.04.2008 PCT/US2008/005542**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.11.2008 WO08134072**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.04.2008 E 08754143 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.07.2017 EP 2142009**

54 Título: **Proteínas de toxinas activas contra hemípteros y coleópteros de *Bacillus thuringiensis***

30 Prioridad:

27.04.2007 US 914364 P

24.04.2008 US 109122

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
01.12.2017

73 Titular/es:

**MONSANTO TECHNOLOGY, LLC (100.0%)
800 NORTH LINDBERGH BOULEVARD
ST. LOUIS, MO 63167, US**

72 Inventor/es:

**BAUM, JAMES;
PENN, STEPHEN R.;
FLASINSKI, STANISLAW;
SHI, XIAOHONG;
HECK, GREGORY R. y
SUKURU, UMA RAO**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 644 945 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

Proteínas de toxinas activas contra hemípteros y coleópteros de *Bacillus thuringiensis*

Antecedentes de la Invención

Campo de la Invención

- 5 Esta invención se refiere en general al campo de las proteínas de *Bacillus thuringiensis* inhibidoras de insectos y, más en particular, a proteínas cristalinas de *B. thuringiensis* que inhiben insectos hemípteros. Se describen polinucleótidos y proteínas aislados, las plantas transgénicas y procedimientos relacionados que proporcionan la inhibición de insectos hemípteros. También se describen procedimientos para combinar las proteínas cristalinas de *B. thuringiensis* que inhiben insectos hemípteros con diferentes agentes de control de insectos para obtener niveles
- 10 aumentados de inhibición de insectos hemípteros, manejo de la resistencia de insectos hemípteros o un espectro ampliado del control de plagas de insectos.

Técnica Relacionada

Proteínas Cristalinas de *Bacillus thuringiensis*

- 15 La bacteria gram-positiva de la tierra *Bacillus thuringiensis* es muy conocida por su producción de cristales paraesporales proteínicos, o δ -endotoxinas, que son tóxicas a una diversidad de larvas de Lepidópteros, Coleópteros y Dípteros. *B. thuringiensis* produce proteínas cristalinas durante la esporulación que son específicamente tóxicas para ciertas especies de insectos. Muchas cepas diferentes de *B. thuringiensis* han demostrado producir proteínas cristalinas insecticidas, y se han utilizado en el mercado composiciones que comprenden cepas de *B. thuringiensis* que producen proteínas que tienen actividad insecticida como insecticidas aceptables para el medio ambiente debido
- 20 a su toxicidad para el insecto objetivo específico, y a su no toxicidad para plantas y otros organismos no objetivo.

Se han utilizado desde ya hace mucho tiempo formulaciones comerciales de aislados de *B. thuringiensis* naturales para el control biológico de plagas de insectos agrícolas. En la producción comercial, las esporas y cristales obtenidos del proceso de fermentación se concentran y formulan para la aplicación foliar de acuerdo con prácticas agrícolas convencionales.

- 25 Nomenclatura de las Proteínas Cristalinas

- Una revisión por Hofte y col., (Hofte y Whiteley, Microbiol. Rev., 53:242-255, 1989) describe el estado general de la técnica con respecto a la mayoría de las cepas de *B. thuringiensis* insecticidas que se han identificado las cuales son activas contra insectos del Orden de los Lepidópteros, es decir, insectos orugas. Este tratado también describe cepas de *B. thuringiensis* que tienen actividad insecticida contra insectos de los Ordenes de los Dípteros (es decir,
- 30 moscas y mosquitos) y Coleópteros (es decir, escarabajos). Una cantidad de genes que codifican proteínas cristalinas se han clonado de diversas cepas de *B. thuringiensis*. Hofte y col. (1989) describen los genes y proteínas que se identificaron en *B. thuringiensis* con anterioridad a 1990, y presenta la nomenclatura y esquema de clasificación que se ha aplicado tradicionalmente a genes y proteínas de *B. thuringiensis*. Los genes Cry1 codifican proteínas Cry1 tóxicas para Lepidópteros. Los genes Cry2 codifican proteínas Cry2 que son tóxicas tanto para Lepidópteros como para Dípteros. Los genes Cry3 codifican proteínas Cry3 tóxicas para Coleópteros, mientras que
- 35 los genes Cry4 codifican proteínas Cry4 tóxicas para los Dípteros.

- Recientemente, se ha propuesto una nueva nomenclatura la cual clasifica sistemáticamente las proteínas Cry basándose en la homología de secuencias de aminoácidos más que basándose en las especificidades de objetivos de insectos. Este esquema de clasificación y una lista exhaustiva de genes de *B. thuringiensis* inhibidores de insectos se sintetizan en el listado de Proteínas de Toxinas Insecticidas según lo expuesto en el sitio de Internet de Neil Crickmore al cual se accede a través de la Universidad de Cambridge en la Red Global Mundial, WWW en
- 40 lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/index.html.

Modo de Toxicidad de Proteínas Cristalinas

- 45 Todos los cristales de δ -endotoxinas son tóxicos para larvas de insectos por ingestión. La solubilización del cristal en el intestino medio del insecto libera la forma de protoxina de la δ -endotoxina la cual, en la mayoría de los casos, es posteriormente procesada a una toxina activa por la proteasa del intestino medio. Las toxinas activadas reconocen y se unen al borde en cepillo del epitelio del intestino medio de los insectos a través de proteínas receptoras. Se han aislado diversos receptores de proteínas cristalinas potenciales de ciertas larvas de insectos (Jurat-Fuentes JL, Adang MJ, Biochemistry. 45(32):9688, 2006; Griffiths JS y col, Science. 307(5711):922, 2005; Jurat-Fuentes JL, Adang MJ, Eur J Biochem.; 271(15):3127, 2004). La unión de toxinas activas es seguida por la intercalación y agregación de moléculas de toxinas para formar poros dentro del epitelio del intestino medio. Este proceso conduce a un desequilibrio osmótico, hinchazón, lisis de las células que recubren el epitelio del intestino medio, y a la eventual mortalidad de las larvas.
- 50

Con el advenimiento de técnicas genéticas moleculares, se han aislado diversos genes de δ -endotoxina y se han determinado sus secuencias de ADN. Estos genes se han utilizado para construir ciertos productos de *B. thuringiensis* genéticamente diseñados que han sido aprobados para uso comercial. Recientes desarrollos han visto nuevos sistemas de administración de δ endotoxinas desarrollados, incluyendo plantas que contienen y expresan genes de δ endotoxinas genéticamente diseñados. El control de plagas de Lepidópteros y Coleópteros en una diversidad de plantas de cultivo transgénicas incluyendo maíz, algodón, patata, tomate y arroz que expresan genes de δ endotoxinas está bien establecido. Las ventajas asociadas con la expresión de los genes de δ endotoxinas en plantas de cultivo incluyen rendimientos aumentados y uso disminuido de insecticidas químicos. Las ventajas de los cultivos transgénicos que expresan genes de δ endotoxina inhibidores de insectos han conducido al uso masivo en cultivos tales como el maíz y el algodón.

Desafortunadamente, los genes de δ endotoxina que están disponibles en la actualidad no proporcionan un control de todas las plagas de insectos que afectan a la producción de cultivos. En particular, los insectos Hemípteros aun deben ser controlados mediante el uso de insecticidas en cultivos en los que causan daño. Los insectos Hemípteros o "perforadores/ chupadores" son especialmente perjudiciales para las plantas en el sentido de que se sabe que además transmiten virus perjudiciales de las plantas y hacen que las plantas sean más susceptibles a la infección bacteriana y fúngica. Por lo tanto, existe la necesidad de materiales y procedimientos adicionales que permitirían la inhibición de plagas de insectos Hemípteros en cultivos. Existe además una necesidad de obtener diversos tipos diferentes de agentes de control de insectos Hemípteros con distintas modalidades de acción para utilizar en plantas transgénicas como herramientas de manejo de la resistencia a insectos Hemípteros.

Dada la necesidad de agentes de control de los insectos Hemípteros, se han descrito una diversidad de enfoques. La Patente de los Estados Unidos N.º 5.723.440 describe una proteína Cyt1Ba1 con supuesta actividad contra insectos Hemípteros. Sin embargo, Wellman-Desbiens y Cote (J. Econ. Entomol. 98(5):1469-1479, 2005) no pudieron confirmar esta actividad con el insecto Hemíptero *Lygus hesperus*. La Patente de los Estados Unidos N.º 5.885.963 desvela el uso de toxinas Cyt de *B. thuringiensis israelensis* que supuestamente inhiben plagas de Hemípteros. Más recientemente, el documento US 20060242732 desvela proteínas cristalinas de *B. thuringiensis* con actividad contra el insecto Hemíptero *Lygus lineolaris*. Estas proteínas no están relacionadas con las proteínas Cyt descritas en las Patentes de los Estados Unidos N.º 5.723.440 y 5.885.963.

Sumario de la Invención

En vista de los problemas expuestos anteriormente se ha desarrollado la presente invención.

La invención se refiere, en primer lugar, a un polinucleótido el cual codifica una proteína inhibidora de insectos TIC807, donde la proteína inhibidora de insectos comprende una secuencia polipeptídica que tiene al menos aproximadamente 70 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 5. Las secuencias polinucleotídicas de la invención también pueden codificar secuencias polipeptídicas con al menos 80 %, 90 % o 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 5. En ciertas realizaciones, el polinucleótido codifica la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 5.

Los polinucleótidos aislados de la invención pueden codificar una proteína inhibidora de insectos TIC807 que inhibe un insecto Hemíptero, un insecto Heteróptero o un insecto Homóptero. El insecto Hemíptero puede ser un insecto *Lygus* y el insecto Homóptero, un insecto *Leptinotarsa* sp. puede ser un áfido, un saltamontes o una mosca blanca. La proteína inhibidora de insectos TIC807 codificada inhibe *Lygus* a una concentración de la dieta de *Lygus* de por lo menos aproximadamente 5 ppm, 50 ppm, 250 ppm o 500 ppm (partes por millón) de la proteína TIC807 o fragmento proteico en la dieta de *Lygus*. Este polinucleótido que codifica la proteína TIC807 puede modificarse para la expresión mejorada en plantas en comparación con la secuencia codificadora natural. Un polinucleótido que codifica TIC807 que está diseñado para la expresión en plantas es proporcionado como SEQ ID NO: 6. Otros polinucleótidos que codifican TIC807 para la expresión en plantas se proporcionan como SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52 o SEQ ID NO: 53. El polinucleótido diseñado para la expresión en plantas puede codificar una proteína TIC807 con un péptido de direccionamiento al plastidio o al cloroplasto N-terminal como se proporciona por ejemplo en SEQ ID NO: 7 que comprende un polinucleótido diseñado para la expresión de la toxina TIC807 en plantas que también está ligado en fase a una secuencia nucleotídica que codifica un péptido de direccionamiento al plastidio. El péptido de direccionamiento al plastidio está operativamente ligado a TIC807 tras la expresión y funciona para dirigir la inserción de la toxina TIC807 en el plastidio de la planta.

Otros polinucleótidos aislados de la invención incluyen polinucleótidos que se hibridan en condiciones de alta rigurosidad con el gen TIC807 de *Bacillus thuringiensis* natural (SEQ ID NO: 4) o con el gen diseñado para expresión en la planta mejorada de TIC807, que tiene un contenido rico en G+C (SEQ ID NO: 6) en comparación con la secuencia codificadora natural expuesta en SEQ ID NO: 4. Los polinucleótidos que se hibridan en condiciones rigurosas pueden seleccionarse del grupo formado por SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 7.

La invención provee además plantas transgénicas o partes de plantas derivadas de las mismas que comprenden una proteína inhibidora de insectos TIC807, donde la proteína inhibidora de insectos TIC807 comprende una secuencia polipeptídica que tiene por lo menos aproximadamente 70 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO:

5. La planta transgénica o parte de planta comprende la proteína TIC807 a una concentración de por lo menos 5 µg a 250 µg de la proteína TIC807 por gramo de peso fresco de tejido vegetal. La parte de planta transgénica puede ser una célula, una hoja, un tallo, una flor, un sépalo, una fruta, una raíz o una semilla.

La invención también proporciona células huésped transformadas que comprenden un polinucleótido que codifica una proteína inhibidora de insectos TIC807, donde la proteína inhibidora de insecto o fragmento proteico comprende una secuencia polipeptídica que tiene por lo menos aproximadamente 70 % de identidad de secuencias con SEQ ID NO: 5. La célula huésped transformada puede ser una célula bacteriana o una célula de planta. Las células vegetales transformadas de la invención pueden seleccionarse del grupo formado por células vegetales de cebada, maíz, avena, arroz, centeno, sorgo, césped, caña de azúcar, trigo, alfalfa, banana, brócoli, judía, col, canola, zanahoria, mandioca, coliflor, apio, cítricos, algodón, una cucurbita, eucalipto, lino, ajo, uva, cebolla, lechuga, guisante, cacahuete, pimiento, patata, álamo blanco, pino, girasol, cártamo, soja, fresa, remolacha azucarera, batata, tabaco, tomate, planta decorativa, arbusto, nuez, garbanzo, guandul, mijos, lúpulos y pastizales. En ciertas realizaciones, la célula de planta transformada es una célula de planta de algodón. Las plantas derivadas de las células huésped de planta transformadas, las semillas producidas de las plantas derivadas de la célula huésped transformada, y las plantas descendientes de esa semilla son también contempladas. Las células huésped bacterianas transformadas de la invención pueden seleccionarse del grupo formado por una célula bacteriana de *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Pseudomonas* y *Rhizobium*. En ciertas realizaciones, la célula bacteriana transformada es una célula de *Bacillus thuringiensis*. Se desvela además en el presente documento un vector pIC7040 que alberga la cepa de *Escherichia coli* SIC8088 y que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína TIC807, comprendiendo dicha proteína TIC807 una secuencia polipeptídica que tiene al menos 70 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 5, depositado el 16 de marzo, 2007 con la Agricultural Research Culture Collection, Northern Regional Research Laboratory (NRRL), Peoria, Illinois Estados Unidos y que tiene N° de Acceso NRRLB-50030.

La invención proporciona además procedimientos para combatir *Lygus* que comprenden las etapas de: (a) proporcionar una cantidad inhibidora de *Lygus* de una proteína inhibidora de insectos TIC807, donde la proteína inhibidora de insectos comprende una secuencia polipeptídica que tiene por lo menos aproximadamente 70 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 5, y (b) poner en contacto el *Lygus* con la cantidad inhibidora de la secuencia polipeptídica, controlando de ese modo un insecto *Lygus*. La secuencia polipeptídica utilizada en este procedimiento también puede tener por lo menos aproximadamente 90 % o 100 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 5. En una realización de este procedimiento, la cantidad inhibidora de *Lygus* de la secuencia polipeptídica puede proporcionarse en una dieta de *Lygus* en la etapa (a) y el *Lygus* puede ponerse en contacto en la etapa (b) permitiendo que el *Lygus* se alimente de la dieta. En una realización más particular del procedimiento, la dieta de *Lygus* es una planta transgénica. Cuando la dieta de *Lygus* de este procedimiento es una planta transgénica, la cantidad inhibidora de *Lygus* de la secuencia polipeptídica es de por lo menos 5 µg a 250 µg por gramo de peso fresco de tejido de la planta transgénica. En otras realizaciones de este procedimiento, la cantidad inhibidora de *Lygus* de la secuencia polipeptídica se proporciona en la etapa (a) pulverizando una composición que comprende el polipéptido en una planta. La composición utilizada en esta realización del procedimiento comprende células bacterianas o esporas bacterianas que expresan el polipéptido. En realizaciones particulares del procedimiento, las células bacterianas o esporas bacterianas son células *Bacillus* o esporas de *Bacillus*. La composición utilizada en este procedimiento también puede comprender cristales paraesporales que contienen el polipéptido. En cualquiera de estos procedimientos de control de *Lygus*, la planta puede ser infestada con *Lygus*.

La invención provee además procedimientos para detectar o aislar un polinucleótido que codifica una proteína TIC807 en una muestra que comprende las etapas de: (a) seleccionar un par de cebadores oligonucleotídicos degenerados capaces de producir un amplicón, donde las secuencias de nucleótidos de los cebadores oligonucleotídicos degenerados son derivadas de una secuencia de polipéptido de SEQ ID NO: 5; (b) producir un amplicón a partir de la secuencia polinucleotídica en la muestra; y (c) detectar o aislar el amplicón, detectando o aislando de ese modo un polinucleótido que codifica una proteína TIC807 en una muestra. En este procedimiento, el amplicón detectado o aislado puede codificar un polipéptido que tiene por lo menos 70 % o 90 % de identidad de secuencia con TIC807 (SEQ ID NO: 5). Otros procedimientos para detectar o aislar un polinucleótido que codifica una proteína TIC807 en una muestra proporcionados en esta invención comprenden las etapas de: (a) seleccionar un oligonucleótido degenerado o colección de oligonucleótidos degenerados, donde las secuencias nucleotídicas de los cebadores oligonucleotídicos degenerados son derivadas de una secuencia polipeptídica TIC807 de SEQ ID NO: 5; (b) hibridar el oligonucleótido degenerado o colección de oligonucleótidos degenerados a la muestra; (c) detectar la hibridación en la muestra a un polinucleótido, detectando de ese modo un polinucleótido que codifica una proteína TIC807 en una muestra, y (d) aislar el polinucleótido detectado mediante hibridación en la etapa (c). En este procedimiento, el polinucleótido detectado puede codificar un polipéptido que tiene por lo menos 70 % o 90 % de identidad de secuencia con TIC807 (SEQ ID NO: 5).

La invención también proporciona procedimientos para expresar una proteína TIC807 en una planta que comprenden las etapas de: (a) insertar en un genoma de célula de planta una secuencia de ácidos nucleicos que comprende en la dirección 5' a 3' una molécula de ADN bicatenario, recombinante, unida operativamente, donde la molécula de ADN bicatenario, recombinante comprende: i. un promotor que funciona en la célula de planta; ii. una secuencia polinucleotídica que codifica un polipéptido que comprende una proteína inhibidora de insectos TIC807,

donde la proteína inhibidora de insectos tiene por lo menos 70 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 5; y iii. una secuencia nucleotídica no traducida en 3' que funciona en las células de la planta para causar terminación de la transcripción y poliadenilación, donde dicho promotor, dicha secuencia polinucleotídica, y dicha secuencia nucleotídica no traducida en 3' están ligadas operativamente, (b) obtener una célula de planta transformada que contiene la secuencia de ácidos nucleicos de la etapa (a) y (c) regenerar a partir de la célula de planta transformada una planta transformada que expresa la proteína TIC807, expresando de ese modo una proteína TIC807 en una planta. En este procedimiento, la secuencia polinucleotídica de la etapa (a) puede codificar ya sea una proteína TIC807 que tiene por lo menos 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 5 o puede codificar la proteína TIC807 de SEQ ID NO: 5. Esta secuencia polinucleotídica puede ser SEQ ID NO: 6 u otra secuencia diseñada para la expresión en plantas que codifica una proteína TIC807. Las secuencias polinucleotídicas diseñadas para la expresión en plantas incluyen, aunque sin limitarse a, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52 o SEQ ID NO: 53. En otras realizaciones de este procedimiento, la secuencia polinucleotídica de la etapa (a) que codifica una proteína TIC807 está operativamente ligada a una secuencia polinucleotídica que codifica un polipéptido de direccionamiento al plastidio. El polipéptido de SEQ ID NO: 8 comprende una proteína TIC807 que está operativamente ligada al polipéptido de direccionamiento al plastidio que puede utilizarse en ciertas realizaciones de este procedimiento.

La invención proporciona además vectores de ADN recombinante que comprenden en la dirección 5' a 3': i. un promotor que funciona en la célula de planta; ii. una secuencia polinucleotídica que codifica un polipéptido que comprende una proteína inhibidora de insectos TIC807, donde dicha proteína inhibidora de insectos o fragmento proteico comprende una secuencia polipeptídica que tiene por lo menos aproximadamente 70 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 5; y iii. una secuencia nucleotídica no traducida en 3' que funciona en las células de la planta para causar la poliadenilación, donde el promotor, dicha secuencia polinucleotídica y dicha secuencia de nucleótidos no traducida en 3' están ligadas operativamente. En estos vectores, la secuencia polinucleotídica también puede codificar ya sea una proteína TIC807 que tiene por lo menos 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 5 o puede codificar la proteína TIC807 de SEQ ID NO: 5. La secuencia polinucleotídica que codifica la proteína TIC807 puede ser una secuencia que está diseñada para la expresión en plantas. Las secuencias polinucleotídicas diseñadas para la expresión en plantas incluyen SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52 o SEQ ID NO: 53. En otras realizaciones, la secuencia polinucleotídica que codifica una proteína TIC807 está ligada operativamente a una secuencia polinucleotídica que codifica un polipéptido dirigido al plastidio. Un vector de la invención puede comprender una secuencia polinucleotídica que codifica el polipéptido de SEQ ID NO: 8, tal como la secuencia polinucleotídica SEQ ID NO: 7. Los vectores de la invención pueden comprender además un polinucleótido que codifica un gen marcador seleccionable. Un gen marcador seleccionable que confiere resistencia a AMPA, atrazina, bromoxinil, dalapon, dicamba, glifosato, higromicina, metotrexato, neomicina, fosfinotricina, una sulfonilurea o 2,4-D o sus combinaciones pueden utilizarse en los vectores de la invención.

También se proporcionan mediante esta invención productos de base producidos de una planta o semilla donde el producto básico contiene una cantidad detectable de una proteína TIC807 o un polinucleótido que codifica una proteína TIC807, comprendiendo dicha proteína TIC807 una secuencia polipeptídica que tiene al menos 70 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 5. Este producto básico puede obtenerse de una planta de algodón o de una semilla de una planta de algodón, o similarmente del maíz, arroz, trigo, soja, garbanzo, guandul, caña de azúcar y remolacha azucarera. Por ejemplo, cuando el producto básico se obtiene de una planta de algodón o de la semilla de una planta de algodón, el producto básico puede ser hila, aceite, harina o vainas.

La invención también provee un procedimiento para controlar al menos una plaga de insectos, no siendo dicho procedimiento un procedimiento para el tratamiento del cuerpo humano o animal por terapia y que comprende las etapas de: (a) proporcionar al menos dos agentes inhibidores de plagas de insectos diferentes en una composición, comprendiendo la composición (i) una cantidad inhibidora de insectos de una proteína TIC807 y una cantidad inhibidora de insectos de (ii) al menos una secuencia de ribonucleótidos que funciona tras la ingestión por la plaga de insectos para inhibir una función biológica en la plaga de insectos y/o (iii) una cantidad inhibidora de insectos de por lo menos una proteína inhibidora de insectos que no es una proteína TIC807; y (b) poner en contacto la al menos una plaga de insectos con una cantidad inhibidora de la composición, controlando de ese modo dicha al menos una plaga de insectos. En este procedimiento, la plaga de insectos controlada puede ser un insecto hemíptero, un insecto heteróptero o un insecto homóptero. Un insecto hemíptero controlado mediante el procedimiento es un insecto *Lygus*. Un insecto homóptero controlado por el procedimiento es un áfido, un saltamontes o una mosca blanca. En este procedimiento, una proteína inhibidora de insectos TIC807 comprende una secuencia polipeptídica que tiene al menos aproximadamente 70 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 5. Cuando una función biológica es inhibida por un ribonucleótido, la función biológica en la plaga de insectos en ii) puede ser una función biológica esencial. La función biológica esencial inhibida por el procedimiento puede ser proporcionada mediante una proteína esencial o ácido ribonucleico de la plaga de insectos, cuya función pronosticada se selecciona del grupo formado por formación de músculos, formación de la hormona juvenil, regulación de la hormona juvenil, regulación y transporte de iones, síntesis de enzimas digestivas, mantenimiento del potencial de la membrana celular, biosíntesis de aminoácidos, degradación de aminoácidos, formación de espermatozoides, síntesis de feromonas, detección de feromonas, formación de antenas, formación de alas, formación de patas, desarrollo y diferenciación, formación de huevos, maduración de larvas, formación de enzimas digestivas, síntesis de hemolinfas,

mantenimiento de hemolinfas, neurotransmisión, división celular, metabolismo de energía, respiración y apoptosis. La función biológica esencial puede ser inhibida en *Lygus* mediante una secuencia de ribonucleótidos que comprende entre 21 y 5000 nucleótidos contiguos que exhiben entre 80 y 100 % de identidad de secuencia con una secuencia codificadora de nucleótidos seleccionada del grupo formado por SEQ ID NO: 24 a SEQ ID NO: 39. En otras realizaciones de este procedimiento, la una proteína inhibidora de insectos que no es una proteína TIC807 puede obtenerse de *Bacillus thuringiensis*. Esta proteína inhibidora de insectos que no es una proteína TIC807 puede seleccionarse del grupo formado por AXMI-027, AXMI-039, AXMI-038, AXMI-018, AXMI-020, AXMI-021, AXMI-010, AXMI-003, AXMI-008, AXMI-006, AXMI-007, AXMI-009, AXMI-014, ET29, ET37, AXMI-004, AXMI-028, AXMI-029, AXMI-007, AXMI-008, AXMI-0080rf2, AXMI-009, AXMI-014, TIC809, TIC810, TIC812, TIC127 y TIC128. En otras realizaciones, donde dos proteínas inhibidoras de *Lygus* que no son una proteína TIC807 son expresadas en la planta, las dos proteínas inhibidoras de *Lygus* pueden comprender TIC809 y TIC810. En otras realizaciones del procedimiento, una segunda plaga de insectos pueden controlarse mediante la composición. En estas realizaciones del procedimiento, la segunda plaga de insectos puede inhibirse mediante la secuencia de ribonucleótidos de la composición o mediante la proteína que no es una proteína TIC807 de la composición. Esta segunda plaga de insectos puede ser una plaga de insectos lepidópteros. La segunda plaga de insectos puede inhibirse mediante una proteína seleccionada del grupo formado por una proteína Cry1A, una proteína Cry1B, una Cry1C, una proteína quimérica Cry1A/Cry1F y una proteína Cry2Ab. En ciertas realizaciones del procedimiento de control de por lo menos una plaga de insectos, la composición proporciona un efecto inhibidor de insectos sinérgico. En otras realizaciones del procedimiento de control de por lo menos una plaga de insectos, la composición proporciona un efecto inhibidor de insectos aditivo. En los procedimientos de control de por lo menos una plaga de insectos la composición puede ser una planta transgénica.

La invención también proporciona un procedimiento para proteger a una planta de la infestación de *Lygus* que comprende expresar una cantidad inhibidora de *Lygus* de por lo menos dos agentes inhibidores de *Lygus* diferentes en la planta, donde los agentes inhibidores de *Lygus* comprenden (i) una cantidad inhibidora de *Lygus* de una proteína TIC807; (ii) una cantidad inhibidora de *Lygus* de por lo menos una proteína inhibidora de *Lygus* que no es una proteína TIC807 y/o (iii) una cantidad inhibidora de *Lygus* de por lo menos una secuencia de ribonucleótidos que funciona tras la ingestión por el *Lygus* para inhibir una función biológica en el *Lygus*, protegiendo de ese modo a dicha planta de la infestación por *Lygus*. Esta función biológica esencial en *Lygus* puede ser proporcionada mediante una proteína esencial o ácido ribonucleico del *Lygus*, cuya función pronosticada se selecciona del grupo formado por formación de músculos, formación de la hormona juvenil, regulación de la hormona juvenil, regulación y transporte de iones, síntesis de enzimas digestivas, mantenimiento del potencial de la membrana celular, biosíntesis de aminoácidos, degradación de aminoácidos, formación de espermatozoides, síntesis de feromonas, detección de feromonas, formación de antenas, formación de alas, formación de patas, desarrollo y diferenciación, formación de huevos, maduración de larvas, formación de enzimas digestivas, síntesis de hemolinfas, mantenimiento de hemolinfas, neurotransmisión, división celular, metabolismo de energía, respiración y apoptosis. Esta función biológica esencial en *Lygus* puede inhibirse mediante una secuencia de ribonucleótidos que comprende entre 21 y 5000 nucleótidos contiguos que exhiben entre 80 y 100 % de identidad de secuencia con una secuencia codificadora de nucleótidos seleccionada del grupo formado por SEQ ID NO: 24 a SEQ ID NO: 39. En ciertas realizaciones de este procedimiento, la proteína inhibidora de *Lygus* que no es una proteína TIC807 se obtiene de *Bacillus thuringiensis*. La proteína inhibidora de *Lygus* que no es TIC807 puede seleccionarse del grupo formado por AXMI-027, AXMI-036, AXMI-038, AXMI-018, AXMI-020, AXMI-021, AXMI-010, AXMI-003, AXMI-008, AXMI-006, AXMI-007, AXMI-009, AXMI-014, ET29, ET37, AXMI-004, AXMI-028, AXMI-029, AXMI-007, AXMI-008, AXMI-0080rf2, AXMI-009, AXMI-014, TIC809, TIC810, TIC812, TIC127 y TIC128. En otras realizaciones, donde dos proteínas inhibidoras de *Lygus* que no son una proteína TIC807 son expresadas en la planta, las dos proteínas inhibidoras de *Lygus* pueden comprender TIC809 y TIC810. En este procedimiento, una proteína inhibidora de insectos TIC807 comprende una secuencia polipeptídica que tiene por lo menos 70 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 5. En ciertas realizaciones de este procedimiento, la expresión de los agentes inhibidores de *Lygus* proporciona un efecto inhibidor de *Lygus* sinérgico. En otras realizaciones de este procedimiento, la expresión de los agentes inhibidores de *Lygus* proporciona un efecto inhibidor de *Lygus* aditivo. Mediante el uso de este procedimiento, la planta puede ser protegida de *Lygus hesperus* o *Lygus lineolaris*.

La invención provee además proteínas inhibidoras de insectos, donde la proteína inhibidora de insectos comprende una secuencia polipeptídica que tiene al menos 70 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 5. La proteína puede tener una secuencia polipeptídica de por lo menos 80 %, 90 % o 95 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 5. La proteína también puede ser la proteína de SEQ ID NO: 5. La proteína puede comprender además una proteína vehículo. Esta proteína vehículo puede ser una albúmina o una proteína KLH. Las proteínas aisladas de la invención también pueden comprender una modificación covalente seleccionada del grupo formado por un reactivo indicador, un espaciador de aminoácidos, un enlazador de aminoácidos, una secuencia señal, una secuencia de péptidos de tránsito al cloroplasto, una secuencia de direccionamiento vacuolar, una secuencia de detención de transferencia, un dominio de transmembrana, un ligando de purificación proteica, o una combinación de los mismos.

La invención también proporciona anticuerpos que se unen específicamente a una proteína TIC807, donde la proteína TIC807 comprende una secuencia polipeptídica que tiene al menos 70 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 5.

Otras características y ventajas de la presente invención, así como también la estructura y operación de diversas realizaciones de la presente invención, se describen en detalle más adelante con referencia a los dibujos adjuntos.

Breve descripción de los dibujos

Los dibujos adjuntos, los cuales son incorporados en la memoria descriptiva, y forman parte de la misma, ilustran las realizaciones de la presente invención y junto con la descripción, sirven para explicar los principios de la invención. En los dibujos:

La Figura 1 ilustra una alineación global Needleman-Wunsch entre TIC807 (SEQ ID NO: 5) y Cry15Aa (SEQ ID NO: 41).

La Figura 2 ilustra el vector de transformación de planta mediada por *Agrobacterium* pMON105863 que contiene tanto un casete de expresión de planta TIC807 direccionado al plastidio como un casete de selección de neomicina en las secuencias límite de *Agrobacterium*.

La Figura 3 ilustra el vector de transformación de planta mediada por *Agrobacterium* pMON105864 que contiene tanto un casete de expresión de planta TIC807 como un casete de selección de neomicina en las secuencias límite de *Agrobacterium*.

Descripción Detallada de las Realizaciones Preferidas

I. Definiciones

Como se utiliza en el presente documento, la frase “efecto aditivo”, relacionado con la inhibición de insectos, se refiere a un efecto inhibidor obtenido combinando al menos dos agentes inhibidores de insectos diferentes que es: a) cuantitativamente equivalente al efecto aditivo pronosticado de la combinación de los dos agentes y/o es b) cualitativamente equivalente a la combinación de efectos obtenidos de cada agente administrado por sí solo. Los ejemplos de efectos cuantitativos incluyen cambios en CL₅₀, CE₅₀, CI₅₀, porcentaje de mortalidad, o porcentaje de valores de atrofia indicativos de mayor actividad inhibidora de insectos contra un objetivo de insecto conocido de ambos agentes inhibidores de insectos. Los ejemplos de efectos cualitativos aditivos incluyen un mayor espectro de inhibición de insectos (es decir, insectos hemípteros y lepidópteros) que reflejan la simple combinación del espectro exhibido por cada agente inhibidor de insectos (es decir, la combinación de inhibición de insectos hemípteros proporcionada por un agente y la inhibición de insectos lepidópteros proporcionada por otro agente).

La frase “secuencia consenso” como se utiliza en el presente documento se refiere a una secuencia de aminoácidos, ADN o ARN creada alineando dos o más secuencias homólogas y obteniendo una nueva secuencia que representa la secuencia de aminoácidos, ADN o ARN común.

El término “Construcción” como se utiliza en el presente documento se refiere a cualquier molécula polinucleotídica recombinante tal como un plásmido, cósmido, virus, molécula polinucleotídica de replicación autónoma, fago, o molécula de polinucleótidos de ADN o ARN, monocatenario o bicatenario, lineal o circular, derivada de cualquier fuente, capaz de integración genómica o replicación autónoma, que comprende una molécula de polinucleótido donde una o más moléculas de polinucleótido se han ligado de forma funcionalmente operativa, es decir, ligadas operativamente.

La frase “equivalentes funcionales biológicos” como se utiliza en el presente documento se refiere a péptidos, polipéptidos y proteínas que contienen una secuencia o característica estructural similar a una proteína TIC807 de la presente invención, y que exhiben la misma o similar actividad inhibidora de insectos de una proteína TIC807 de la presente invención. Los equivalentes funcionales biológicos también incluyen péptidos, polipéptidos y proteínas que reaccionan (es decir, se unen específicamente) con anticuerpos monoclonales y/o policlonales inducidos contra una proteína TIC807 y que exhiben la misma o similar actividad inhibidora de insectos que una proteína TIC807.

La frase “construcción de ADN” como se utiliza en el presente documento se refiere a cualquier molécula de ADN en la cual dos o más secuencias de ADN comúnmente distintas se han ligado covalentemente. Los ejemplos de construcciones de ADN incluyen plásmidos, cósmidos, virus, BAC (cromosoma artificial bacteriano), YAC (cromosoma artificial de levadura), minicromosomas de planta, secuencias de replicación autónoma, fago, o secuencias de ADN monocatenario o bicatenario, lineales o circulares, derivadas de cualquier fuente, que tienen capacidad de integración genómica o replicación autónoma. Las construcciones de ADN pueden ser ensamblados mediante una diversidad de procedimientos que incluyen técnicas de ADN recombinante, técnicas de síntesis de ADN, técnicas de PCR (Reacción en Cadena de Polimerasas), o cualquier combinación de técnicas.

La frase “un promotor heterólogo”, como se utiliza en el presente documento en el contexto de un construcción de ADN, se refiere a ya sea: i) un promotor que se obtiene de una fuente distinta del gen estructural operativamente ligado o ii) un promotor derivado de la misma fuente que el gen estructural ligado operativamente, donde la secuencia del promotor es modificada de su forma original.

La frase “condiciones de hibridación de alta rigurosidad” se refiere a condiciones de hibridación de ácidos nucleicos que comprenden una concentración de sal de aproximadamente 1X SSC, una concentración de detergente de aproximadamente 0,1 % de SDS, y una temperatura de aproximadamente 50°C, o sus equivalentes.

El término “homólogo” como se utiliza en el presente documento se refiere a un gen relacionado con un segundo gen por identidad de ya sea las secuencias de ADN o las secuencias proteicas codificadas. Los genes que son homólogos pueden ser genes separados mediante el evento de especiación (ver “ortólogo”). Los genes que son homólogos también pueden ser genes separados mediante el evento de duplicación genética (ver “parálogo”). Los homólogos pueden ser de organismos iguales o diferentes y pueden llevar a cabo la misma función biológica en el mismo organismo o en organismos diferentes.

El término “insecto” como se utiliza en el presente documento se refiere a cualquier forma embrionaria, larvaria, ninfa o adulta de un insecto Arácnido, Coleóptero, Ctenophalides, Díptero, Hemíptero, Homóptero, Heteróptero, Himenóptero o Lepidóptero.

La frase “una cantidad inhibidora de insectos”, se refiere a una cantidad de un polipéptido TIC807, un ribonucleótido, o una proteína que no es una proteína TIC807 que da como resultado cualquier inhibición medible del crecimiento de insectos, desarrollo de insectos, reproducción de insectos, comportamiento alimenticio de insectos, comportamiento de apareamiento de insectos y/o cualquier disminución medible en los efectos adversos causados por la alimentación de insectos en una planta. Similarmente, una “cantidad inhibidora de *Lygus*” se refiere a una cantidad de un polipéptido TIC807, un ribonucleótido, o una proteína que no es una proteína TIC807 que da como resultado cualquier inhibición medible del crecimiento de *Lygus*, desarrollo de *Lygus*, reproducción de *Lygus*, comportamiento alimenticio de *Lygus*, comportamiento de apareamiento de *Lygus* y/o cualquier disminución medible en los efectos adversos causados por la alimentación de *Lygus* en una planta.

Como se utiliza en el presente documento cuando se hace referencia a una “molécula de ADN aislada”, se entiende que la molécula de ADN es una que está presente, sola o en combinación con otras composiciones, pero no en el medio ambiente natural. Por ejemplo, una secuencia codificadora, secuencia intrón, secuencia guía no traducida, secuencia promotora, secuencia de terminación transcripcional, y similares, que se encuentran naturalmente en el ADN de un genoma de planta no se consideran aisladas del genoma de la planta siempre y cuando se encuentren dentro del genoma de la planta del cual se observó en primer lugar. Sin embargo, cada uno de estos componentes, y subpartes de estos componentes, sería “aislado” dentro del alcance de esta descripción siempre y cuando las estructuras y componentes no se encuentren dentro del genoma de la planta. Similarmente, una secuencia nucleotídica que codifica una proteína insecticida de *Bacillus thuringiensis* o cualquier variante insecticida de esa proteína sería una secuencia nucleotídica aislada siempre y cuando la secuencia nucleotídica no se encuentre dentro del ADN de la bacteria *Bacillus thuringiensis* de la cual se observó en primer lugar la estructura. Una secuencia nucleotídica artificial que codifica la misma secuencia de aminoácidos o una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica que es codificada por la secuencia nucleotídica de *B. thuringiensis* natural se consideraría aislada para los propósitos de esta divulgación. Para los propósitos de esta divulgación, cualquier secuencia nucleotídica transgénica, es decir, la secuencia nucleotídica del ADN insertado en el genoma de las células de una planta sería considerada una secuencia nucleotídica aislada ya sea que esté presente dentro del plásmido utilizado para transformar células vegetales de las cuales surgió el evento transgénico, dentro del genoma del evento transgénico, presente en cantidades detectables en tejidos, descendencia, muestras biológicas o productos de base derivados del evento transgénico. La secuencia nucleotídica o cualquier fragmento derivado de la misma sería considerada, por lo tanto, aislada o aislable si la molécula de ADN puede extraerse de células, o tejidos, u homogeneizado de una planta o semilla u órgano de planta; o puede producirse como un amplicón del ADN o ARN extraído de células, o tejidos, u homogeneizado de una planta o semilla u órgano de planta, cualquiera de los cuales se obtiene de tales materiales derivados del evento transgénico.

La frase “secuencia de ribonucleótidos que funciona tras la ingestión por la plaga de insectos para inhibir una función biológica” se refiere a secuencia de ARN que comprende una secuencia que es sustancialmente homóloga a una molécula de ARN codificada por una secuencia nucleotídica dentro del genoma del insecto, que proporciona la inhibición del insecto.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión “sustancialmente homóloga” u “homología sustancial” con referencia a una secuencia de ácidos nucleicos o de polipéptidos, se refiere a una secuencia nucleotídica o polipeptídica que tiene 65 % a 70 % de identidad de secuencia, o más preferentemente entre 80 % y 85 % de identidad de secuencia, o con mayor preferencia entre 90 % y 95 % de identidad de secuencia, a 99 % o 100 % de identidad de secuencia, con otra secuencia nucleotídica o polipeptídica.

Como se utiliza en el presente documento, la frase “efecto sinérgico”, haciendo referencia a la inhibición de insectos, se refiere a un efecto inhibidor obtenido combinando por lo menos dos agentes inhibidores de insectos diferentes que es: a) mayor cuantitativamente que el efecto aditivo pronosticado de la combinación de los dos agentes y/o es b) distinto cualitativamente de cualquier efecto obtenido de cualquiera de los dos agentes administrados por sí solos. Los ejemplos de efectos cuantitativos incluyen cambios en CL₅₀, CE₅₀, CI₅₀, porcentaje de mortalidad, o porcentaje de valores de atrofia indicativos de una mayor actividad inhibidora de insectos contra un objetivo de insecto conocido de ambos agentes inhibidores de insectos. Los ejemplos de efectos cualitativos sinérgicos incluyen un espectro expandido de inhibición de insectos (es decir, inhibición de insectos hemípteros, homópteros y lepidópteros) que no refleja la simple combinación del espectro exhibido por cada uno de los agentes inhibidores de insectos solo (es decir, la combinación de inhibición de insectos hemípteros proporcionada por un agente y la inhibición de insectos lepidópteros proporcionada por otro agente).

La frase "proteína TIC807" como se utiliza en el presente documento se refiere a una proteína inhibidora de insectos que presenta por lo menos 70 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 5.

La frase "proteína relacionada con TIC807" como se utiliza en el presente documento se refiere a una proteína inhibidora de insectos de por lo menos 250 aminoácidos que exhibe por lo menos 45 % de identidad de secuencia con una secuencia polipeptídica correspondiente contenida en SEQ ID NO: 5.

La frase "operativamente ligada" como se utiliza en el presente documento, se refiere a la unión de secuencias de ácidos nucleicos de modo que una secuencia puede proporcionar una función requerida a una secuencia ligada. En el contexto de un promotor, "ligado operativamente" significa que el promotor está conectado a una secuencia de interés de modo que la transcripción de esa secuencia de interés se controla y regula mediante ese promotor. Cuando la secuencia de interés codifica una proteína y cuando la expresión de esa proteína es deseada, "operativamente ligado" significa que el promotor está ligado a la secuencia de tal manera que el transcrito resultante sea traducido de forma eficaz. Si el ligamiento del promotor a la secuencia codificadora es una fusión transcripcional y se desea la expresión de la proteína codificada, el ligamiento se realiza de modo que el primer codón de inicio de la traducción en el transcrito resultante es el codón de inicio de la secuencia codificadora. Como alternativa, si el ligamiento del promotor a la secuencia codificadora es una fusión de traducción y se desea la expresión de la proteína codificada, el ligamiento se realiza de modo que el primer codón de inicio de la traducción contenido en la secuencia no traducida en 5' asociada con el promotor y está ligado de modo que el producto de traducción resultante esté en fase con la fase de lectura abierta de traducción que codifica la proteína deseada. Las secuencias de ácidos nucleicos que pueden estar operativamente ligadas incluyen secuencias que proporcionan funciones de expresión génica (es decir, elementos de expresión génica tales como promotores, regiones no traducidas en 5', intrones, regiones codificadoras de proteínas, regiones no traducidas en 3', sitios de poliadenilación y/o terminadores de la transcripción), secuencias que proporcionan transferencia de ADN y/o funciones de integración (es decir, secuencias límite de T-ADN, sitios de reconocimiento de recombinasa específico del sitio, sitios de reconocimiento de integrasa), secuencias que proporcionan funciones selectivas (es decir, marcadores de resistencia a un antibiótico, genes biosintéticos), secuencias que proporcionan funciones de marcadores a los que se puede poner puntuación (es decir, genes indicadores), secuencias que facilitan las manipulaciones *in vitro* o *in vivo* de las secuencias (es decir, secuencias polienlazadoras, secuencias de recombinación específica del sitio) y secuencias que proporcionan funciones de replicación (es decir, orígenes bacterianos de replicación, secuencias de replicación autónoma, secuencias centroméricas).

Como se utiliza en el presente documento, las frases o términos "identidad de secuencias", "similitud de secuencias" u "homología" se utilizan para describir relaciones de secuencias entre dos o más secuencias de nucleótidos. El porcentaje de "identidad de secuencias" entre dos secuencias se determina comparando dos secuencias óptimamente alineadas con respecto a una ventana de comparación, donde la porción de la secuencia en la ventana de comparación puede comprender adiciones o deleciones (es decir, espacios vacíos) en comparación con la secuencia de referencia (la cual no comprende adiciones o deleciones) para la alineación óptima de las dos secuencias. El porcentaje se calcula determinando la cantidad de posiciones en las cuales se produce la base de ácido nucleico idéntica o resto de aminoácido en ambas secuencias para proporcionar la cantidad de posiciones coincidentes, dividiendo la cantidad de posiciones coincidentes por la cantidad total de posiciones en la ventana de comparación, y multiplicando el resultado por 100 para dar el porcentaje de identidad de secuencias. Una secuencia que es idéntica en cada posición en comparación con una secuencia de referencia se dice que es idéntica a la secuencia de referencia y viceversa. Una primera secuencia nucleotídica cuando se observa en la dirección 5' a 3' se dice que es un "complemento" de, o complementaria a, una segunda secuencia de nucleótidos o de referencia observada en la dirección 3' a 5' si la primera secuencia nucleotídica exhibe complementariedad completa con la segunda secuencia o secuencia de referencia. Como se utiliza en el presente documento, se dice que las moléculas de la secuencia de ácidos nucleicos exhiben "complementariedad completa" cuando cada uno de los nucleótidos de una de las secuencia leída 5' a 3' es complementario a cada uno de los nucleótidos de la otra secuencia cuando se lee de 3' a 5'. Una secuencia nucleotídica que es complementaria a una secuencia de nucleótidos de referencia exhibirá una secuencia idéntica a la secuencia complemento inverso de la secuencia nucleotídica de referencia.

Como se utiliza en el presente documento, la frase "secuencia polipeptídica correspondiente contenida en SEQ ID NO: 5" se refiere a una secuencia polipeptídica en SEQ ID NO: 5 que proporcionará el porcentaje más alto de identidad cuando se alinea con la otra secuencia polipeptídica.

Como se utiliza en el presente documento, una "ventana de comparación" se refiere a un segmento conceptual de por lo menos 6 posiciones contiguas, generalmente 50 a 100, más en general 100 a 150, en el que una secuencia se compara con una secuencia de referencia de la misma cantidad de posiciones contiguas después de que las dos secuencias sean óptimamente alineadas. La ventana de comparación puede comprender adiciones o deleciones (es decir, espacios vacíos) de 20 % o menos en comparación con la secuencia de referencia (la cual no comprende adiciones o deleciones) para la alineación óptima de las dos secuencias. Los expertos en la técnica deberían consultar los procedimientos detallados utilizados para la alineación de secuencias en el programa informático Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0, Genetics Computer Group, 575 Science Drive Madison, Wis., Estados Unidos de América) o consultar Ausubel y col. (1998) para una descripción detallada del análisis de secuencias.

El término “regeneración” como se utiliza en el presente documento se refiere a cualquier procedimiento para obtener una planta entera de uno cualquiera de una semilla, una célula de planta, un grupo de células de planta, tejido de callo de planta, o un trozo cortado de una planta.

- 5 El término “transformación” como se utiliza en el presente documento se refiere a un proceso para introducir una secuencia de ADN exógeno (por ejemplo, un vector, una molécula de ADN recombinante) en una célula o protoplasto en el que el ADN exógeno se incorpora en un cromosoma o es capaz de replicación autónoma.

La frase “planta transgénica” se refiere a una planta o a su descendencia, derivada de una célula o protoplasto de planta transformado, donde el ADN de la planta contiene una molécula de ADN exógeno introducida no presente originalmente en una planta no transgénica, nativa, de la misma especie.

- 10 Las frases “ARN estabilizado”, “ARNbc estabilizado” y “ARNip estabilizado” se refieren a combinaciones de ARN transcrito, orientado con sentido y orientado antisentido, separado por secuencias cortas que permiten la formación de una estructura en forma de tallo-lazo u horquilla en la molécula de ARN.

- 15 La frase “tejido vascular” como se utiliza en el presente documento se refiere a cualquier tejido o célula contenido en el haz vascular de una planta, incluyendo células o tejidos de floema, protofloema, metafloema, xilema, protoxilema o metaxilema.

El término “vector” como se utiliza en el presente documento se refiere a cualquier construcción de polinucleótidos recombinante que puede utilizarse con el propósito de transformación, es decir, la introducción de ADN heterólogo en una célula huésped.

II. Polinucleótidos de la Invención

- 20 Una diversidad de polinucleótidos que codifican proteínas inhibidoras de insectos TIC807 son contemplados por esta invención. Dichos polinucleótidos son útiles para la producción de proteínas inhibidoras de insectos TIC807 en células huésped cuando se ligan operativamente a secuencias promotoras, de terminación de la transcripción y/o de poliadenilación adecuadas. Dichos polinucleótidos son también útiles como sondas para aislar polinucleótidos homólogos o sustancialmente homólogos que codifican proteínas TIC807.

- 25 Una fuente de polinucleótidos que codifican TIC807 es la cepa de *Bacillus thuringiensis* la cual contiene el polinucleótido de TIC807 de SEQ ID NO: 4 que codifica el polipéptido de TIC807 de SEQ ID NO: 5. Esta secuencia polinucleotídica fue aislada originariamente de un huésped de *Bacillus thuringiensis* y por lo tanto es adecuada para la expresión del polipéptido de TIC807 codificado en otros huéspedes bacterianos. Por ejemplo, SEQ ID NO: 4 puede utilizarse para expresar proteína TIC807 en huéspedes bacterianos que incluyen células huésped bacterianas de *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Pseudomonas* y *Rhizobium*. Las sondas de SEQ ID NO: 4 son
30 también útiles como sondas para aislar polinucleótidos homólogos o sustancialmente homólogos que codifican proteínas TIC807. Dichas sondas pueden utilizarse para identificar polinucleótidos homólogos o sustancialmente homólogos derivados de cepas de *Bacillus*.

- 35 Los polinucleótidos que codifican proteínas TIC807 también pueden sintetizarse de novo a partir de una secuencia polipeptídica TIC807. La secuencia del gen del polinucleótido puede deducirse de una secuencia polipeptídica TIC807 a través del uso del código genético. Pueden utilizarse programas informáticos tales como “BackTranslate” (paquete GCG™, Acclerys, Inc. San Diego, CA) para convertir una secuencia peptídica en la secuencia nucleotídica correspondiente que codifica el péptido. Los ejemplos de secuencias polipeptídicas TIC807 que pueden utilizarse para obtener secuencias codificadoras de nucleótidos correspondientes incluyen la secuencia polipeptídica TIC807
40 de SEQ ID NO: 5.

- Además, las secuencias de polinucleótidos de TIC807 sintéticas de la invención pueden ser diseñadas de modo que se expresen en plantas. La Patente de los Estados Unidos N.º 5.500.365 describe un procedimiento para sintetizar genes de plantas para mejorar el nivel de expresión de la proteína codificada por el gen sintetizado. Este procedimiento se refiere a la modificación de las secuencias de genes estructurales del transgén exógeno, para
45 hacer que sean transcritas, procesadas, traducidas y expresadas de forma más eficaz, por la planta. Las características de los genes que se expresan bien en plantas incluyen eliminación de secuencias que pueden causar el corte y empalme de intrones no deseado o poliadenilación en la región codificadora de un transcrito génico reteniendo al mismo tiempo sustancialmente la secuencia de aminoácidos de la porción tóxica de la proteína insecticida. Un procedimiento similar para obtener la expresión aumentada de transgenes en plantas monocotiledóneas se desvela en la Patente de los Estados Unidos N.º 5.689.052. Los ejemplos de secuencias de polinucleótidos diseñadas para la expresión de una proteína TIC807 en plantas incluyen SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO:
50 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52 o SEQ ID NO: 53.

III. Oligonucleótidos Aislados, Kits y Procedimientos para el Aislamiento y/o la Detección de Polinucleótidos que Codifican Proteínas TIC807

Los oligonucleótidos aislados para identificar, detectar o aislar polinucleótidos que codifican proteínas TIC807 también se desvelan en el presente documento.

- 5 Los oligonucleótidos aislados pueden comprender por lo menos 12 nucleótidos contiguos de una secuencia contenida en el gen codificador de TIC807 de *Bacillus thuringiensis* de SEQ ID NO: 4 o contenida en el complemento de SEQ ID NO: 4. Dichos oligonucleótidos pueden utilizarse en procedimientos de hibridación o basados en PCR para identificar o aislar polinucleótidos que codifican proteínas TIC807 de cepas de *Bacillus thuringiensis*. Dichos oligonucleótidos también pueden utilizarse para confirmar la presencia o ausencia de un polinucleótido codificador de TIC807 en una célula huésped. Se reconoce además que los oligonucleótidos pueden utilizarse para mutagenizar SEQ ID NO: 4 cuando comprenden secuencias adicionales que comprenden errores de emparejamiento con SEQ ID NO: 4. Dichos oligos de "mutagénesis" son útiles para la identificación de variantes de TIC807 con mayor actividad inhibidora de insectos.
- 10 Los oligonucleótidos aislados pueden comprender por lo menos 12 nucleótidos contiguos de una secuencia contenida en el polinucleótido de SEQ ID NO: 6 o contenida en el complemento de SEQ ID NO: 6. El polinucleótido de SEQ ID NO: 6 está específicamente diseñado para la expresión en plantas transgénicas y codifica la proteína TIC807 de SEQ ID NO: 5. Los oligonucleótidos aislados pueden comprender por lo menos 12 nucleótidos contiguos de una secuencia contenida en el polinucleótido de SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52 o SEQ ID NO: 53 o contenida dentro del complemento de SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52 o SEQ ID NO: 53. Dichos oligonucleótidos pueden utilizarse en procedimientos de hibridación o basados en PCR para detectar polinucleótidos SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52 o SEQ ID NO: 53 en muestras derivadas de plantas transgénicas. Cuando la muestra es una muestra de ácido ribonucleico, los oligonucleótidos pueden utilizarse en procedimientos de hibridación o basados en PCR para cuantificar los niveles de expresión del transgén de TIC807. Cuando la muestra es una muestra de ácido desoxirribonucleico, los oligonucleótidos pueden utilizarse en los procedimientos de hibridación o basados en PCR para determinar la presencia o ausencia del transgén TIC807 en la muestra. También se anticipa que los oligonucleótidos derivados de SEQ ID NO: 6 pueden utilizarse para determinar la presencia o ausencia de un transgén de TIC807 en una muestra de ácido desoxirribonucleico derivada de un producto básico. Dada la sensibilidad exquisita de ciertos procedimientos de detección de ácido nucleico que emplean oligonucleótidos, se anticipa que los oligonucleótidos derivados de SEQ ID NO: 6 también pueden utilizarse para detectar un transgén de TIC807 en productos de base derivados de fuentes agrupadas donde solamente una fracción del producto básico se obtiene de una planta transgénica que contiene SEQ ID NO: 6. Se reconoce además que los oligonucleótidos pueden utilizarse para mutagenizar SEQ ID NO: 6 cuando comprenden secuencias adicionales que comprenden errores de emparejamiento con SEQ ID NO: 6. Dichos oligonucleótidos de "mutagénesis" son útiles para la identificación de variantes de TIC807 con mayor actividad inhibidora de insectos y/o expresión aumentada en células huésped de plantas transgénicas.
- 20 Se entiende, naturalmente, que los oligonucleótidos de la invención pueden comprender además secuencias adicionales que no son idénticas o complementarias con las secuencias de polinucleótidos que codifican proteínas TIC807. Las secuencias adicionales pueden incluir secuencias utilizadas como adaptadores que facilitan la clonación, mutagénesis o detección. Los oligonucleótidos de la invención pueden comprender además modificaciones covalentes adicionales. Las modificaciones covalentes incluirían etiquetas detectables tales como isótopos, fluoróforos y haptenos. La biotina es un hapteno particularmente útil.
- 25 Los kits para la detección de una secuencia de polinucleótido de TIC807 en una muestra que comprende por lo menos un oligonucleótido que se hibrida específicamente con la secuencia polinucleotídica de SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53 o su complemento son contemplados también por esta invención. En el contexto de los kits de esta invención, la expresión "se hibrida específicamente" significa que los oligonucleótidos se hibridarán y detectarán SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52 o SEQ ID NO: 53 en una muestra de una planta transgénica transformada con una o más copias de SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52 o SEQ ID NO: 53 aunque no se hibridará de manera específica y no detectará secuencia alguna en una planta no transgénica control que no contiene SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52 o SEQ ID NO: 53. Estos kits también pueden comprender un polinucleótido control que se hibrida con dicho oligonucleótido, instrucciones de uso y/o reactivos para hibridar o detectar la hibridación de los oligonucleótidos con SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52 o SEQ ID NO: 53. En ciertas aplicaciones, incluyendo aquellas aplicaciones que utilizan una Reacción en Cadena de Polimerasa, los kits comprenderán de forma natural más de un oligonucleótido que se hibrida específicamente con la secuencia polinucleotídica de SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52

o SEQ ID NO: 53

IV. Oligonucleótidos Degenerados, Composiciones de Oligonucleótidos Degenerados y Procedimientos de Uso

Los oligonucleótidos degenerados, composiciones que comprenden oligonucleótidos degenerados, y procedimientos de utilización de dichos oligonucleótidos para identificar, detectar o aislar polinucleótidos que codifican una proteína TIC807 son también contemplados por esta invención. Si bien dichos oligonucleótidos degenerados se obtienen de SEQ ID NO: 5, los expertos en la técnica apreciarán que tales oligonucleótidos pueden utilizarse para identificar una diversidad de proteínas TIC807 y proteínas relacionadas con TIC807. Se prevé que dichas proteínas TIC807 tienen por lo menos 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 98 % o 100 % de identidad de aminoácidos con SEQ ID NO: 5 y que tienen actividad inhibidora de insectos. Las proteínas relacionadas con TIC807 tienen por lo menos 45 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 5 y tienen actividad inhibidora de insectos.

El diseño de secuencias de oligonucleótidos degenerados a partir de secuencias peptídicas se logra a través del uso del código genético, por el cual los codones correspondientes a cada uno de los aminoácidos codificados se sintetizan. Los oligonucleótidos degenerados pueden comprender un grupo de oligonucleótidos que comprende todas las secuencias potenciales que codifican una secuencia peptídica determinada. Como alternativa, los oligonucleótidos degenerados también pueden comprender una secuencia que contiene una base neutra (es decir, una base que puede formar par de bases de forma adecuada con todos los nucleótidos en una posición determinada). Las bases neutras incluyen inosina. Las consideraciones involucradas en el diseño y uso de cebadores o sondas de oligonucleótidos degenerados son bien conocidas por los expertos en la técnica (véase Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Tercera Edición), Sambrook y Russell, Cold Spring Harbor Press, 2001).

Pueden utilizarse composiciones que comprenden por lo menos dos cebadores oligonucleotídicos degenerados de por lo menos 12 nucleótidos de la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 5 en procedimientos de hibridación o basados en la reacción en cadena de polimerasas para el aislamiento o detección de polinucleótidos que codifican proteínas TIC807 o proteínas relacionadas con TIC807. Los oligonucleótidos degenerados de esta composición pueden comprender secuencias adicionales que no son idénticas o complementarias con las secuencias de polinucleótidos que codifican proteínas TIC807. Las secuencias adicionales pueden incluir secuencias utilizadas como adaptadores que facilitan la clonación, mutagénesis o detección. Los oligonucleótidos degenerados de la invención pueden comprender además modificaciones covalentes adicionales. Las modificaciones covalentes incluirían etiquetas detectables tales como isótopos, fluoróforos y haptenos. La biotina es un hapteno particularmente útil.

El uso de los cebadores oligonucleotídicos degenerados en procedimientos basados en PCR de aislamiento o detección de polinucleótidos que codifican una proteína TIC807 o una proteína relacionada con TIC807 en una muestra se contempla específicamente. Resumiendo, un par de cebadores oligonucleotídicos degenerados capaces de producir un amplicón se selecciona y se utiliza en una reacción en cadena de polimerasa con una muestra que contiene un polinucleótido que codifica una proteína TIC807 o una proteína relacionada con TIC807. Una fuente adecuada de muestras para este procedimiento incluye diversas cepas de *Bacillus thuringiensis*. Los oligonucleótidos degenerados son capaces de producir un amplicón cuando los oligonucleótidos corresponden a secuencias de hebra sentido y antisentido y están en una orientación 5' a 3' que cebará la síntesis mediada por polimerasa de ADN de una hebra de ADN que es complementaria con el otro oligonucleótido de oposición. Los cebadores oligonucleotídicos degenerados se obtienen de una secuencia polipeptídica TIC807 de SEQ ID NO: 5. Este amplicón puede ser detectado mediante el uso de un tinte de intercalación para producir un amplicón. El amplicón también puede aislarse clonando el fragmento del amplicón aislado en un plásmido, cósmido, bacteriófago u otro vector de clonación. Una vez clonado, este amplicón puede ser adicionalmente caracterizado por secuenciación para determinar el porcentaje de identidad de la proteína codificada por el amplicón con TIC807 (SEQ ID NO: 5). Se anticipa que los polinucleótidos que codifican proteínas TIC807 de por lo menos 70 %, o por lo menos 90 % de identidad con SEQ ID NO: 5 y proteínas relacionadas con TIC807 de por lo menos 45 % de identidad con SEQ ID NO: 5 pueden detectarse o aislarse mediante estos procedimientos. Dichas proteínas TIC807 o proteínas relacionadas con TIC807 pueden ser posteriormente exploradas para determinar la actividad inhibidora de insectos.

Los oligonucleótidos TIC807 degenerados también pueden utilizarse como sondas en procedimientos basados en hibridación para detectar o aislar polinucleótidos que codifican proteínas TIC807 o proteínas relacionadas con TIC807. Los procedimientos para detectar un polinucleótido que codifica una proteína TIC807 en una muestra comprenden, en primer lugar, seleccionar un oligonucleótido degenerado o colección de oligonucleótidos degenerados derivados de una secuencia polipeptídica TIC807 de SEQ ID NO: 5. Estos oligonucleótidos degenerados pueden comprender además etiquetas detectables tales como isótopos, fluoróforos y haptenos. La biotina es un hapteno particularmente útil. Las muestras incluyen muestras derivadas de diversas cepas de *Bacillus thuringiensis*. La muestra puede ser una biblioteca de plásmido, cósmidos o clones bacteriófagos derivados de una o más cepas de *Bacillus thuringiensis*. El oligonucleótido degenerado o colección de oligonucleótidos degenerados son hibridados a la muestra en condiciones de rigurosidad de hibridación adecuadas. Estas condiciones están relacionadas con la longitud del o de los oligonucleótidos degenerados, el grado de degradación, su contenido G+C, el porcentaje deseado o proyectado de identidad de secuencias de secuencias objetivo en la muestra y otros factores. La hibridación con un polinucleótido se detecta por procedimientos que incluyen procedimientos

radiométricos, fluorométricos, luminométricos y/o basados en ELISA. Tras la detección, el polinucleótido puede ser aislado por dilución seriada y rehibridación. Todas las etapas antes mencionadas de diseño de oligonucleótidos degenerados, etiquetado de oligonucleótidos, preparación de bibliotecas, hibridación, detección y aislamiento son bien conocidas por el experto en la técnica (véase *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Tercera Edición), Sambrook y Russell, Cold Spring Harbor Press, 2001). Se anticipa que pueden detectarse o aislarse mediante estos procedimientos polinucleótidos que codifican proteínas TIC807 de por lo menos 70 % o por lo menos 90 % de identidad con SEQ ID NO: 5 y proteínas relacionadas con TIC807 de por lo menos 45 % de identidad con SEQ ID NO: 5. Dichas proteínas TIC807 o proteínas relacionadas con TIC807 pueden posteriormente explorarse para determinar la actividad inhibidora de insectos tras la expresión en una cepa de *Bacillus thuringiensis* acristalífera. Las proteínas TIC807 o relacionadas con TIC807 pueden inhibir una plaga hemíptera tal como *Lygus*. Como alternativa, las proteínas TIC807 o relacionadas con TIC807 pueden inhibir otras plagas de insectos que incluyen plagas de Arácnidos, Coleópteros, Ctenophalides, Dípteros, Himenópteros o Lepidópteros, o pueden inhibir tanto plagas de hemípteros como otras familias de plagas de insectos.

V. Construcciones de ADN que Comprenden Casetes de Expresión Bacteriana de TIC807

Para expresar proteínas TIC807 en huéspedes bacterianos, los polinucleótidos que codifican TIC807 son operativamente ligados a promotores adecuados y secuencias de terminación de la transcripción que funcionan en huéspedes bacterianos para proporcionar casetes de expresión bacteriana. Los promotores y señales de terminación que funcionan en células bacterianas pueden obtenerse de genes bacterianos, genes bacteriófagos o procedimientos sintéticos. Después, estos casetes de expresión pueden ser transferidos a vectores bacterianos adecuados que comprenden orígenes de replicación y marcadores seleccionables por medio de técnicas de ADN recombinante convencionales.

En la práctica de esta invención, los promotores bacterianos, señales de terminación y vectores que funcionan en huéspedes *Bacillus* son particularmente útiles para la expresión de polipéptidos TIC807. En muchos casos, el gen TIC807 que comprende su promotor endógeno y secuencias de terminación pueden utilizarse para la expresión de proteínas TIC807 en células huésped de *Bacillus* que incluyen huéspedes de *Bacillus thuringiensis*. Para ese tipo de experimentos, el uso de un vector lanzadera que funciona tanto en huéspedes de *E. coli* como *Bacillus* es particularmente útil. Los ejemplos de dichos vectores lanzadera incluyen vectores tales como pEG854 descritos en la Patente de los Estados Unidos N.º 5.650.308. Estos vectores lanzadera incluyen genes marcadores de resistencia a un antibiótico que permiten la transformación de huéspedes *Bacillus*. Los huéspedes preferidos de *Bacillus thuringiensis* incluyen cepas huéspedes de *Bacillus thuringiensis* acristalíferas (deficientes en proteína Cry) tales como EG10368 y EG10650 (descritos en la Patente de los Estados Unidos N.º 5.759.538). Cuando la proteína TIC807 es expresada en cepas huéspedes de *Bacillus thuringiensis* acristalíferas (deficientes en proteína Cry), la proteína TIC807 es fácilmente aislada como un cristal paraesporal tras la inducción de la esporulación en las células huéspedes. Este fácil sistema de expresión de *Bacillus thuringiensis* puede utilizarse, por lo tanto, para analizar grandes cantidades de variantes de la proteína TIC807 para determinar la actividad inhibidora de insectos.

VI. Construcciones de ADN Que Comprenden Casetes de Expresión de Planta TIC807

La construcción de casetes de expresión para utilizar en plantas monocotiledóneas o plantas dicotiledóneas está bien establecida. Los casetes de expresión son construcciones de ADN donde diversas secuencias promotoras, codificadoras y de poliadenilación están ligadas operativamente. En general, los casetes de expresión típicamente comprenden un promotor que está ligado operativamente a una secuencia de interés la cual está operativamente ligada a una región terminadora o de poliadenilación. En ciertos casos que incluyen la expresión de transgenes en plantas monocotiledóneas, también puede ser útil incluir una secuencia intrón. Cuando se incluye una secuencia intrón, se coloca típicamente en la región guía no traducida en 5' del transgén. En ciertos casos, también puede ser útil incorporar secuencias no traducidas en 5' en un transgén para aumentar la estabilidad del transcrito o para promover la eficaz traducción del transcrito.

Puede utilizarse una diversidad de promotores en la práctica de esta invención. Una clase amplia de promotores útiles se menciona como promotores "constitutivos" en el sentido de que son activos en la mayoría de los órganos de plantas a lo largo del desarrollo de la planta. Por ejemplo, el promotor puede ser un promotor vírico tal como un promotor CaMV35S o FMV35S. Los promotores CaMV35S y FMV35S son activos en una diversidad de tejidos de planta transformados y en la mayoría de órganos de plantas (por ejemplo, callo, hoja, semilla y raíz). Las versiones mejoradas o duplicadas de los promotores CaMV35S y FMV35S son particularmente útiles en la práctica de esta invención (Patente de los Estados Unidos N.º 5.378.619). Otros promotores útiles de nopalina sintasa (NOS) y octopina sintasa (OCS) (los cuales son transportados en plásmidos inductores de tumores de *A. tumefaciens*), promotores 19S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV), un promotor de ubiquitina del maíz, el promotor Act1 del arroz y el promotor 35S del Virus del mosaico de Escrofularia (FMV) (véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos N.º 5.463.175).

Los promotores que son activos en ciertos tejidos vegetales (es decir, promotores específicos de tejidos) también pueden utilizarse para impulsar la expresión de proteínas TIC807 u otros agentes inhibidores de insectos. Puesto que ciertas plagas de insectos hemípteros son insectos "perforadores/chupadores" que se alimentan típicamente por inserción de sus proboscis en el tejido vascular de plantas huéspedes, promotores que dirigen la expresión de

agentes inhibidores de insectos en el tejido vascular de las plantas transgénicas son particularmente útiles en la práctica de esta invención. Diversos promotores de Caulimovirus, que incluyen los promotores CaMV35S, CaMV19S, FMV35S y sus versiones mejoradas o duplicadas, típicamente administran altos niveles de expresión en tejidos vasculares y son pues útiles para la expresión de proteínas TIC807 o de otros agentes inhibidores de insectos. Los virus limitados a floema tales como el virus del tungro del arroz (Bhattacharyya-Pakrasi y col., Plant J. 4[1] 71-79, 1993) y el virus del moteado amarillo de commelina (Medberry y col., Plant Cell 4:185-192, 1992) también contienen promotores útiles que son activos en tejidos vasculares. Para el control de insectos hemípteros que se alimentan del floema, pueden utilizarse promotores preferidos de floema o específicos de células de floema para expresar proteínas TIC807 u otros agentes inhibidores de insectos en el floema de plantas transgénicas. Los ejemplos de promotores específicos de floema incluyen promotores génicos del tipo PP2 (Patente de los Estados Unidos N.º 5.495.007), promotores de sacarosa sintasa (Yang y Russell, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:4144-4148, 1990), promotores de glutamina sintetasa (Edwards y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:3459-3463, 1990) y promotores de H⁺-ATPasa de la membrana plasmática específicos de floema (DeWitt y col., Plant J. 1[1]: 121-128, 1991), promotores de prunasin-hidrolasas (Patente de los Estados Unidos N.º 6.797.859), y un transportador de sacarosa del arroz (Patente de los Estados Unidos N.º 7.186.821). Para un control de plagas hemípteras que se alimentan de tejido de xilema, puede utilizarse una diversidad de promotores que son activos en tejido de xilema incluyendo protoxilema o metaxilema. Los promotores activos en tejido de xilema incluyen promotores asociados con rutas biosintéticas fenilpropanoides, tales como los promotores de fenilalanina amoníaco-liasa (PAL), promotores de cinamato 4-hidroxilasa (C4H), promotores de cumarato 3-hidroxilasa, promotores de O-metil transferasa (OMT), promotores de 4-cumarato:CoA ligasa (4CL) (Patente de los Estados Unidos N.º 6.831.208), promotores de cinamoil-CoA reductasa (CCR) y promotores de cinamil alcohol deshidrogenasa (CAD).

Los elementos potenciadores transcripcionales también pueden utilizarse en conjunto con cualquier promotor que es activo en una célula de planta o con cualquier elemento promotor basal que requiere un potenciador para la actividad en una célula de planta. Los elementos potenciadores transcripcionales pueden activar la transcripción en diversas células vegetales y tienen generalmente una longitud de 100-200 pares de bases. Los elementos potenciadores pueden obtenerse mediante síntesis química o por aislamiento de elementos reguladores que incluyen dichos elementos, y pueden comprender nucleótidos adicionales de flanco que contienen sitios de enzimas de restricción útiles para facilitar la manipulación de subsecuencias. Los elementos potenciadores pueden ser típicamente colocados dentro de la región 5' al sitio de protección terminal de ARNm asociado con un promotor, aunque también puede situarse en regiones que están 3' al sitio de protección terminal (es decir, dentro de una región no traducida en 5', un intrón, o 3' de un sitio de poliadenilación) para proporcionar niveles aumentados de expresión de genes ligados operativamente. Los elementos potenciadores también pueden ser multimerizados (proporcionados en cualquier cantidad finita de copias ligadas) para proporcionar la expresión aumentada de genes ligados operativamente. Los potenciadores multimerizados incluyen copias por duplicado, triplicado o cuadruplicado de potenciadores en cualquier orientación o combinación de orientaciones. Los potenciadores son a menudo derivados de promotores víricos de planta, particularmente aquellos del grupo Culimoviridae de ADN bicatenario que comprende los caulimovirus y los badnavirus. Los promotores víricos de plantas o potenciadores víricos de plantas derivados pueden proporcionar una fuerte expresión constitutiva de genes ligados operativamente en plantas transgénicas. Se ha demostrado que los potenciadores derivados de fragmentos de estos promotores aumentan eficazmente el rendimiento de promotores que impulsan la expresión de transgenes en plantas. Los ejemplos de virus de las plantas útiles para aislar potenciadores incluyen el virus del mosaico de la coliflor (CaMV), (véase, por ejemplo, Odel y col. Nature 313:810, 1985), el virus del mosaico de escrofularia (Patente de los Estados Unidos N.º 5.378.619), el virus del anillo grabado del clavel (CERV) (Hull y col., (1986) EMBO Journal 5:3083-3090), el virus del mosaico de las nervaduras de la yuca (CsVMV) (Calvert y col. (1995) J. Gen. Virol. 76: 1271-1278 y Patente de los Estados Unidos N.º 6.963.021), el virus del mosaico de *Mirabilis* (MMV) (Dey y col. (1999) Plant Mol Biol 40:771-82), el virus del rizado de la hoja amarilla de Cestrum (CmYLCV) (Stavolone y col. (2003) Plant Mol Biol. 53:663-73), el virus Multan la rizado de la hoja del algodón (CLCuMV) (Xie y col. (2003) Plant Mol Biol. 53:1-14), el virus del moteado amarillo de commelina (CoYMV) (Patente de los Estados Unidos N.º 6.963.021) y el caulimovirus de las rayas cloróticas del cacahuate (PCLSV) (Patente de los Estados Unidos N.º 5.850.019). Las duplicaciones de potenciadores se utilizan en versiones mejoradas de los promotores CaMV 35S y FMV 35S.

Diversas secuencias guía no traducidas en 5' también pueden estar operativamente ligadas a una secuencia codificadora de interés en un casete de expresión de planta. Por lo tanto, el casete de expresión de planta puede contener una o más secuencias guías no traducidas en 5' las cuales sirven para aumentar la expresión de secuencias codificadoras de ácidos nucleicos operativamente ligadas que codifican ya sea TIC807 u otras proteínas de interés. Sin desear estar limitados por teoría alguna, dichas secuencias guías no traducidas en 5' pueden aumentar la eficacia de traducción del ARNm resultante y/o aumentar la estabilidad del ARNm resultante para proporcionar niveles aumentados de la proteína operativamente ligada y codificada de interés en la planta transgénica. Los ejemplos de otras secuencias guías en 5' útiles incluyen las secuencias guías no traducidas dSSU 5', PetHSP70 5' y GmHSP17.9 5'. Una secuencia potenciadora de la traducción derivada de la secuencia guía no traducida del ARNm del gen de proteína de cubierta del gen de proteína del virus del mosaico de la alfalfa puede colocarse entre el promotor y el gen de interés para aumentar la eficacia de la traducción del gen de interés operativamente ligado (Patente de los Estados Unidos N.º 6.037.527).

Puede incluirse además un intrón en la construcción de expresión de ADN, especialmente en los casos en que la

secuencia de interés debe ser expresada en plantas monocotiledóneas. Para el uso de plantas monocotiledóneas, pueden utilizarse intrones tales como el intrón hsp70 del maíz (Patente de los Estados Unidos N.º 5.424.412), el intrón de ubiquitina del maíz, el intrón 1 de Adh (Callis y col., 1987), el intrón de sacarosa sintasa (Vasil y col., 1989) o el intrón de Act1 del arroz (McElroy y col., 1990). Los intrones de plantas dicotiledóneas que son útiles incluyen intrones tales como el intrón de CAT-1 (Cazzonelli y Velten, 2003), el intrón de pKANNIBAL (Wesley y col., 2001; Collier y col., 2005), el intrón de PIV2 (Mankin y col., 1997) y el intrón de "Super Ubiquitina" (Patente de los Estados Unidos N.º 6.596.925; Collier y col., 2005) que han sido integrados operativamente en transgenes.

Las secuencias que codifican péptidos que proporcionan la localización de una proteína TIC807 en orgánulos subcelulares pueden estar ligadas operativamente a las secuencias que codifican el polipéptido TIC807. Se espera que los polipéptidos TIC807 que están ligados operativamente a un péptido señal entren en la ruta de secreción y pueden ser retenidos por los orgánulos tales como el retículo endoplásmico (RE) o direccionados a la vacuola por ligamiento operativo de los péptidos de retención o direccionamiento adecuados al término C del polipéptido TIC807. Los ejemplos de péptidos de direccionamiento vacuolar incluyen, aunque sin limitarse a, una señal de direccionamiento vacuolar de CTPP del gen de lectina de la cebada. Los ejemplos de péptidos que se dirigen a RE incluyen un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos KDEL. Sin desear estar limitados por teoría alguna, la localización de polipéptidos TIC807 en ya sea el retículo endoplásmico o la vacuola puede proporcionar propiedades deseables tales como mayor expresión en plantas transgénicas y/o mayor eficacia en la inhibición de insectos en plantas transgénicas.

La localización de proteínas TIC807 a plastidios de plantas incluyendo cloroplastos es específicamente contemplada en esta invención. La localización del plastidio se logra típicamente mediante el ligamiento operativo de una secuencia peptídica de tránsito al cloroplasto al extremo N de la proteína TIC807. Los péptidos de tránsito al cloroplasto (o CTP) que pueden utilizarse para localizar proteínas TIC807 en plantas transgénicas pueden derivar de proteínas de plantas codificadas nucleares que se dirigen a plastidios. Las proteínas de plantas codificadas nucleares que se dirigen a plastidios incluyen proteínas involucradas en la biosíntesis de lípidos, almidón o aminoácidos, así como proteínas involucradas en la fotosíntesis. Los péptidos de tránsito al cloroplasto específicos que pueden utilizarse incluyen CTP de genes de Almidón Sintasa Unidos a Gránulo codificados nucleares, genes de Ácido Graso Desaturasa plastidiales, genes EPSPS y genes de subunidad pequeña de la RUBISCO. Un ejemplo de CTP es EPSPS CTP de *Arabidopsis*. Se proporciona en este documento un ejemplo de ácido nucleico (SEQ ID NO: 7) que codifica una EPSPS CTP de *Arabidopsis* que está ligada operativamente a una proteína TIC807. Sin desear estar limitados por teoría alguna, la localización de polipéptidos TIC807 en plastidios puede proporcionar propiedades deseables tales como mayor expresión en plantas transgénicas y/o mayor eficacia en la inhibición de insectos en plantas transgénicas. Se ha documentado la mayor expresión de otras proteínas de *Bacillus thuringiensis* a través del uso de péptidos de direccionamiento al cloroplasto tales como Cry1Bb (Solicitud de Patente de los Estados Unidos N.º 10/525318), Cry2Ab (Patente de los Estados Unidos N.º 6.489.542), y Cry3Bb (Patente de los Estados Unidos N.º 6.501.009). Sin desear estar limitados por teoría alguna, la mayor expresión de proteína TIC807 en una planta transgénica puede proporcionar niveles mayores de inhibición de insectos, un espectro ampliado de inhibición de plagas de insectos y/o un mayor grado de manejo de la resistencia de plagas de insectos.

Según lo señalado anteriormente, la secuencia de interés también puede estar ligada operativamente a una región no traducida en 3' que contiene una señal de poliadenilación. Esta señal de poliadenilación proporciona la adición de una secuencia de poliadenilato al extremo 3' del ARN. Las regiones no traducidas en 3' del gen de nopalina sintasa (NOS) del plásmido que induce el tumor (Ti) de *Agrobacterium* y 3' del gen ssRUBISCO E9 del guisante contienen señales de poliadenilato y representan ejemplos de tales regiones no traducidas en 3' que pueden utilizarse en la práctica de esta invención.

Las construcciones de ADN que comprenden los casetes de expresión de planta descritos anteriormente se mantienen, típicamente, en diversos vectores. Los vectores contienen secuencias que proporcionan la replicación del vector y secuencias ligadas covalentemente en una célula huésped. Por ejemplo, los vectores bacterianos contendrán orígenes de replicación que permiten la replicación del vector en uno o más huéspedes bacterianos. Los vectores de transformación de plantas mediada por *Agrobacterium* típicamente comprenden secuencias que permiten la replicación tanto en *E. coli* como en *Agrobacterium* así como también una o más secuencias "límite" posicionadas de modo que permitan la integración del casete de expresión en el cromosoma de la planta. Dichos vectores de *Agrobacterium* pueden adaptarse para el uso en ya sea *Agrobacterium tumefaciens* o en *Agrobacterium rhizogenes*. Los marcadores seleccionables que codifican genes que confieren resistencia a antibióticos son también típicamente incluidos en los vectores para proporcionar su mantenimiento en huéspedes bacterianos.

VII. Plantas Transgénicas Inhibidoras de Insectos y Procedimientos para Obtener Plantas Transgénicas Inhibidoras de Insectos

El presente documento también proporciona procedimientos para la obtención de una planta transgénica capaz de inhibir insectos. En primer lugar, los vectores de expresión adecuados para la expresión de la proteína TIC807 en diversas plantas dicotiledóneas y monocotiledóneas se introducen en una planta, una célula de planta o un tejido de planta utilizando técnicas de transformación según lo descrito en el presente documento. A continuación, se obtiene una planta transgénica que contiene o comprende el vector de expresión de TIC807 regenerando esa planta

transgénica de la planta, de la célula de planta o del tejido de planta que recibió el vector de expresión. La etapa final consiste en obtener una planta transgénica que expresa una cantidad inhibidora de insectos del polipéptido TIC807. Las plantas transgénicas que expresan cantidades inhibidoras de insectos de proteínas TIC807 contempladas en esta invención incluyen plantas de cebada, maíz, avena, arroz, centeno, sorgo, césped, caña de azúcar, trigo, alfalfa, banana, brócoli, judía, col, canola, zanahoria, mandioca, coliflor, apio, cítricos, algodón, una cucúrbita, eucalipto, lino, ajo, uva, cebolla, lechuga, guisante, cacahuete, pimienta, patata, álamo blanco, pino, girasol, cártamo, soja, fresa, remolacha azucarera, batata, tabaco, tomate, planta decorativa, arbusto, nuez, garbanzo, guandul, mijos, lúpulos y pastizales.

Los vectores de expresión de TIC807 pueden ser introducidos en los cromosomas de una planta huésped por medio de procedimientos tales como transformación mediada por *Agrobacterium*, transformación mediada por *Rhizobium*, transformación mediada por *Sinorhizobium*, transformación mediada por partículas, transfección de ADN, electroporación de ADN o transformación mediada por "whiskers". Los procedimientos adecuados para la transformación de plantas incluyen cualquier procedimiento mediante el cual el ADN puede introducirse en una célula, tal como por electroporación según lo ilustrado en la Patente de los Estados Unidos N.º 5.384.253; bombardeo de microproyectiles según lo ilustrado en las Patentes de los Estados Unidos N.º 5.015.580; 5.550.318; 5.538.880; 6.160.208; 6.399.861; y 6.403.865; transformación mediada por *Agrobacterium* según lo ilustrado en las Patentes de los Estados Unidos N.º 5.635.055; 5.824.877; 5.591.616; 5.981.840; y 6.384.301; y transformación de protoplasto según lo ilustrado en la Patente de los Estados Unidos N.º 5.508.184. Los procedimientos antes mencionados de introducción de genes son bien conocidos por los expertos en la técnica y son descritos en la Solicitud de Patente de los Estados Unidos N.º 20050289673 (transformación mediada por *Agrobacterium* del maíz), Patente de los Estados Unidos N.º 7.002.058 (transformación mediada por *Agrobacterium* de la soja), Patente de los Estados Unidos N.º 6.365.807 (transformación mediada por partículas del arroz) y Patente de los Estados Unidos N.º 5.004.863 (transformación mediada por *Agrobacterium* del algodón). A través de la aplicación de técnicas tales como estas, las células de prácticamente cualquier especie vegetal pueden transformarse establemente y estas células se desarrollan en plantas transgénicas. Otras técnicas que pueden ser particularmente útiles en el contexto de la transformación del algodón se desvelan en las Patentes de los Estados Unidos N.º 5.846.797, 5.159.135 y 6.624.344; y se desvelan en particular técnicas para transformar plantas *Brassica*, por ejemplo, en la Patente de los Estados Unidos N.º 5.750.871; y se desvelan técnicas para transformar soja en, por ejemplo, Zhang y col., 1999, y Patente de los Estados Unidos N.º 6.384.301; y se desvelan técnicas para transformar el maíz en WO9506722. Se describen procedimientos para el uso de bacterias tales como *Rhizobium* o *Sinorhizobium* para transformar plantas en Broothaerts y col. Nature 2005 10:433-629-33. Se entiende además que el vector de expresión de TIC807 puede comprender sitios de recombinación específicos del sitio de acción en cis reconocidos por recombinasas específicas del sitio, incluyendo Cre, Flp, Gin, Pin, Sre, pinD, Int-B13 y R. Pueden utilizarse entonces procedimientos para integrar moléculas de ADN en localizaciones específicas en los genomas de plantas transgénicas a través del uso de recombinasas específicas del sitio (Patente de los Estados Unidos N.º 7.102.055). Los expertos en la técnica apreciarán además que puede utilizarse cualquiera de estas técnicas de transferencia de genes para introducir el vector de expresión en el cromosoma de una célula de planta, un tejido de planta o una planta.

También se contempla el uso de vectores de transformación de plantas que comprende dos moléculas de T-ADN separadas, un T-ADN que contiene el gen o genes de interés (es decir, uno o más genes inhibidores de insectos de interés) y otro T-ADN que contiene un gen marcador seleccionable y/o que se puede puntuar. En estos dos vectores de T-ADN, el casete o los casetes de expresión vegetal que comprenden el gen o los genes de interés están contenidos dentro de un conjunto de secuencias límite de T-ADN y el casete o los casetes de expresión vegetal que comprenden los genes marcadores seleccionables y/o que se pueden puntuar están contenidos dentro de otro conjunto de secuencias límite de T-ADN. Preferentemente, las secuencias límite de T-ADN que flanquean los casetes de expresión vegetal comprenden tanto una secuencia límite de T-ADN izquierda como derecha que están orientadas operativamente para proporcionar la transferencia e integración de los casetes de expresión de planta en el genoma de la planta. Cuando se utiliza con un huésped de *Agrobacterium* adecuado en la transformación de plantas mediada por *Agrobacterium*, los dos vectores de T-ADN proveen la integración de una molécula de T-ADN que contiene el gen o los genes de interés en una ubicación cromosómica e integración del otro T-ADN que contiene el marcador seleccionable y/o que se puede puntuar en otra ubicación cromosómica. Las plantas transgénicas que contienen tanto el o los genes de interés como los genes marcadores seleccionables y/o que se pueden puntuar se obtienen, en primer lugar, mediante selección y/o puntuación del o de los genes marcadores y se exploran para determinar la expresión de los genes de interés. Posteriormente se cruzan líneas distintas de plantas transgénicas que contienen tanto el o los genes marcadores como el o los genes de interés para obtener una población de plantas transgénicas de descendencia que segregan tanto el o los genes marcadores como el o los genes de interés. Las plantas descendientes que contienen solamente el o los genes de interés pueden identificarse por cualquier combinación de técnicas de análisis de ADN, ARN o proteínas. Se han descrito procedimientos para utilizar dos vectores de T-ADN en la Patente de los Estados Unidos N.º 6.265.638, Patente de los Estados Unidos N.º 5.731.179, Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos N.º 2003110532A1 y Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos N.º 20050183170A1.

También pueden utilizarse en la práctica de esta invención procedimientos para introducir minicromosomas de plantas que comprenden centrómeros de plantas que proporcionan el mantenimiento del minicromosoma recombinante en una planta transgénica (Patente de los Estados Unidos N.º 6.972.197). En estas realizaciones de la

invención, las plantas transgénicas albergan los minicromosomas como elementos extracromosómicos que no están integrados en los cromosomas de la planta huésped.

Las plantas transgénicas se obtienen típicamente ligando el gen de interés (es decir, en este caso un casete de expresión de TIC807) a un gen marcador seleccionable, introduciendo los transgenes ligados en una célula de planta, un tejido de planta o una planta mediante una cualquiera de los procedimientos descritos anteriormente, y regenerando o de algún otro modo recuperando la planta transgénica en condiciones que requieren la expresión de dicho gen marcador seleccionable para el crecimiento de la planta. El gen marcador seleccionable puede ser un gen que codifica una proteína de fosfotransferasa de neomicina, una proteína fosfinotricina acetiltransferasa, una proteína 5-enol-piruvilshikimato-3-fosfato (EPSPS) resistente a glifosato, una proteína higromicina fosfotransferasa, una proteína dihidropteroato sintasa, una proteína acetolactato sintasa insensible a sulfonilurea, una proteína Q insensible a atrazina, una proteína nitrilasa capaz de degradar bromoxinil, una proteína deshalogenasa capaz de degradar dalapon, una proteína 2,4-diclorofenoxiacetato monooxigenasa, una proteína dihidrofolato reductasa insensible a metotrexato, y una proteína octopina sintasa insensible a aminoetilcisteína. Los genes selectivos correspondientes utilizados en conjunto con cada gen puede ser: neomicina (para la selección de la proteína neomicina fosfotransferasa), fosfinotricina (para la selección de la proteína fosfinotricina acetiltransferasa), glifosato (para la selección de la proteína 5-enol-piruvilshikimato-3-fosfato (EPSPS) resistente a glifosato), higromicina (para la selección de la proteína higromicina fosfotransferasa), sulfadiazina (para una selección de la proteína dihidropteroato sintasa), clorsulfuron (para una selección de la proteína acetolactato sintasa insensible a sulfonilurea), atrazina (para una selección de la proteína Q insensible a atrazina), bromoxinil (para una selección de la proteína nitrilasa), dalapon (para una selección de proteína deshalogenasa), ácido 2,4-diclorofenoxiacético (para una selección de la proteína 2,4-diclorofenoxiacetato monooxigenasa), metotrexato (para una selección de la proteína dihidrofolato reductasa insensible al metotrexato) o aminoetilcisteína (para una selección de la proteína octopina sintasa insensible a aminoetilcisteína).

Las plantas transgénicas también pueden obtenerse por ligamiento de un gen de interés (es decir, en este caso un casete de expresión de TIC807) a un gen marcador que se puede puntuar introduciendo los transgenes ligados en una célula vegetal por uno cualquiera de los procedimientos descritos anteriormente, y regenerando las plantas transgénicas de las células vegetales transformadas que dan resultado positivo en el ensayo para determinar la expresión del gen marcador que se puede puntuar. El gen marcador que se puede puntuar puede ser un gen que codifica una proteína beta-glucuronidasa, una proteína fluorescente verde, una proteína fluorescente amarilla, una proteína fluorescente roja, una proteína beta-galactosidasa, una proteína luciferasa derivada de un gen luc, una proteína luciferasa derivada de un gen lux, una proteína sialidasa, una proteína estreptomicina fosfotransferasa, una proteína nopalina sintasa, una proteína octopina sintasa o una proteína acetil transferasa de cloranfenicol.

Cuando el vector de expresión se introduce en una célula de planta o tejido de planta, las células o tejidos transformados se regeneran típicamente en plantas enteras cultivando estas células o tejidos en condiciones que promueven la formación de una planta entera (es decir, el proceso de regenerar hojas, tallos, raíces y, en ciertas plantas, tejidos reproductivos). El desarrollo o regeneración de plantas transgénicas de protoplastos de plantas únicos o diversos explantes es bien conocido en la técnica (Horsch, R.B. y col. 1985). Este proceso de regeneración y crecimiento típicamente incluye las etapas de selección de células transformadas y cultivo de células seleccionadas en condiciones que brindarán plántulas con raíces. Los brotes con raíces transgénicos resultantes son a continuación plantados en un medio de crecimiento de planta apropiado tal como suelo. Como alternativa, también pueden introducirse transgenes en meristemas de brotes de plantas aislados y pueden regenerarse plantas sin pasar por el cultivo de tejidos en etapa de callo (Patente de los Estados Unidos N.º 7.002.058). Cuando el transgén es introducido directamente en una planta, o más específicamente en el tejido meristemático de una planta, la semilla puede ser recolectada de la planta y seleccionada o puntuada para determinar la presencia del transgén. En el caso de especies de plantas transgénicas que se reproducen sexualmente, las semillas pueden recolectarse de plantas que han sido auto-polinizadas o se han cruzado externamente (es decir, utilizadas como un donante o receptor de polen) para establecer y mantener la línea de planta transgénica. Las plantas transgénicas que no se reproducen sexualmente puede propagarse vegetativamente para establecer y mantener la línea de planta transgénica. Como se utiliza en el presente documento, línea de planta transgénica se refiere a plantas transgénicas derivadas de un evento de transformación donde el transgén se ha insertado en uno o más lugares en el genoma de la planta. Una semilla producida mediante la planta transformada, una descendencia de dicha semilla, y una semilla producida por la descendencia de la planta transgénica original, producida de acuerdo con el proceso antes mencionado tendrán un transgén que codifica la proteína TIC807 incorporado establemente en su genoma y dichas plantas descendientes heredarán los rasgos proporcionados por la introducción de un transgén estable de manera Mendeliana. Todas las plantas transgénicas de ese tipo que han incorporado en su genoma segmentos de ADN transgénicos que codifican una o más proteínas o polipéptidos TIC807 son aspectos de esta invención. Se reconoce además que las plantas transgénicas que contiene las construcciones de ADN descritas en esta invención, y materiales derivados de las mismas, pueden identificarse a través del uso de PCR o de otros procedimientos que pueden detectar específicamente las secuencias en las construcciones de ADN.

Una vez que una planta transgénica se regenera o recupera, pueden utilizarse una diversidad de procedimientos para identificar u obtener una planta transgénica que expresa una cantidad inhibidora de insectos de TIC807. Un conjunto general de procedimientos consiste en realizar ensayos que miden la cantidad de TIC807 que se produce. Por ejemplo, pueden utilizarse diversos procedimientos de detección basados en anticuerpos que emplean

anticuerpos que reconocen TIC807 para cuantificar la cantidad de TIC807 producida. Los ejemplos de tales ensayos basados en anticuerpos incluyen, ELISA, RIA, u otros procedimientos donde un anticuerpo que reconoce TIC807 es etiquetado de forma detectable con una enzima, un isótopo, un fluoróforo y un lantánido. Mediante el uso de la proteína TIC807 purificada o aislada como un patrón de referencia en dichos ensayos (es decir, proporcionando cantidades conocidas de TIC807), puede determinarse la cantidad de TIC807 presente en el tejido de la planta en un mol por gramo de material vegetal o masa por gramo de material vegetal. La proteína TIC807 será expresada típicamente en la planta transgénica en el nivel de "partes por millón" o "ppm" donde los niveles en microgramos de proteína TIC807 están presentes en cantidades en gramos de peso fresco de tejido vegetal. En este caso, 1 microgramo de proteína TIC807 por 1 gramo de peso fresco de tejido vegetal representaría una concentración de TIC807 de 1 ppm. Una cantidad inhibidora de insectos de la proteína TIC807 es por lo menos 5 ppm (es decir, 5 µg de proteína TIC807 por gramo de peso fresco de tejido vegetal). En realizaciones preferidas, una cantidad inhibidora de insectos de la proteína TIC807 es por lo menos 50 ppm (es decir, 50 µg de la proteína TIC807 por gramo de peso fresco del tejido de la planta). En realizaciones más preferidas, la cantidad de TIC807 es por lo menos 250 ppm (es decir, 50 µg de proteína TIC807 por gramo de peso fresco de tejido de la planta).

Como alternativa, la cantidad de ARNm de TIC807 producido por la planta transgénica puede determinarse para identificar plantas que expresan cantidades inhibidoras de insectos de la proteína TIC807. Las técnicas para relacionar la cantidad de proteína producida con la cantidad de ARN producido son bien conocidas por los expertos en la técnica e incluyen procedimientos tales como la construcción de una curva patrón que relaciona niveles de ARN específicos (es decir, ARNm de TIC807) con niveles de la proteína TIC807 (determinados mediante procedimientos inmunológicos u otros procedimientos). Los procedimientos para medir el ARNm de TIC807 típicamente involucran la hibridación específica de un polinucleótido con ya sea el ARNm de TIC807 o con un ADNc (ADN complementario) o producto de PCR derivado del ARN de TIC807. Dichas sondas de polinucleótidos pueden obtenerse de las secuencias de nucleótidos de cadena con sentido y/o antisentido del transgén que codifica la proteína TIC807. La hibridación de una sonda de polinucleótidos al ARNm o al ADNc de TIC807 puede detectarse mediante procedimientos que incluyen el uso de sondas etiquetadas con un isótopo, un fluoróforo, un lantánido, o un hapteno tal como biotina o digoxigenina. La hibridación de la sonda etiquetada puede detectarse cuando el ARN de TIC807 está en solución o inmovilizado sobre un soporte sólido tal como una membrana. Cuando se mide el ARN de TIC807 mediante el uso de una Reacción en Cadena de Polimerasas con transcritasa inversa (qRT-PCR) cuantitativa, el producto de la PCR derivada de TIC807 puede detectarse mediante el uso de cualquiera de las sondas de polinucleótidos etiquetadas mencionadas anteriormente, mediante el uso de un tinte de intercalación tal como bromuro de etidio o verde SYBR, o mediante el uso de una sonda de hibridación que contiene un fluoróforo y un interruptor de modo que la emisión desde el fluoróforo se detecta, solamente, cuando el fluoróforo es liberado por la actividad de nucleasa en 5' de la polimerasa utilizada en la reacción de PCR (es decir, una reacción de TaqMan™; Applied Biosystems, Foster City, CA) o cuando el fluoróforo y el interruptor son desplazados mediante la síntesis mediada por polimerasa de la hebra complementaria (es decir, sondas Scorpion™ o Molecular Beacon™). Diversos procedimientos para realizar el análisis de qRT-PCR para medir los niveles de ARNm están bien caracterizados (Bustin, S.A.; Journal of Molecular Endocrinology 29, 23, 2002). Las sondas fluorescentes que son activadas por la acción de enzimas que reconocen complejos de ácidos nucleicos con errores de emparejamiento (es decir, Invader™, Third Wave, Technologies, Madison, WI) también pueden utilizarse para medir el ARN. Los expertos en la técnica también comprenderán que las técnicas de cuantificación de ARN tales como Amplificación Basada en Secuencias de Ácidos Nucleicos Cuantitativa (Q-NASBA™) pueden utilizarse para medir el ARNm que codifica la proteína TIC807 e identificar plantas de expresión.

Las plantas transgénicas que expresan cantidades inhibidoras de insectos de TIC807 también pueden identificarse ensayando directamente dichas plantas para la inhibición de insectos. Puesto que *Lygus* es un insecto perforador-chupador, fitófago, la expresión en planta y el ensayo de proteínas de toxinas debe presentarse de una manera que permita la alimentación por el insecto de la planta y sus tejidos asociados. Diversos factores son importantes en la selección de una especie de planta para la transformación que permitirán el ensayo de las proteínas de toxinas. La planta debe ser fácilmente transformable y el tejido derivado de la planta debe ser del tipo que es preferido por la plaga de insectos. Para este propósito, es preferible el uso de una planta que tiene hojas u otros órganos que tienen un área superficial suficientemente grande para unir una barrera que inhibe la movilidad de la plaga de insectos y fuerza al organismo a alimentarse del órgano de la planta. Además, el tejido vascular del órgano de la planta debe estar suficientemente cerca de la superficie del órgano para que la plaga de insecto sondee, penetre y posteriormente se alimente. También es preferible que la planta utilizada en la transformación sea del tipo que puede inducirse fácilmente a desarrollarse a partir del callo no diferenciado.

Las plagas de insectos tales como *Lygus*, cuando se alimentan de una planta de algodón, típicamente se alimentan primariamente de los brotes o de la vaina de la flor. La transformación del algodón es bien conocida en la técnica; sin embargo, el tiempo que lleva ir de la transformación de las células de la planta a una planta de algodón completamente desarrollada es demasiado largo para que sea práctico para propósitos de exploración. Por lo tanto, el tejido de callo de algodón no diferenciado sería el material de ensayo de planta transgénica inicial preferido cuando se estudia la alimentación del *Lygus* de células de algodón transformadas con proteínas TIC807. Las células de algodón son transformadas con construcciones que contienen el gen que codifica la proteína TIC807. El tejido de callo se deja desarrollar en cultivo de tejido después de la transformación en una placa de Petri. Luego, las ninfas del *Lygus* se colocan en la placa de Petri que contiene el callo. La tapa fijada de la placa de Petri evita el escape de las

ninfas de *Lygus*. Puede emplearse cualquier material que prevenga el escape de *Lygus* pero que permita el intercambio de gases en la placa de Petri, por ejemplo, Parafilm® para fijar la tapa de la placa de Petri. Un porcentaje de las ninfas de *Lygus* encontrarán el tejido del callo y se alimentarán. Luego se calculan las puntuaciones de la mortalidad y la atrofia teniendo en cuenta la muerte de fondo que se producirá de aquellos insectos que no se alimentan del tejido del callo. También se presentará a las ninfas de *Lygus* tejido de callo control que no es transformado con un gen que codifica TIC807 como un control para el crecimiento normal de las ninfas en tejido de callo.

Un tejido alternativo para la inhibición mediada por la proteína TIC807 es tejido de hoja. Podría utilizarse cualquier planta que posea tejido de hoja con un área superficial suficiente para colocar una barrera que impida que *Lygus* se escape. Por ejemplo, pueden transformarse células de alfalfa, maíz, soja o lechuga con construcciones que contienen el o los genes de interés que codifican la proteína toxina que han sido optimizados para la expresión de monocotiledóneas o dicotiledóneas. Se permite que las células transformadas se desarrollen en tejido calloso y posteriormente se regeneran en plantas. Después se permite que las plagas de insectos tales como las ninfas de *Lygus* se alimenten cuando la planta ha alcanzado un nivel suficiente de madurez, tal como cuando las hojas han crecido hasta un tamaño que permite el uso de una barrera física para evitar el escape de *Lygus*. La barrera para evitar el escape de las ninfas de *Lygus* puede ser cualquier dispositivo disponible en el mercado o hecho en casa que permita el contacto de las ninfas de *Lygus* con el tejido de la hoja y permita que el insecto sondee y se alimente del tejido vascular de la hoja. Las jaulas de clips similares a las descritas por Mowry (1993) (J. Agric. Entomol. 10:181-184) serían suficientes para contener ninfas de *Lygus* para la alimentación. Después se determinan las puntuaciones de mortalidad y atrofia con respecto a la muerte de fondo que se producirá de los insectos que no se alimentan del tejido de la hoja. También se presentaría a las ninfas de *Lygus* hoja control que no está transformada con un gen que codifica TIC807 como un control para el crecimiento normal de ninfas en tejido de callo.

Los ensayos de inhibición de insectos en planta pueden utilizarse para identificar plantas transgénicas que inhiben cualquiera de la gran diversidad de plagas de insectos que perforan y/o chupan los fluidos de las células y tejidos de plantas que deben restringirse al tejido del ensayo. En particular, puede utilizarse ese tipo de ensayos de inhibición de insectos para analizar plantas que expresan TIC807 y/u otros agentes inhibidores de insectos. Otros agentes inhibidores de insectos incluyen i) secuencias de ribonucleótidos que funcionan tras la ingestión por dicha plaga de insecto para inhibir una función biológica dentro de dicho insecto y ii) proteínas no TIC807 que son inhibidoras de insectos. Estas plagas de insectos incluyen aquellas plagas de insectos que perforan y luego chupan la savia de floema o contenido celular así como aquellos que maceran las células en la proximidad de la zona de alimentación y luego absorben el fluido que es liberado de las células maceradas a través de su proboscis. Los insectos a los que apuntan las proteínas TIC807 y otros agentes inhibidores de insectos descritos en el presente documento incluyen diversos insectos hemípteros, homópteros y heterópteros. La inhibición de insectos tales como *Lygus*, moscas blancas, saltamontes y áfidos es específicamente contemplada mediante el uso de TIC807 y de otros agentes inhibidores de insectos según lo descrito en el presente documento.

VIII. Procedimientos de Control de Insectos en Plantas Transgénicas

Plantas transgénicas de la presente invención que comprenden polinucleótidos que codifican proteínas inhibidoras de insectos TIC807 que comprenden una secuencia polipeptídica que tiene al menos 70 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 5 pueden utilizarse en procedimientos para controlar infestaciones de insectos. Pueden utilizarse en estos procedimientos plantas transgénicas de cebada, maíz, avena, arroz, centeno, sorgo, césped, caña de azúcar, trigo, alfalfa, banana, brócoli, judía, col, canola, zanahoria, mandioca, coliflor, apio, cítricos, algodón, una cucúrbita, eucalipto, lino, ajo, uva, cebolla, lechuga, guisante, cacahuete, pimienta, patata, álamo blanco, pino, girasol, cártamo, soja, fresa, remolacha azucarera, batata, tabaco, tomate, planta decorativa, arbusto, nuez, garbanzo, guandul, mijos, lúpulos y pastizales. Las plantas transgénicas como las plantas de alfalfa, canola, algodón, lechuga y fresa que son atacadas por plagas de insectos hemípteros inhibidas por las proteínas inhibidoras de insectos TIC807 que comprenden una secuencia polipeptídica que tiene al menos 70 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 5 son específicamente contempladas por esta invención. Aun más específicamente contempladas por la presente invención son las plantas transgénicas de algodón que comprenden polinucleótidos que codifican proteínas inhibidoras de insectos TIC807 que comprenden una secuencia polipeptídica que tiene al menos 70 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 5 que son protegidas de la infestación de insectos de la especie *Lygus*. Las plantas transgénicas de la presente invención son particularmente eficaces para el control de especies de insectos que perforan y/o chupan los fluidos de las células y los tejidos de las plantas, incluyendo chinches de las plantas en la familia Miridae tales como las chinches opacas de las plantas (especie *Lygus hesperus*), chinches ligus de las plantas (especie *Lygus lineolaris*), y las chinches Ligus (*Lygus elisus*) y chinches olorosas (especie de la familia Pentatomidae).

Los tipos específicos de plantas transgénicas que expresan proteínas inhibidoras de insectos TIC807 que comprenden una secuencia polipeptídica que tiene al menos 70 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 5 que inhibe plagas específicas de insectos son contemplados por esta invención. Las plantas de algodón transgénicas que expresan proteínas inhibidoras de insectos TIC807 que comprenden una secuencia polipeptídica que tiene al menos 70 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 5 que inhiben insectos Hemípteros que incluyen *Lygus*, saltamontes y áfidos son contempladas específicamente. Se prevé que las plantas de algodón transgénicas que expresan la proteína TIC807 de SEQ ID NO: 5 inhiben *Lygus hesperus* o *Lygus lineolaris*. Las plantas transgénicas

de alfalfa, canola, lechuga y fresas que expresan la proteína TIC807 de SEQ ID NO: 5 y que inhiben *Lygus* son también específicamente contempladas.

Las plantas transgénicas que expresan cantidades inhibitoras de insectos de las proteínas inhibitoras de insectos TIC807 que comprenden una secuencia polipeptídica que tiene al menos 70 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 5 son identificadas, en primer lugar, por uno cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento. La inhibición inicial de los insectos puede llevarse a cabo en condiciones ambientales controladas (es decir, en cámaras de crecimiento cerradas o invernaderos). Las plantas transgénicas también pueden ser sometidas a infestación por insectos en ensayos de campo y comparadas contra plantas controles no transgénicas. Típicamente, las plantas controles no transgénicas incluirán tanto plantas tratadas con insecticidas como plantas no tratadas. Las líneas de plantas transgénicas (es decir, plantas transgénicas derivadas de eventos de transformación distintos que comprenden inserciones de transgenes en diferentes lugares genómicos) que exhiben la mejor actividad inhibitora de insectos se seleccionan para el potencial desarrollo para utilizar en una diversidad de fondos genéticos diferentes (es decir, cultivares, variedades y/o germoplasmas híbridos genéticamente distintos). Los procedimientos para la introgresión de transgenes en germoplasmas distintos y producción de lotes de semillas que comprendan principalmente semilla transgénica son conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, el transgén puede ser fijado en un estado homocigótico en un fondo genético deseado. Una vez que el transgén es fijado en ese fondo, la planta transgénica homocigótica puede utilizarse para producir semillas transgénicas de cultivos no híbridos. Como alternativa, la planta transgénica homocigótica puede utilizarse como un donante o receptor de polen para producir semillas transgénicas de cultivos híbridos.

Los tipos específicos de plantas transgénicas que expresan proteínas TIC807 con al menos 70 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 5 y que inhiben plagas de insectos específicas son contemplados por esta invención. Las plantas transgénicas de algodón que expresan proteínas TIC807 que inhiben insectos hemípteros que incluyen *Lygus*, saltamontes y áfidos son específicamente contempladas. Se anticipa que las plantas transgénicas de algodón que expresan la proteína TIC807 de SEQ ID NO: 5 inhiben *Lygus hesperus* o *Lygus lineolaris*. Las plantas transgénicas de alfalfa, canola y fresa que expresan la proteína TIC807 de SEQ ID NO: 5 y que inhiben *Lygus* son también específicamente contempladas.

IX. Procedimientos de Control No Transgénicos y Composiciones

Las composiciones de proteína TIC807 desveladas en el presente documento serán utilizables en particular como agentes inhibidores de insectos para aplicación tópica y/o sistémica a cultivos de campo, hierbas, frutas y verduras y plantas decorativas. Más específicamente, TIC807 puede utilizarse en composiciones que comprenden una cantidad inhibitora de insectos de una composición de proteína TIC807. Con respecto a esto, las composiciones de proteína TIC807 preparadas de preparaciones de proteínas cristalinas TIC807 para esporas de *Bacillus thuringiensis* son particularmente útiles. La composición de proteínas TIC807 puede comprender la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 o a una proteína inhibitora de insectos que exhibe por lo menos 70 % de identidad de secuencias con SEQ ID NO: 5.

La composición inhibitora de insectos también puede comprender una célula de *Bacillus thuringiensis*, o un cultivo de estas células, o una mezcla de una o más células de *B. thuringiensis* que expresan una o más de las proteínas cristalinas TIC807 de la invención. En ciertos aspectos, puede ser deseable preparar composiciones las cuales contienen una pluralidad de proteínas cristalinas, ya sea nativas o modificadas, para el tratamiento de uno o más tipos de insectos susceptibles.

Los inventores contemplan que puede emplearse cualquier procedimiento de formulación conocido por los expertos en la técnica utilizando las proteínas desveladas en el presente documento para preparar ese tipo de composiciones inhibitoras de insectos. Puede ser conveniente formular preparaciones de células enteras, extractos celulares, suspensiones celulares, homogeneizados celulares, lisados celulares, sobrenadantes celulares, filtrados celulares o sedimentos celulares de un cultivo celular (preferentemente un cultivo celular bacteriano tal como un cultivo de *Bacillus thuringiensis*) que expresa uno o más segmentos de ADN de TIC807 para producir la o las proteínas o el o los péptidos TIC807 codificados. Los procedimientos para preparar dichas formulaciones son conocidos por los expertos en la técnica, y pueden incluir, por ejemplo, desecación, liofilización, homogeneización, extracción, filtración, centrifugación, sedimentación o concentración de uno o más cultivos de células bacterianas, tales como células SIC8091, SIC8092, SIC8093 y SIC8094 de *Bacillus*, que expresan el o los péptidos de TIC807 de interés.

La composición inhibitora de insectos comprende una suspensión fluible en aceite que comprende células bacterianas lisadas o no lisadas, esporas, o cristales los cuales contienen una o más de las proteínas cristalinas novedosas desveladas en el presente documento. Preferentemente, las células son células de *B. thuringiensis*, sin embargo, se contempla la utilidad de cualquier célula huésped bacteriana de ese tipo que exprese los segmentos novedosos de ácido nucleico desvelados en el presente documento y que produzca una proteína cristalina, tal como *Bacillus* spp., incluyendo *B. megaterium*, *B. subtilis*; *B. cereus*, *Escherichia* spp., incluyendo *E. coli*, y/o *Pseudomonas* spp., incluyendo *P. cepacia*, *P. aeruginosa* y *P. fluorescens*. Como alternativa, la suspensión fluible en aceite puede consistir en una combinación de una o más de las siguientes composiciones: células bacterianas lisadas o no lisadas, esporas, cristales y/o proteínas cristalinas purificadas.

La composición inhibidora de insectos puede comprender un gránulo o polvo dispersable en agua. Este gránulo o polvo puede comprender células bacterianas lisadas o no lisadas, esporas o cristales los cuales contienen una o más de las proteínas cristalinas novedosas desveladas en el presente documento. Las fuentes preferidas para estas composiciones incluyen células bacterianas tales como células de *B. thuringiensis*, sin embargo, bacterias del género *Bacillus*, *Escherichia* y *Pseudomonas* que se han transformado con un segmento de ADN desvelado en el presente documento y que expresan la proteína cristalina son también contempladas como útiles. Como alternativa, el gránulo o polvo puede consistir en una combinación de una o más de las siguientes composiciones: células bacterianas lisadas o no lisadas, esporas, cristales y/o proteínas cristalinas purificadas.

La composición inhibidora de insectos puede comprender un polvo humectable, pulverización, emulsión, coloide, solución acuosa u orgánica, polvillo, sedimento o concentrado coloidal. Ese tipo de composición puede contener ya sea células bacterianas lisadas o no lisadas, esporas, cristales o extractos celulares según lo descrito anteriormente, que contienen una o más de las proteínas cristalinas novedosas desveladas en el presente documento. Las células bacterianas preferidas son células de *B. thuringiensis*, sin embargo, bacterias tales como células de *B. megaterium*, *B. subtilis*, *B. cereus*, *E. coli* o *Pseudomonas* spp. transformadas con un segmento de ADN desvelado en el presente documento y que expresan la proteína cristalina son también contempladas como útiles. Dichas formas secas de las composiciones insecticidas pueden formularse para disolverse inmediatamente tras ser humedecidas o, como alternativa, pueden disolverse en una forma de liberación controlada, liberación sostenida, u otra forma dependiente del tiempo. Como alternativa, ese tipo de composición puede consistir en una combinación de una o más de las siguientes composiciones: células bacterianas lisadas o no lisadas, esporas, cristales y/o proteínas cristalinas purificadas.

En una cuarta realización, la composición inhibidora de insectos puede comprender una solución o suspensión acuosa o cultivo celular de células bacterianas lisadas o no lisadas, esporas, cristales, o una mezcla de células bacterianas lisadas o no lisadas, esporas y/o cristales, tales como aquellos descritos anteriormente los cuales contienen una o más de las proteínas cristalinas novedosas desveladas en el presente documento. Tales soluciones o suspensiones acuosas pueden proporcionarse como una solución de reserva concentrada la cual es diluida con anterioridad a la aplicación o, como alternativa, como una solución diluida lista para aplicar.

Para estos procedimientos que involucran la aplicación de células bacterianas, el huésped celular que contiene el o los genes de proteína TIC807 puede cultivarse en cualquier medio nutriente conveniente, donde la construcción de ADN provee una ventaja selectiva, proporcionando un medio selectivo de modo que sustancialmente la totalidad o todas las células retengan el gen de *B. thuringiensis*. Después, estas células pueden recolectarse de acuerdo con modos convencionales. Como alternativa, las células pueden ser tratadas con anterioridad a la recolección.

Cuando las composiciones insecticidas comprenden células de *B. thuringiensis*, esporas y/o cristales que contienen la o las proteínas cristalinas modificadas de interés, dichas composiciones pueden ser formuladas de diversas maneras. Pueden emplearse como polvos, gránulos o polvillos humectables, mezclando con diversos materiales inertes, tales como minerales inorgánicos (filosilicatos, carbonatos, sulfatos, fosfatos y similares) o materiales botánicos (mazorcas de maíz en polvo, cáscaras de arroz, cáscaras de nuez, y similares). Las formulaciones pueden incluir adyuvantes de la pegajosidad-esparcimiento, agentes estabilizantes, otros aditivos pesticidas, o tensioactivos. Las formulaciones líquidas pueden tener base acuosa o no acuosa y pueden emplearse como espumas, suspensiones, concentrados emulsionables. Los ingredientes pueden incluir agentes reológicos, tensioactivos, emulsionantes, dispersantes o polímeros.

Como alternativa, las proteínas TIC807 pueden prepararse por sistemas de expresión bacteriana natural o recombinante *in vitro* y pueden aislarse para la subsiguiente aplicación al campo. Dicha proteína puede estar ya sea en lisados celulares en bruto, suspensiones, coloides, o como alternativa puede purificarse, refinarse, tamponarse y/o procesarse adicionalmente, antes de la formulación en una formulación biocida activa. Asimismo, en ciertas circunstancias, puede ser deseable aislar cristales y/o esporas de cultivos bacterianos que expresan la proteína cristalina y aplicar soluciones, suspensiones o preparaciones coloidales de dichos cristales y/o esporas como la composición bioinsecticida activa.

Sin importar el procedimiento de aplicación, la cantidad del o de los componentes activos se aplica en una cantidad inhibidora de insectos, la cual varía dependiendo de factores tales como, por ejemplo, los insectos específicos hemípteros, homópteros o heterópteros que se desean controlar, la planta o cultivo específico que se va a tratar, las condiciones ambientales, y el procedimiento, proporción y cantidad de aplicación de la composición inhibidora de insectos.

Las composiciones inhibidoras de insectos descritas pueden prepararse formulando la célula bacteriana, cristal y/o suspensión de esporas, o componente proteico aislado con el vehículo aceptable para uso en agricultura deseado. Las composiciones pueden ser formuladas con anterioridad a la administración en un medio apropiado tal como liofilizado, criodesecado, disecado o en un vehículo acuoso, medio o diluyente adecuado, tal como solución salina u otro tampón. Las composiciones formuladas pueden estar en la forma de un polvillo o material granulado, o una suspensión en aceite (vegetal o mineral), o emulsiones acuosas o de aceite/agua, o como un polvo humectable, o en combinación con cualquier otro material portador adecuado para aplicación agrícola. Los vehículos agrícolas adecuados pueden ser sólidos o líquidos y son bien conocidos en la técnica. La expresión "vehículo aceptable para

uso en agricultura" abarca todos los adyuvantes, por ejemplo, componentes inertes, dispersantes, tensioactivos, agentes de la pegajosidad y aglutinantes que son comúnmente utilizados en la tecnología de las formulaciones insecticidas; estos son bien conocidos por los expertos en la formulación de insecticidas. Las formulaciones pueden mezclarse con uno o más adyuvantes sólidos o líquidos y pueden prepararse por diversos medios, por ejemplo, por

5

mezclado homogéneo, combinado y/o trituración de la composición insecticida con adyuvantes adecuados utilizando técnicas convencionales de formulación.

Las composiciones inhibitoras de insectos de esta invención son aplicadas al medioambiente del insecto hemíptero, homóptero o heteróptero objetivo, típicamente sobre el follaje de la planta o cultivo que se va a proteger por procedimientos convencionales, preferentemente por pulverización. La concentración y la duración de la aplicación

10

insecticida se ajustará de acuerdo con las condiciones específicas para la o las plagas, cultivos en particular que se van a tratar y condiciones ambientales particulares. La relación proporcional de principio activo a vehículo dependerá naturalmente de la naturaleza química, solubilidad y estabilidad de la composición insecticida, así como también de la formulación en particular contemplada.

Otras técnicas de aplicación, por ejemplo espolvoreo, rociado, remojo, inyección en suelo, revestimiento de la semilla, revestimiento de la plántula, pulverizado, aireación, nebulizado y atomizado, son también factibles y pueden

15

ser requeridos en ciertas circunstancias tales como, por ejemplo, insectos que causan infestación de las raíces o del tallo, o para la aplicación a vegetación delicada o plantas decorativas. Estos procedimientos de aplicación son también bien conocidos por los expertos en la técnica.

La composición inhibitora de insectos de la invención puede emplearse en el procedimiento de la invención de forma única o en combinación con otros compuestos, incluyendo otros pesticidas. El procedimiento de la invención también puede utilizarse en conjunto con otros tratamientos tales como tensioactivos, detergentes, polímeros o formulaciones de liberación en el tiempo. Las composiciones insecticidas de la presente invención pueden ser

20

formuladas para uso tópico o sistémico.

La concentración de agente inhibidor de insectos en la composición inhibitora de insectos la cual se utiliza para la aplicación ambiental, sistémica o foliar varía ampliamente dependiendo de la naturaleza de la formulación en particular, de los medios de aplicación, de las condiciones ambientales y del grado de actividad inhibitora de insectos. Típicamente, el agente inhibidor de insectos en la composición estará presente en la formulación aplicada en una concentración de por lo menos 1 % en peso y puede ser hasta e incluyendo 99 % en peso. Las formulaciones secas de las composiciones pueden ser de 1 % a 99 % o más en peso de la composición, mientras

25

30

que las formulaciones líquidas pueden comprender en general entre 1 % y 99 % o más del principio activo en peso. Las formulaciones las cuales comprenden células bacterianas intactas generalmente contendrán entre 10^4 y 10^{12} células/mg de la composición.

La formulación inhibitora de insectos puede ser administrada a una planta en particular o área objetivo en una o más aplicaciones según lo necesario, con una proporción de aplicación de campo típica por cada 0,01 km² (1 hectárea)

35

XI. Productos de base

También se contempla que pueden obtenerse diversos productos de base con las composiciones y procedimientos de esta invención. Asimismo, se contempla específicamente que una o más ventajas pueden asociarse con los productos de base derivados de esta invención. Se anticipa que el uso de la proteína inhibitora de insectos TIC807 y procedimientos asociados puede proporcionar productos de base con niveles reducidos de residuo de pesticidas. En ciertos casos, los cultivadores deberán utilizar menos cantidad de pesticidas tales como organofosfatos, carbamatos, neonicotinoide, e insecticidas piretroides. La exposición de individuos que cultivan, recolectan, procesan o de algún otro modo tienen contacto con los productos de base de esta invención a estos pesticidas por lo tanto se anticipa que debe reducirse. El uso reducido de pesticidas también se prevé que proporciona costes reducidos de producción

40

45

XII. Procedimientos para Utilizar Proteínas Inhibidoras de Insectos TIC807 en Combinación con Otros Agentes Inhibidores de Insectos

50

Se contemplan diversos procedimientos mediante los cuales se logra una mayor resistencia a una plaga de insectos específica o resistencia más amplia a diversas clases de plagas de insectos. Ambos procedimientos implican poner en contacto la o las plagas de insectos con una proteína TIC807 en combinación con un agente inhibidor de insectos diferente. Este agente inhibidor de insectos diferente puede inhibir las mismas plagas de insectos hemípteros

55

inhibidas por la TIC807 para proporcionar una incidencia reducida de resistencia de insectos hemípteros a la proteína TIC807 u otro agente inhibidor de insectos hemípteros. Como alternativa, el agente inhibidor de insectos diferente puede inhibir un insecto que no es inhibido por TIC807 para expandir el espectro de inhibición de insectos obtenido.

El potencial de que los insectos desarrollen resistencia a ciertos insecticidas está bien documentado. La mayoría de las estrategias de manejo de resistencia a insectos que utilizan cultivos genéticamente modificados que expresan agentes inhibidores de insectos se basan en el uso de áreas de refugio que están comprendidas por plantas de cultivo que carecen del gen inhibidor de insectos. En teoría, el refugio proporciona una región en la cual se mantienen poblaciones de insectos no resistentes que albergan alelos genéticos no resistentes, disminuyendo el potencial de desarrollo de resistencia dentro de la población de insectos. Sin embargo, la estrategia de refugio padece diversas desventajas. En primer lugar, los cultivadores deben aceptar una reducción de la producción en el área plantada con el gen inhibidor de insectos. En segundo lugar, no resulta claro que los refugios controlarán de forma eficaz los alelos de resistencia dominantes que pueden surgir en la población de insectos.

Una estrategia de manejo de la resistencia a insectos alternativa puede emplear cultivos transgénicos que expresan dos agentes inhibidores de insectos distintos que operan a través de diferentes modalidades de acción. En este caso, cualquier insecto con resistencia a cualquiera de los dos agentes inhibidores de insectos será controlado por el otro agente inhibidor de insectos, reduciendo de esa manera las posibilidades de desarrollo de resistencia en la población de insectos.

Adicionalmente, un único cultivo puede estar sujeto a destrucción por diversas clases diferentes de plagas de insectos que operan al mismo tiempo en el campo. Por ejemplo, una planta de algodón puede ser atacada tanto por plagas de Hemípteros, tales como *Lygus*, como por plagas de Lepidópteros tales como *Spodoptera exigua* (gusano de la remolacha azucarera), *Heliothis zea* (gusano del algodón) y/o *Helicoverpa armigera* (gusano cortador) en el transcurso de una estación de crecimiento. La expresión de distintos agentes inhibidores los cuales son activos a cada una de estas plagas proporcionaría mayor protección a la planta de algodón y aumentaría la producción por cada 4047 m² (1 acre) debido a una reducción de pérdida causada por las plagas de insectos.

Un primer grupo de agentes inhibidores de insectos que puede utilizarse en combinación con una proteína TIC807 para el manejo de la resistencia de insectos o espectro inhibidor de insectos expandido comprenden secuencias de ribonucleótidos que funcionan frente a la ingestión por dicha plaga de insecto para inhibir una función biológica dentro de dicha plaga de insecto. Las secuencias nucleotídicas específicas seleccionadas de las secuencias nativas a las células de una plaga en particular que están involucradas en una ruta biológica esencial pueden expresarse en una célula de tal modo que da como resultado la formación de un ARN bicatenario, o incluso un ARN bicatenario estabilizado. Mediante la inhibición del producto génico esencial de la plaga de insectos objetivo con el ribonucleótido, el organismo no puede desarrollarse y eventualmente muere. El uso de dichas secuencias de ribonucleótidos para controlar plagas de insectos tales como *Lygus* es descrito en la Publicación de la Solicitud de Patente de los Estados Unidos N.º 20060021087. Los genes de insectos esenciales que proporcionan una función biológica esencial que incluyen formación de la musculatura, formación de la hormona juvenil, regulación de la hormona juvenil, regulación y transporte de iones, síntesis de enzimas digestivas, mantenimiento del potencial de la membrana celular, biosíntesis de aminoácidos, degradación de aminoácidos, formación de espermatozoides, síntesis de feromonas, detección de feromonas, formación de antenas, formación de alas, formación de patas, desarrollo y diferenciación, formación de huevos, maduración de larvas, formación de enzimas digestivas, síntesis de hemolinfas, mantenimiento de hemolinfas, neurotransmisión, división celular, metabolismo de energía, respiración y apoptosis son apuntados para la inhibición. Los genes de insectos que pueden ser inhibidos incluyen genes que codifican una proteína V-ATPasa, una proteína ubiquitina, una proteína poligalacturonasa, una proteína pectinasa, una proteína transportadora del neurotransmisor GABA, una proteína EFl alfa, una proteína monooxigenasa del citocromo P-450, una proteína precursora de la proteína de cutícula, una proteína CHD3, y una proteína del proteasoma 20S. El agente de control de insectos basado en ribonucleótidos también puede comprender secuencias dirigidas contra múltiples genes objetivo de insecto. Para un control de *Lygus*, los ribonucleótidos inhibidores dirigidos contra SEQ ID NO: 24 a SEQ ID NO: 39 o combinaciones de ribonucleótidos inhibidores dirigidos contra SEQ ID NO: 24 a SEQ ID NO: 39 son contemplados específicamente. El uso de SEQ ID NO: 24 a SEQ ID NO: 39 en el control de insectos es desvelado en la Publicación de la Solicitud de Patente de los Estados Unidos N.º 20060021087. Cuando múltiples genes de insecto son buscados para supresión, puede fabricarse un elemento de ADN policistrónico según lo ilustrado y desvelado en Fillatti, Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos N.º 2004-0029283 A1.

Puede utilizarse una diversidad de procedimientos para producir ribonucleótidos inhibidores dirigidos contra una plaga objetivo en una planta transgénica. En general, el ARN_{bc} inhibidor y la porción del gen objetivo de insecto comparten por lo menos desde 80 % de identidad de secuencia, o de 90 % de identidad de secuencia, o de 95 % de identidad de secuencia, o desde aproximadamente 99 % de identidad de secuencia, o incluso aproximadamente 100 % de identidad de secuencia. Como alternativa, la región dúplex del ARN puede definirse funcionalmente como una secuencia nucleotídica que es capaz de hibridarse con una porción del transcrito génico objetivo. Una secuencia menor a longitud completa que exhibe una homología mayor compensa por una secuencia menos homóloga más larga. La longitud de las secuencias nucleotídicas idénticas puede ser al menos 25, 50, 100, 200, 300, 400, 500 o 1000 bases. Normalmente, una secuencia de más de 20-100 nucleótidos debería utilizarse, si bien se preferiría una secuencia de más de aproximadamente 200-300 nucleótidos, y una secuencia de más de 500-1000 nucleótidos sería especialmente preferida dependiendo del tamaño del gen objetivo.

En otra realización, puede producirse el ribonucleótido inhibidor de insectos mediante una repetición invertida separada por una "secuencia espaciadora". La secuencia espaciadora puede ser una región que comprende

cualquier secuencia de nucleótidos que facilita la formación de estructuras secundarias entre cada repetición, donde esto se requiere. La secuencia espaciadora puede ser parte de la secuencia codificadora sentido o antisentido para ARNm. La secuencia espaciadora puede comprender, como alternativa, cualquier combinación de nucleótidos o sus homólogos que son capaces de ligarse covalentemente a una molécula de ácido nucleico. La secuencia espaciadora puede comprender una secuencia de nucleótidos de por lo menos 10-100 nucleótidos de longitud, o como alternativa por lo menos 100-200 nucleótidos de longitud, por lo menos aproximadamente 200-400 nucleótidos de longitud, o por lo menos aproximadamente 400-500 nucleótidos de longitud.

Una secuencia transgénica para producir un ARNbc puede comprender un promotor que está ligado operativamente a una secuencia codificadora de intrón y un ARN de horquilla derivado de una secuencia en el gen objetivo (Miki y Shimamoto, *Plant Cell Physiol.* Abril 2004; 45(4):490-495). Como alternativa, una secuencia transgénica para producir un ARNip puede comprender un promotor pol III de ARN ligado operativamente a un ARN de horquilla (Lu y col., *Nucleic Acids Res.* 2 de Dic. 2004; 32(21):e171). El ARN de horquilla puede comprender una secuencia en 5' de aproximadamente 19-24 nucleótidos de secuencia génica objetivo de hebra con sentido seguida por un nucleótido espaciador de 8-10 nucleótidos seguido por una secuencia de aproximadamente 19-24 nucleótidos de secuencia antisentido que es capaz de formar pares de bases con la secuencia de hebra con sentido precedente. Sin embargo, también pueden utilizarse transgenes de planta que expresan ARN de horquilla que contienen brazos con sentido/antisentido que oscilan entre 98 y 853 nucleótidos (Wesley y col., *Plant J.* 2001, 27(6):581-90). Los vectores y procedimientos para la expresión mediada por transgenes de ARN de horquilla son desvelados en las Solicitudes de Patente de los Estados Unidos N.º 20050164394, 20050160490 y 20040231016.

Un primer grupo de agentes inhibidores de insectos que puede utilizarse en combinación con una proteína TIC807 para el manejo de resistencia de insectos o espectro inhibidor de insectos expandido comprenden proteínas inhibidoras de insectos que no son TIC807. Puede utilizarse una amplia diversidad de proteínas inhibidoras de insectos derivadas de *B. thuringiensis*, *Photorhabdus* sp. y/o *Xenorhabdus* sp.

Para el control de insectos perforadores chupadores tales como *Lygus*, pueden combinarse diversas proteínas inhibidoras de insectos no TIC807 con la expresión de TIC807 en planta para un mayor control y/o manejo de resistencia. Dichas moléculas expresadas en planta junto con TIC807 pueden incluir ET29, ET37, TIC809, TIC810, TIC812, TIC127, TIC128 (PCT US 2006/033867), AXMI-027, AXMI-036 y AXMI-038 (WO 06/107761), AXMI-018, AXMI-020 y AXMI-021 (WO 06/083891), AXMI-010 (WO 05/038032), AXMI-003 (WO 05/021585), AXMI-008 (US 2004/0250311), AXMI-006 (US 2004/0216186), AXMI-007 (US 2004/0210965), AXMI-009 (US 2004/0210964), AXMI-014 (US 2004/0197917), AXMI-004 (US 2004/0197916), AXMI-028 y AXMI-029 (WO 06/119457) y AXMI-007, AXMI-008, AXMI-0080f2, AXMI-009, AXMI-014 y AXMI-004 (WO 04/074462). La presentación de la combinación de las moléculas de proteínas inhibidoras, TIC809 (presentada como SEQ ID NO: 10) y TIC810 (presentada como SEQ ID NO: 12) se ha mostrado previamente como inhibidora de la chinche opaca de las plantas (WTPB), chinche *Lygus hesperus* en bioensayo (PCT US 2006/033867). Las proteínas de fusión de TIC809 y TIC810, TIC127 (presentada como SEQ ID NO: 14) y TIC128 (presentada como SEQ ID NO: 16) también pueden ser activas contra *Lygus*. El polinucleótido que codifica TIC127 está compuesto por la molécula de ácido nucleico que codifica TIC809 ligada a la molécula de ácido nucleico que codifica TIC810 mediante una secuencia de nucleótidos de polienlazador (presentada como SEQ ID NO: 17) que codifica el enlazador de aminoácidos presentado como SEQ ID NO: 18. El polinucleótido que codifica TIC128 está compuesto por la molécula de ácido nucleico que codifica TIC810 ligada a la molécula de ácido nucleico que codifica TIC809 mediante una secuencia nucleotídica de polienlazador (presentada como SEQ ID NO: 17) que codifica el enlazador de aminoácidos presentado como SEQ ID NO: 18. La expresión de TIC807 en combinación con TIC127 o TIC128 puede proporcionar un mayor control de *Lygus*. Las plantas dicotiledóneas tales como el algodón podrían transformarse con construcciones de expresión de planta que contienen secuencias nucleotídicas optimizadas para dicotiledóneas que codifican TIC807 (presentada como SEQ ID NO: 6) junto con TIC809 (presentada como SEQ ID NO: 9) y TIC810 (presentada como SEQ ID NO: 11), o TIC127 (presentada como SEQ ID NO: 13), o TIC128 (presentada como SEQ ID NO: 15) para proporcionar mayor resistencia a *Lygus* o inhibición de especies adicionales contenidas dentro del género, *Lygus*.

Para un control de plagas de Lepidópteros, se contemplan específicamente combinaciones de proteínas TIC807 con proteínas activas contra Lepidópteros tales como proteínas Cry1A (Patente de los Estados Unidos N.º 5.880.275), Cry1B (Solicitud de Patente de los Estados Unidos N.º 10/525.318), Cry1C (Patente de los Estados Unidos N.º 6.033.874), Cry1F, quimeras Cry1A/F (Patentes de los Estados Unidos N.º 7.070.982; 6.962.705; y 6.713.063), y una proteína Cry2Ab (Patente de los Estados Unidos N.º 7.064.249).

Secuencias de ADN que codifican moléculas de proteína TIC807 y otros agentes inhibidores de insecto tales como moléculas de ARN bicatenario y/o proteínas no TIC807 pueden combinarse en una planta única ya sea a través de transformación directa, por cría, o una combinación de los mismos. Pueden introducirse múltiples unidades de transcripción que comprenden un promotor y una región que codifica un agente inhibidor de insectos en el mismo vector de transformación de planta o en diferentes vectores de transformación de planta. Cuando los dos agentes inhibidores de insectos son proteínas, las regiones codificadoras para cada uno pueden separarse mediante un enlazador sensible a proteasa o incluso un sitio de escisión de proteasa de auto-procesamiento (véase Patente de los Estados Unidos N.º 5.846.767). Cuando los agentes inhibidores de insectos son introducidos de forma individual en plantas transgénicas distintas, aquellas plantas pueden cruzarse para obtener una planta que contiene la totalidad de los transgenes que codifican agentes inhibidores de insectos.

Se anticipa además que la combinación de moléculas de proteína TIC807 y otros agentes inhibidores de insectos tales como moléculas de ARN bicatenario y/o proteínas no TIC807 puede dar como resultado efectos inhibidores de insectos sinérgicos no esperados que no son observados con la proteína insecticida TIC807 sola, el ribonucleótido inhibidor de insectos solo, o la proteína inhibidora de insectos no TIC807 sola. Los efectos sinérgicos incluyen: i) cambios cuantitativos en CL₅₀, CE₅₀, CI₅₀, porcentaje de mortalidad, o porcentaje de valores de atrofia y ii) cambios cualitativos en el espectro de inhibición de insectos (es decir, inhibición de insectos Hemípteros, Homópteros y Lepidópteros) que no refleja la simple combinación del espectro exhibido por cada uno de los agentes inhibidores de insectos por sí solo (es decir, la combinación de la inhibición de insectos Hemípteros proporcionada por un agente y la inhibición de insectos Lepidópteros proporcionada por otro agente). Un ejemplo de un efecto sinérgico cuantitativo es una disminución de cualquier valor CL₅₀, CE₅₀ y/o CI₅₀ o un aumento en el porcentaje de mortalidad, o porcentaje de valores de atrofia observado en una combinación que es más que aditiva. Un ejemplo de un efecto sinérgico cualitativo es el control de una plaga de insectos con la combinación de agentes de insectos que no se observa con cualquiera de los miembros por sí solo. En este caso, la nueva plaga de insectos controlada por la combinación puede ser una plaga de insectos dentro de un orden de insectos (es decir, Hemípteros) donde los agentes inhibidores de insectos solamente inhiben otras plagas de insectos dentro de ese orden de insectos cuando se utilizan por sí solos.

XIII. Proteínas TIC807 Aisladas y Equivalentes Biológicos

Las proteínas TIC807 aisladas también son proporcionadas en el presente documento. En una realización, las proteínas TIC807 comprenden proteínas que tienen por lo menos 70 % de identidad de secuencias con SEQ ID NO: 5 y exhiben actividad inhibidora de insectos. Los péptidos, polipéptidos y proteínas biológicamente funcionales equivalentes contemplados en el presente documento debería poseer 70 % o más de identidad de secuencia, preferentemente 85 % o más de identidad de secuencia, y más preferentemente 90 % a 95 % o más de identidad de secuencia, con la secuencia de, o porción correspondiente en, la secuencia polipeptídica de TIC807. En ciertas realizaciones de la invención, los péptidos, polipéptidos y proteínas biológicamente funcionales equivalentes que poseen 80 % o más de identidad de secuencia, preferentemente 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 % o más de identidad de secuencias, y más preferentemente 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de identidad de secuencias, con la secuencia de TIC807 (SEQ ID NO: 5)

Los péptidos, polipéptidos y proteínas biológica y funcionalmente equivalentes a TIC807 incluyen secuencias de aminoácidos que contienen sustituciones de aminoácidos conservadoras en las secuencias de proteína TIC807. Un ejemplo de proteínas TIC807 que pueden sustituirse para obtener equivalentes biológicos incluyen la secuencia de proteína TIC807 (SEQ ID NO: 5). En dichas secuencias de aminoácidos, uno o más aminoácidos en la secuencia es (son) sustituido con otro aminoácido(s), cuya carga y polaridad es similar a la del aminoácido natural, es decir, una sustitución de aminoácidos conservadores, dando como resultado un cambio silencioso.

Los sustitutos para un aminoácido dentro de la secuencia polipeptídica de TIC807 pueden seleccionarse entre otros miembros de la clase a la cual pertenece el aminoácido natural. Los aminoácidos pueden ser divididos en los siguientes cuatro grupos: (1) aminoácidos ácidos; (2) aminoácidos básicos; (3) aminoácidos polares neutros; y (4) aminoácidos no polares neutros. Los aminoácidos representativos dentro de estos diversos grupos incluyen: (1) aminoácidos ácidos (cargados negativamente) tales como el ácido aspártico y el ácido glutámico; (2) aminoácidos básicos (cargados positivamente) tales como arginina, histidina y lisina; (3) aminoácidos polares neutros tales como glicina, serina, treonina, cisteína, cistina, tirosina, asparagina y glutamina; (4) aminoácidos no polares neutros (hidrófobos) tales como alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptófano y metionina.

Los cambios de aminoácidos conservadores dentro de la secuencia polipeptídica de TIC807 pueden realizarse sustituyendo un aminoácido dentro de uno de estos grupos con otro aminoácido dentro del mismo grupo. Los equivalentes biológicamente funcionales de TIC807 pueden tener 10 o menos cambios de aminoácidos conservadores, más preferentemente siete o menos cambios de aminoácidos conservadores, y más preferentemente cinco o menos cambios de aminoácidos conservadores. La secuencia nucleotídica codificadora (gen, ADN plasmídico, ADNc o ADN sintético) tendrá por lo tanto sustituciones de bases correspondientes, permitiéndole codificar formas equivalentes biológicamente funcionales de TIC807.

Según lo indicado, pueden realizarse cambios y modificaciones en la estructura de los péptidos de la presente invención y segmentos de ADN los cuales codifican los mismos y aun obtener una molécula funcional que codifica una proteína o péptido con características deseables. Lo que sigue es un análisis basado en el cambio de los aminoácidos de una proteína para crear un equivalente, o incluso una molécula de segunda generación mejorada. En realizaciones particulares de la invención, las proteínas TIC807 mutadas son contempladas como útiles para aumentar la actividad inhibidora de insectos de la proteína, y por consiguiente, aumentar la actividad inhibidora de insectos y/o la expresión del transgén recombinante en una célula vegetal. Los cambios de aminoácidos pueden lograrse cambiando los codones de la secuencia de ADN, de acuerdo con los codones proporcionados en la Tabla 1.

TABLA 1

Aminoácidos	Códigos de Aminoácidos	Codones
Alanina	Ala (A)	GCA GCC GCG GCU
Cisteína	Cys (C)	UGC UGU
Ácido Aspártico	Asp (D)	GAC GAU
Ácido glutámico	Glu (E)	GAA GAG
Fenilalanina	Phe (F)	UUC UUU
Glicina	Gly (G)	GGA GGC GGG GGU
Histidina	His (H)	CAC CAU
Isoleucina	Ile (I)	AUA AUC AUU
Lisina	Lys (K)	AAA AAG
Leucina	Leu (L)	UUA UUG CUA CUC CUG CUU
Metionina	Met (M)	AUG
Asparagina	Asn (N)	AAC AAU
Prolina	Pro (P)	CCA CCC CCG CCU
Glutamina	Gln (Q)	CAA CAG
Arginina	Arg (R)	AGA AGG CGA CGC CGG CGU
Serina	Ser (S)	AGC AGU UCA UCC UCG UCU
Treonina	Thr (T)	ACA ACC ACG ACU
Valina	Val (V)	GUA GUC GUG GUU
Triptófano	Trp (W)	UGG
Tirosina	Tyr (Y)	UAC UAU

Por ejemplo, ciertos aminoácidos pueden ser sustituidos por otros aminoácidos en una estructura proteica sin pérdida apreciable de actividad bioquímica o biológica. Puesto que es la capacidad interactiva y la naturaleza de una proteína lo que define la actividad funcional biológica de esa proteína, pueden realizarse ciertas sustituciones de secuencias de aminoácidos en una secuencia proteica y, naturalmente, su secuencia codificadora de ADN subyacente, y no obstante obtener una proteína con propiedades similares. Por lo tanto, los inventores contemplan que pueden efectuarse diversos cambios en las secuencias peptídicas de las composiciones desveladas, o en las secuencias de ADN correspondientes que codifican dichos péptidos sin pérdida apreciable de su utilidad o actividad biológica.

En la realización de tales cambios, puede considerarse el índice hidropático de los aminoácidos. La importancia del índice hidropático de los aminoácidos para conferir una función biológica interactiva sobre una proteína es generalmente entendida en la técnica (Kyte y Doolittle, J Mol Biol. 157(1):105-32, 1982). Se acepta que el carácter hidropático relativo del aminoácido contribuye a la estructura secundaria de la proteína resultante, lo cual a su vez define la interacción de la proteína con otras moléculas, por ejemplo, enzimas, sustratos, receptores, ADN, anticuerpos y antígenos.

Cada aminoácido ha sido asignado un índice hidropático sobre la base de sus características de hidrofobicidad y carga (Kyte y Doolittle, Ibid). Estos son: isoleucina (+4,5); valina (+4,2); leucina (+3,8); fenilalanina (+2,8); cisteína/cistina (+2,5); metionina (+1,9); alanina (+1,8); glicina (-0,4); treonina (-0,7); serina (-0,8); triptófano (-0,9); tirosina (-1,3); prolina (-1,6); histidina (-3,2); glutamato (-3,5); glutamina (-3,5); aspartato (-3,5); asparagina (-3,5); lisina (-3,9); y arginina (-4,5).

Se sabe en la técnica que ciertos aminoácidos pueden ser sustituidos por otros aminoácidos que tienen un índice o puntuación hidropático similar y aun dar como resultado una proteína con actividad biológica similar, es decir, aun

obtener una proteína funcionalmente equivalente biológica. En la realización de dichos cambios, se prefiere la sustitución de aminoácidos cuyos índices hidropáticos están dentro de ± 2 , se prefieren particularmente aquellos que están dentro de ± 1 y se prefieren incluso más particularmente aquellos dentro de $\pm 0,5$.

- 5 También se entiende en la técnica que la sustitución de aminoácidos similares puede efectuarse de forma eficaz sobre la base de la hidrofiliidad. La Patente de los Estados Unidos N.º 4.554.101, establece que la hidrofiliidad promedio local mayor de una proteína, según lo gobernado por la hidrofiliidad de sus aminoácidos adyacentes, se correlaciona con una propiedad biológica de la proteína.

- 10 Según lo detallado en la Patente de los Estados Unidos N.º 4.554.101, se han asignado los siguientes valores de hidrofiliidad a los restos de aminoácidos: arginina (+3,0); lisina (+3,0); aspartato (+3,0 + 0,1); glutamato (+3,0 + 0,1); serina (+0,3); asparagina (+0,2); glutamina (+0,2); glicina (0); treonina (-0,4); prolina (-0,5 + 0,1); alanina (-0,5); histidina (-0,5); cisteína (-1,0); metionina (-1,3); valina (-1,5); leucina (-1,8); isoleucina (-1,8); tirosina (-2,3); fenilalanina (-2,5); triptófano (-3,4).

Sustituciones no conservadoras en los polipéptidos TIC807

- 15 Se reconoce adicionalmente que pueden efectuarse sustituciones no conservadoras en secuencias de polipéptidos TIC807 para obtener polipéptidos TIC807 que son los equivalentes biológicos funcionales de los polipéptidos TIC807 desvelados en el presente documento. En estos casos, las sustituciones no conservadoras pueden simplemente ensayarse para determinar la inhibición del crecimiento fúngico para identificar sustituciones no conservadoras que proporcionan equivalentes biológicos funcionales de un polipéptido TIC807 determinado.

Fragmentos y Variantes de TIC807

- 20 El polipéptido inhibidor de insectos de la presente invención comprende preferentemente una secuencia proteica TIC807 (SEQ ID NO: 5), y variantes de esta secuencia que tienen al menos 70 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 5 y que poseen la misma o similar actividad inhibidora de insectos que la de esta proteína TIC807 en particular son también abarcados por la presente invención. Estas variantes con actividad inhibidora de insectos que son anticipadas por esta invención también pueden comprender sustituciones, deleciones, inserciones o adiciones de aminoácidos de la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 5.

Las variantes de TIC807 incluyen formas donde uno o más aminoácidos se han insertado en la secuencia natural. Estas variantes también pueden ser de origen natural o mutantes sintéticos de TIC807, y retienen la actividad inhibidora de insectos de TIC807.

- 30 Las combinaciones de lo que antecede, es decir, las formas del polipéptido inhibidor de insectos que contienen tanto deleciones como adiciones de aminoácidos, son también abarcadas por la presente invención. También pueden estar presentes allí sustituciones de aminoácidos.

Las variantes de TIC807 abarcadas por la presente invención deberían preferentemente poseer 70-75 % o más de identidad de secuencias, más preferentemente 80 %, 85 %, 88 % o más de identidad de secuencias, y con máxima preferencia 90 % a 95 % o más de identidad de secuencias de aminoácidos, con SEQ ID NO: 5.

- 35 Uso de Relaciones de Función Estructura para Diseñar Variantes de TIC807 Inhibidoras de Insectos

- Esta invención también contempla el uso de relaciones de estructura función para diseñar variantes adicionales de la proteína TIC807 inhibidora de insectos. En primer lugar, se contempla que podría obtenerse una estructura mediante análisis cristalográfico de cristales de TIC807. Se anticipa que dichas estructuras revelan dominios de la proteína TIC807 involucrada en la unión del receptor de insectos, formación de poros en el intestino del insecto, multimerización con TIC807, sensibilidad a proteasa y/o resistencia a proteasa que contribuye a la actividad inhibidora de insectos de TIC807.

- Se anticipa además que las comparaciones entre TIC807 y otras proteínas relacionadas pueden permitir la extrapolación de dominios proteicos que contribuyen con la actividad insecticida de proteínas TIC807. Con respecto a esto, se señala que TIC807 tiene cierta similitud con una familia de proteínas del tipo MTX. Esta familia de proteínas del tipo Mtx toma su nombre de las proteínas Mtx2 de *Bacillus sphericus* (Thanabalu y Porter, Gene. 170(1):85, 1996; N° de Acceso del NCBI 2211294A) y Mtx3 (Liu y col., Appl Environ Microbiol. 62(6):2174, 1996; N° de Acceso del NCBI AAB36661) e incluye Cry15Aa (SEQ ID NO: 41), Cry33Aa (N° de Acceso del NCBI AAL26871), Cry23Aa (N° de Acceso del NCBI AAF76375), Cry38Aa (N° de Acceso del NCBI AAK64559), CryC35 (N° de Acceso del NCBI CAA63374), la proteína de 40 kDa (N° de Acceso del NCBI AAA22332) y CryNT32 (N° de Acceso del NCBI AAL26870). Se cree además que TIC807 está distantemente relacionada con la familia aerolisina de proteínas que incluyen cryET33 (WO 97/17600) y TIC901 (Solicitud de Patente de los Estados Unidos N.º 20060191034). Las aerolisinas son un grupo de proteínas que multimerizan y forman poros en membranas y son toxinas conocidas (Parker y col., Mol. Microbiol. 19(2):205, 1996). En particular, las determinaciones de la estructura cristalográfica indican que los dominios de lámina beta de aerolisinas están involucrados en la formación de poros de membrana (Rossjohn y col., J Struct Biol. 121(2):92, 1998). Los dominios de proteínas TIC807 podrían cambiarse con dominios similares de otra familia de proteínas del tipo MTX o Aerolisinas para identificar dominios involucrados en la unión al

receptor de insectos, formación de poros en el intestino del insecto, multimerización con TIC807, sensibilidad a proteasa y/o resistencia a proteasa que contribuyen a la actividad inhibidora de insectos de TIC807. Los datos de los experimentos de intercambio de dominios pueden compararse y de algún otro modo extrapolarse a datos estructurales de miembros de la familia de proteínas del tipo Mtx para dilucidar dominios que proporcionan diferentes actividades insecticidas, mejores actividades insecticidas, características de unión mejoradas, capacidades de formación de poros mejoradas.

Habiendo identificado ciertos dominios de proteínas de las proteínas TIC807 que proporcionan propiedades inhibidoras de insectos de la proteína TIC807 (es decir, unión a receptores de insectos, formación de poros en el intestino del insecto, multimerización con TIC807, sensibilidad a proteasa y/o resistencia a proteasa), se anticipa además que estas regiones pueden ser más extensamente mutagenizadas. Una vez mutagenizadas, las proteínas TIC807 variantes pueden ser sometidas a ensayos bioquímicos (es decir, unión a receptores de insectos, formación de poros en el intestino del insecto, multimerización con TIC807, sensibilidad a proteasa y/o resistencia a proteasa) o biológicos (es decir, ensayos de inhibición de insectos) para identificar aquellas variantes que confieren actividades bioquímicas y/o inhibidoras de insectos mejoradas. También se contemplan rondas iterativas adicionales de mutagénesis y ensayo de aquellas variantes identificadas. Diversos procedimientos para la evolución molecular de proteínas aisladas que son conocidas por los expertos en la técnica (Stemmer, W., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 10747, 1994; Yuan y col., Microbiol. Mol. Biol. Rev. 69(3):373, 2005) o son proporcionados por otros procedimientos totalmente distintos pueden emplearse para generar las variantes de la proteína TIC807.

Proteínas TIC807 aisladas de por lo menos 9 aminoácidos

En otras realizaciones de esta invención, se usan proteínas aisladas que comprenden una secuencia polipeptídica de por lo menos 9 aminoácidos de longitud que está contenida en SEQ ID NO: 5. Se contemplan por lo menos dos usos distintos para secuencias peptídicas TIC807 de por lo menos 9 aminoácidos.

En primer lugar, se contempla que las secuencias peptídicas TIC807 de por lo menos 9 aminoácidos pueden ser sustituidas en secuencias proteicas distintas para conferir todas o un subconjunto de las actividades inhibidoras de insectos de una proteína TIC807 en la proteína sustituida del péptido TIC807 resultante. Las actividades inhibidoras de insectos conferidas por las secuencias peptídicas TIC807 pueden comprender la inhibición de una plaga de hemípteros incluyendo *Lygus*. Sin desear estar limitados por teoría alguna, se cree que las secuencias peptídicas TIC807 de por lo menos 9 aminoácidos pueden proporcionar: 1) formación de cristales mejorada, 2) estabilidad proteica mejorada o degradación de proteasa reducida, 3) reconocimiento y unión del receptor de membrana de insecto mejorada, 4) oligomerización mejorada o formación de canales en el endotelio del intestino medio del insecto, y 5) actividad insecticida mejorada o especificidad insecticida debido a cualquiera o la totalidad de las razones manifestadas anteriormente cuando se insertan en otra proteína. Secuencias peptídicas TIC807 más grandes de por lo menos 12, por lo menos 16, por lo menos 32, por lo menos 50 o por lo menos 100 restos de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 también pueden ser sustituidas en secuencias proteicas distintas para obtener proteínas sustituidas por péptido TIC807 inhibidoras de insecto.

La proteína sustituida con péptido TIC807 puede sintetizarse mediante técnicas que incluyen mutagénesis específica del sitio (Kunkel, T. A. y col. Meth. Enzymol. 154: 367, 1987), barajado de ADN (Stemmer, W., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 10747, 1994), extensión por solapamiento de PCRTM (Horton y col., Gene 77: 61, 1989), cualquiera de los procedimientos de evolución molecular de proteínas (Yuan y col., Microbiol. Mol. Biol. Rev. 69(3):373, 2005), síntesis directa, combinaciones de estos procedimientos, o mediante otros procedimientos totalmente distintos que proporcionan proteínas sustituidas con péptido TIC807. En particular, se contemplan proteínas sustituidas con TIC807 derivadas por inserción o sustitución de secuencias peptídicas TIC807 de por lo menos 9 aminoácidos en proteínas inhibidoras de insectos derivadas de *Bacillus thuringiensis*. Ejemplos de proteínas de *Bacillus thuringiensis* que pueden sustituirse con polipéptidos TIC807 para obtener proteínas sustituidas con TIC807 con actividad inhibidora de insectos incluyen Cry15Aa1 (Brown y Whiteley, 1992, J Bacteriol 174 549-557; SEQ ID NO: 41), CryET29 (Patente de los Estados Unidos N.º 6.093.695), Cyt1Ba1 (Patente de los Estados Unidos N.º 5.723.440), toxinas Cyt de *Bacillus thuringiensis* israelensis (Patente de los Estados Unidos N.º 5.885.963), y proteínas cristalinas de *Bacillus thuringiensis* activas contra *Lygus* distintas AXMI-027, AXMI-036 y AXMI-038 desveladas en la Publicación de la Solicitud de Patente de los Estados Unidos N.º 20060242732. Otras proteínas que pueden ser sustituidas con polipéptidos TIC807 para obtener proteínas sustituidas con TIC807 con actividad inhibidora de insectos incluyen la Mtx2 (Thanabalu y Porter, Gene. 170(1):85, 1996; N.º de Acceso del NCBI 2211294A), Mtx3 (Liu y col., Appl Environ Microbiol. 62(6):2174, 1996; N.º de Acceso del NCBI AAB36661), Cry15Aa (SEQ ID NO:41), Cry33Aa (N.º de Acceso del NCBI AAL26871), Cry23Aa (N.º de Acceso del NCBI AAF76375), Cry38Aa (N.º de Acceso del NCBI AAK64559), CryC35 (N.º de Acceso del NCBI CAA63374), la proteína de 40 kDa (N.º de Acceso del NCBI AAA22332), CryNT32 (N.º de Acceso del NCBI AAL26870), cryET33 (WO 97/17600) y TIC901 (N.º de Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos 20060191034).

También se contempla que proteínas TIC807 aisladas de entre aproximadamente 250 y aproximadamente 309 aminoácidos también pueden utilizarse para la producción de anticuerpos o inhibición de insectos. Estas secuencias de polipéptidos TIC807 aislados tienen por lo menos 70 %, por lo menos 90 %, por lo menos 95 % o 100 % de identidad de secuencias con una secuencia polipeptídica correspondiente contenida en SEQ ID NO: 5. Estas proteínas TIC807 pueden comprender además un reactivo indicador covalentemente ligado, un espaciador de

aminoácidos, un enlazador de aminoácidos, una secuencia de señal, una secuencia de péptidos de tránsito al cloroplasto, una secuencia de direccionamiento vacuolar o una secuencia de detención de transferencia.

También se contempla que secuencias de péptido TIC807 aisladas de por lo menos 9 aminoácidos contiguos de SEQ ID NO: 5 pueden utilizarse como inmunógenos o epítomos para preparar anticuerpos que reconocen proteínas TIC807. Dichos anticuerpos son útiles para detectar proteínas TIC807 en plantas transgénicas, en productos de base derivados de plantas transgénicas, en microorganismos o en bibliotecas de expresión de ADN recombinante que contienen secuencias de TIC807 clonadas. Los polipéptidos TIC807 pueden tener una longitud de por lo menos 9, por lo menos 12, por lo menos 16 o por lo menos 32 aminoácidos. Cuando la secuencia de péptido TIC807 tiene una longitud de por lo menos 32 aminoácidos, la misma tiene por lo menos aproximadamente 80 %, 90 % o 95 % identidad de secuencia con una secuencia polipeptídica correspondiente contenida en SEQ ID NO: 5. Los péptidos pueden ser ligados a una proteína portadora tal como KLH o albúmina para facilitar la producción de anticuerpos.

La identificación de epítomos inmunodominantes de proteína TIC807, y/o sus equivalentes funcionales, adecuados para utilizar en vacunas es una cuestión relativamente sencilla. Por ejemplo, se pueden emplear los procedimientos de Hopp, según lo descrito en la Patente de los Estados Unidos N.º 4.554.101, la cual describe la identificación y preparación de epítomos a partir de secuencias de aminoácidos sobre la base de la hidrofiliidad. Los procedimientos descritos en diversos otros documentos, y programas informáticos que se basan en los mismos, también pueden utilizarse para identificar secuencias núcleo epitópicas (véase, por ejemplo, Patente de los Estados Unidos N.º 4.554.101). La secuencia de aminoácidos de estas "secuencias núcleo epitópicas" puede después incorporarse fácilmente en péptidos, ya sea a través de la aplicación de síntesis peptídica o tecnología de ADN recombinante.

Los péptidos TIC807 preferidos para utilizar de acuerdo con la presente invención generalmente estarán en el orden de 9 a 20 aminoácidos de longitud, y más preferentemente 9 a 15 aminoácidos de longitud. Se propone que péptidos derivados de proteína TIC807 antigénicos más cortos proporcionarán ventajas en ciertas circunstancias, por ejemplo, en la preparación de ensayos de detección inmunológica. Los ejemplos de ventajas incluyen la facilidad de preparación y purificación, el coste relativamente bajo y capacidad de reproducción mejorada de reproducción, y biodistribución ventajosa.

Se propone que pueden lograrse ventajas particulares de la presente invención a través de la preparación de péptidos sintéticos los cuales incluyen secuencias núcleo epitópicas/inmunógenas modificadas y/o extendidas las cuales dan como resultado un péptido epitópico "universal" dirigido a proteínas TIC807, y en particular a secuencias relacionadas con TIC807. Estas secuencias núcleo epitópicas son identificadas en esta invención en aspectos particulares como regiones hidrófilas del antígeno polipeptídico particular. Se propone que estas regiones representan aquellas que tienen más probabilidades de promover la estimulación de células T o células B, y, por lo tanto, activar la producción de anticuerpos específicos.

Una secuencia núcleo epitópica, como se utiliza en el presente documento, es un tramo relativamente corto de aminoácidos que es "complementario" a, y por lo menos se unirá con, sitios de unión al antígeno en los anticuerpos dirigidos a la proteína TIC807 desvelados en el presente documento. Adicionalmente o como alternativa, una secuencia núcleo epitópica es aquella que activará anticuerpos que son reactivos de forma cruzada con anticuerpos dirigidos contra las composiciones peptídicas desveladas en el presente documento. Por lo tanto, ciertas secuencias núcleo epitópicas de la presente invención pueden definirse operativamente en términos de su capacidad de competir con o tal vez desplazar la unión del antígeno de proteína deseado con los antisueros dirigidos contra la proteína correspondientes.

En general, no se cree que el tamaño del antígeno de polipéptido sea particularmente importante, siempre que sea por lo menos suficientemente grande para transportar la secuencia o secuencias núcleo identificadas. La secuencia núcleo útil más pequeña anticipada por la presente divulgación generalmente sería del orden de aproximadamente 9 aminoácidos de longitud, siendo más preferidas secuencias en el orden de 10 a 20. Por lo tanto, este tamaño generalmente corresponderá a los antígenos peptídicos más pequeños preparados. Sin embargo, el tamaño del antígeno puede ser más grande cuando se desee, siempre que contenga una secuencia núcleo epitópica básica.

XIV. Composiciones de Anticuerpos contra TIC807 y Procedimientos para Preparar Anticuerpos

En realizaciones particulares, los inventores contemplan el uso de anticuerpos, ya sea monoclonales o policlonales los cuales se unen a las proteínas TIC807 descritas en el presente documento. Los medios para preparar y caracterizar anticuerpos son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1999). Los procedimientos para generar anticuerpos monoclonales (mAb) generalmente comienzan a lo largo de las mismas líneas que aquellos para preparar anticuerpos policlonales. Resumiendo, un anticuerpo policlonal se prepara inmunizando un animal con una composición inmunógena y recolectando antisueros de ese animal inmunizado. Puede utilizarse un amplio rango de especies animales para la producción de antisueros. Típicamente, el animal utilizado para la producción de antisueros es un conejo, un ratón, una rata, un hámster, una cobaya o una cabra. Debido al volumen de sangre relativamente grande de los conejos, un conejo es una elección preferida para la producción de anticuerpos policlonales.

Como es bien conocido en la técnica, una composición determinada puede variar en su inmunogenicidad. Por lo tanto, a menudo es necesario reforzar el sistema inmunológico del huésped, como puede lograrse por el acoplamiento de un inmunógeno peptídico o proteico a un vehículo. Los vehículos ejemplares y preferidos son hemocianina de Lapa Californiana (KLH) y albúmina sérica bovina (BSA). Otras albúminas tales como ovoalbúmina, albúmina sérica de ratón o albúmina sérica de conejo también pueden utilizarse como vehículos. Los medios para conjugar un péptido, polipéptido o proteína a una proteína vehículo son bien conocidos en la técnica e incluyen el uso de glutaraldehído, éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida, carbodiimida y bencidina bis-biazotizada.

Como es también bien sabido en la técnica, la inmunogenicidad de una composición inmunógena particular puede aumentarse mediante el uso de estimuladores no específicos de la respuesta inmune, conocidos como adyuvantes. Los ejemplos de adyuvantes preferidos incluyen adyuvante completo de Freund (un estimulador no específico de la respuesta inmune que contiene *Mycobacterium tuberculosis* eliminado), adyuvante incompleto de Freund y adyuvante de hidróxido de aluminio.

La cantidad de composición inmunógena utilizada en la producción de anticuerpos policlonales varía dependiendo de la naturaleza del inmunógeno así como también del animal utilizado para la inmunización. Pueden utilizarse una diversidad de rutas para administrar el inmunógeno (subcutánea, intramuscular, intradérmica, intravenosa e intraperitoneal). La producción de anticuerpos policlonales puede controlarse por muestras de sangre del animal inmunizado en diversos puntos tras la inmunización. Una segunda inyección de refuerzo también puede ser administrada. El proceso de refuerzo y titulación se repite hasta que se logra un título adecuado. Cuando se obtiene un nivel deseado de inmunogenicidad, se le puede tomar al animal inmunizado una muestra de sangre y el suero se aísla y se almacena, y/o el animal puede utilizarse para generar mAb.

Los anticuerpos monoclonales (mAb) pueden ser fácilmente preparados a través del uso de técnicas bien conocidas, tales como aquellas ejemplificadas en la Patente de los Estados Unidos N.º 4.196.265. Típicamente, esta técnica involucra inmunizar un animal adecuado con una composición inmunógena seleccionada, por ejemplo, una proteína, polipéptido o péptido antifúngico purificado o parcialmente purificado. La composición inmunizante se administra de una forma eficaz para estimular células productoras de anticuerpos. Los roedores tales como los ratones y las ratas son los animales preferidos, sin embargo, el uso de células de conejos, ovejas o ranas es también posible. El uso de ratas puede proporcionar ciertas ventajas aunque se prefieren los ratones, siendo los más preferidos los ratones BALB/c ya que son los más utilizados de forma rutinaria y generalmente proporcionan un porcentaje más alto de fusiones estables.

También se contemplan procedimientos de inmunización genética para obtener ya sea anticuerpos monoclonales o policlonales los cuales se unen a las proteínas TIC807 desveladas en el presente documento. En estos procedimientos, el gen que codifica la proteína TIC807 está ligado operativamente a un promotor que es activo en células de mamífero. El ADN de plásmido aislado que comprende el casete de expresión de células de mamífero que comprende la proteína codificadora TIC807 es luego inyectado directamente en el animal para producir una respuesta inmune a la proteína TIC807 codificada. Los animales que pueden utilizarse como huéspedes de la inyección para la inmunización genética incluyen ratones, ratas, conejos, cabras, vacas o caballos. Aunque pueden utilizarse una diversidad de regímenes de inyección, un régimen ejemplar comprendería la inyección de ADN de plásmido disuelto en solución salina tamponada con fosfato o con otro tampón adecuado a una concentración de aproximadamente 1-2 mg de ADN de plásmido/ml y en una dosis de aproximadamente 100 µg/inyección/animal (es decir, para un ratón, rata o conejo). Pueden realizarse aproximadamente 3-4 inyecciones en cada animal en intervalos de dos semanas. La inmunización genética se describe en Chambers y Johnston, Nature Biotechnol. (21): 1088, 2003). Las organizaciones de investigación contractual también llevan a cabo experimentos de inmunización genética para obtener anticuerpos (QED Bioscience Inc., San Diego, CA, Estados Unidos).

Los ejemplos de casetes de expresión de mamífero útiles que pueden utilizarse para la inmunización genética incluyen el vector pcDNA3.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA, Estados Unidos) que proporciona un promotor CMV para la expresión de genes ligados operativamente o el vector pRc/RSV (Invitrogen, Carlsbad, CA, Estados Unidos). En los casos en que altos niveles de expresión de antígenos son citotóxicos, puede utilizarse un promotor más débil, tal como el promotor SV40, para expresar el antígeno. Se anticipa que ya sea el gen TIC807 nativo (SEQ ID NO: 4) o el gen TIC807 sintético (SEQ ID NO: 6) puede ligarse operativamente a promotores y elementos de poliadenilación que son activos en células de mamífero para obtener plásmidos adecuados para la inmunización genética. Sin embargo, también se contempla el diseño y la síntesis de otras secuencias codificadoras de TIC807 para la expresión en huéspedes mamíferos por retrotraducción de la secuencia de aminoácidos de TIC807 (SEQ ID NO: 5). También se contemplan vectores de expresión mamíferos que comprenden además secuencias de péptidos de señal que proporcionan secreción extracelular y/o inserción en transmembrana de secuencias ligadas operativamente que codifican proteínas TIC807.

XV. Kits de Detección y Exploración de Proteína TIC807

La presente invención contempla procedimientos y kits para seleccionar muestras que se sospecha que contienen proteínas TIC807 o polipéptidos relacionados con proteína TIC807, o células que producen tales polipéptidos. En las realizaciones particulares contempladas en el presente documento, los procedimientos y kits detectan la proteína TIC807. Un kit puede contener uno o más anticuerpos de la presente invención, y también pueden contener

reactivo(s) para detectar una interacción entre una muestra y un anticuerpo de la presente invención. El o los reactivos proporcionados pueden ser radioetiquetados, etiquetados espectrofotométricamente, etiquetados fluorescentemente o etiquetados enzimáticamente. Los reactivos proporcionados pueden incluir un sustrato que se convierte en un producto que puede detectarse por espectrofotometría, luminometría o fluorescencia. El kit puede

contener un agente radioetiquetado o etiquetado con hapteno conocido capaz de unión o interacción con un anticuerpo de la presente invención.

El o los reactivos del kit pueden ser provistos como una solución líquida, unidos a un soporte sólido o como un polvo seco. Preferentemente, cuando el o los reactivos son proporcionados en una solución líquida, la solución líquida es una solución acuosa. Preferentemente, cuando el o los reactivos proporcionados están unidos a un soporte sólido, el

soporte sólido puede ser un medio cromatográfico, una placa de ensayo que tiene una pluralidad de pocillos o un portaobjeto de microscopio. Cuando el o los reactivos proporcionados son un polvo seco, el polvo puede ser reconstituido mediante la adición de un solvente adecuado, que puede ser provisto.

En aun otras realizaciones, la presente invención se refiere a procedimientos de inmunodetección y kits asociados. Se propone que las proteínas o péptidos TIC807 de la presente invención puedan emplearse para detectar anticuerpos que tienen reactividad con los mismos, o, como alternativa, pueden emplearse anticuerpos preparados de conformidad con la presente invención, para detectar proteínas TIC807 o péptidos que contienen epítopos relacionados con la proteína TIC807. En general, estos procedimientos incluirán, en primer lugar, obtener una muestra sospechosa de contener ese tipo de proteína, péptido o anticuerpo, poner en contacto la muestra con un anticuerpo o péptido de acuerdo con la presente invención, según sea el caso, en condiciones eficaces para permitir la formación de un inmunocomplejo, y luego detectar la presencia del inmunocomplejo.

En general, la detección de la formación del inmunocomplejo es bastante conocida en la técnica y puede lograrse a través de la aplicación de numerosos enfoques. Por ejemplo, la presente invención contempla la aplicación de ELISA, RIA, inmunotransferencia (por ejemplo, transferencia puntual) y técnicas de inmunofluorescencia indirectas. Generalmente, la formación de un inmunocomplejo será detectada a través del uso de una etiqueta, tal como una radioetiqueta o una etiqueta enzimática (tal como fosfatasa alcalina o peroxidasa de rábano picante). Naturalmente, pueden encontrarse ventajas adicionales a través del uso de un ligando de unión secundario tal como un anticuerpo secundario o una disposición de unión a ligandos biotina/avidina, según lo conocido en la técnica.

Para propósitos de ensayo, se propone que prácticamente pueda emplearse cualquier muestra sospechosa de comprender ya sea una proteína o péptido TIC807 o un péptido relacionado con la proteína TIC807 o anticuerpo que se quiere detectar, según sea el caso. Se contempla que dichas realizaciones pueden tener aplicación en la titulación de muestras de antígeno o anticuerpo, en la selección de hibridomas. En kits que pueden emplearse para detectar la presencia de proteínas TIC807 o péptidos relacionados y/o anticuerpos en una muestra, las muestras pueden incluir células, sobrenadantes celulares, suspensiones celulares, extractos celulares, fracciones enzimáticas, extractos proteicos u otras composiciones libres de células sospechosas de contener proteínas o péptidos TIC807. En términos generales, los kits pueden incluir una proteína TIC807 adecuada, péptido o un anticuerpo dirigido contra ese tipo de proteína o péptido, junto con un reactivo de inmunodetección para detectar complejos de anticuerpo/antígeno, instrucciones para el uso de estos materiales, y un medio para contener el anticuerpo o antígeno y reactivo. El reactivo de inmunodetección típicamente comprenderá una etiqueta asociada con el anticuerpo o antígeno, o asociada con un ligando de unión secundario. Los ejemplos de ligandos podrían incluir un anticuerpo secundario dirigido contra el primer anticuerpo o antígeno o un ligando de biotina o avidina (o estreptavidina) que tiene una etiqueta asociada. Naturalmente, según lo señalado anteriormente, se conocen en la técnica una cantidad de etiquetas ejemplares y todas esas etiquetas pueden emplearse en conexión con la presente invención.

El envase generalmente incluirá un frasco en el cual puede colocarse el anticuerpo, el antígeno o el reactivo de detección, y preferentemente adecuadamente distribuido en alícuotas. Los kits también típicamente incluirán un medio para contener los envases de anticuerpo, antígeno y reactivo en cercano confinamiento para la venta comercial. Dichos envases pueden incluir envases para inyección o de plástico moldeado por soplado en los cuales se retienen los frascos deseados.

En vista de lo que antecede, se puede ver que se logran y se obtienen diversas ventajas de la invención.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos son meramente representativos de la invención. Sin embargo, los ejemplos que quedan dentro del alcance de las reivindicaciones son para fines ilustrativos.

Ejemplo 1: Identificación de la cepa EG2934 de *Bacillus thuringiensis*

Este ejemplo describe la cepa EG2934 de *Bacillus thuringiensis* y proteínas cristalinas derivadas de esta cepa.

Las cepas de *Bacillus thuringiensis* son muy conocidas por su capacidad de producir cristales paraesporales que contienen proteínas con diversas actividades insecticidas contra especies de insectos Lepidópteros, Coleópteros y Dípteros. Estos cristales paraesporales exhiben una diversidad de formas geométricas cuando se observan por

microscopio de contraste de fases y se han descrito como irregulares, cuboidales, con forma de varilla y romboidales, bipiramidales. Las cepas de *B. thuringiensis* que exhiben actividad tóxica para Lepidópteros parecen ser más comunes que las cepas de *B. thuringiensis* que exhiben toxicidad para otras especies de insectos. Los cristales paraesporales que exhiben una forma bipiramidal están frecuentemente asociados con aislados de *B. thuringiensis* tóxicos para Lepidópteros. Esta relación función-estructura cristalina bipiramidal con actividad en Lepidópteros proporciona una ventaja cuando se seleccionan cepas de *B. thuringiensis* sin caracterizar, permitiendo una rápida selección de cepas que puede exhibir actividad insecticida dirigida a insectos que no son de una especie Lepidóptera. La cepa EG2934 se seleccionó sobre esta base ya que parecía, cuando se observó por microscopio de contraste de fases, que contenía cristales bien definidos que carecen de una estructura bipiramidal. A fin de establecer qué proteínas cristalinas producidas por esta cepa poseían actividad insecticida, los genes que codifican estas proteínas se clonaron y expresaron en una cepa huésped de *B. thuringiensis* acristalífera y libre de toxinas bien caracterizada. Se identificaron cuatro proteínas cristalinas, que oscilaban en tamaño desde aproximadamente 35 kilodaltons (kDa) hasta aproximadamente 120 kDa en preparaciones cristalinas producidas por la cepa EG2934 de *B. thuringiensis*. Como un exploración de rutina, estas proteínas fueron sometidas a ensayo contra plagas de insectos de plantas conocidas para determinar la toxicidad. Se descubrió que una proteína de la cepa EG2934 de *B. thuringiensis*, designada TIC807, era tóxica a los insectos perforadores-chupadores, *Lygus hesperus* y *Lygus lineolaris*.

Ejemplo 2: Caracterización de proteínas cristalinas producidas por la cepa EG2934 de *B. thuringiensis*

Este ejemplo ilustra la caracterización de proteínas cristalinas aisladas de la cepa EG2934 de *B. thuringiensis* y la subsiguiente caracterización inicial de la proteína toxina activa *Lygus*, TIC807.

La cepa EG2934 de *B. thuringiensis* fue cultivada a 25 hasta 28 grados Celsius en medio de esporulación C2 (Donovan y col., Mol. Gen. Gent. 214: 365-372, 1988) durante 3 a 4 días o hasta la esporulación y lisado completos. Las esporas y los cristales se recolectaron por centrifugación y se resuspendieron en tampón de lavado (Tris-HCl 10 mM, EDTA 0,1 mM, 0,005 por ciento de Triton X-100, pH 6,8) y se recolectaron nuevamente por centrifugación. Los sedimentos de esporas-cristales se resuspendieron en tampón de lavado a un décimo del volumen de cultivo original. Las proteínas cristalinas en los concentrados 10X se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida SDS (SDS-PAGE). Las concentraciones proteicas se determinaron por densitometría utilizando albúmina sérica bovina (BSA) como un patrón.

La cepa EG2934 de *B. thuringiensis* produce proteínas cristalinas de aproximadamente 120, 110, 65 y 35 kilodaltons (kDa) tras la esporulación. Las proteínas de EG2934 se resolvieron por SDS-PAGE. Después de la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF (BioRad, Hercules, CA) siguiendo procedimientos de transferencia de western convencionales. Después de la transferencia, las proteínas unidas a cada membrana se sometieron a secuenciado de N-terminal, utilizando procedimientos convencionales de degradación Edman automáticos. La secuencia de aminoácidos N-terminal de TIC807 se presenta como SEQ ID NO: 1. Las investigaciones en las bases de datos públicas disponibles no pudieron identificar una coincidencia significativa con esta secuencia, lo que sugiere que la proteína TIC807 puede ser novedosa. Dos cebadores oligonucleotídicos degenerados, designados djc-pr12 (SEQ ID NO: 2) y djc-pr13 (SEQ ID NO: 3) fueron diseñados basándose en la secuencia de aminoácidos, SEQ ID NO: 1 para servir como sondas de hibridación para el aislamiento de genes de *B. thuringiensis* que codifican la proteína TIC807 y homólogos de TIC807.

Ejemplo 3: Aislamiento y caracterización de TIC807 aislada de la cepa EG2934 de *B. thuringiensis*

Este ejemplo ilustra la exploración para clones de fagos que contienen ADN que codifica la proteína TIC807. También se describen la clonación y secuenciado del ADN que codifica la proteína TIC807. El procedimiento descrito más adelante también puede aplicarse para recuperar secuencias de ADN que codifican homólogos de TIC807 y genes relacionados en bibliotecas de plásmidos, cósmidos o fagos derivadas de otras cepas de *B. thuringiensis*.

Los cebadores oligonucleotídicos descritos en el ejemplo 2, djc-pr12 y djc-pr13 (SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3, respectivamente), se utilizaron como sondas de hibridación para sondear una biblioteca construida utilizando ADN seleccionado por tamaño aislado de la cepa EG2934 de *B. thuringiensis*. En los oligonucleótidos degenerados de SEQ ID NO: 2 (AAYGCDATHA AYTAYTGGGG DCCDAARAA) y SEQ ID NO: 3 (TGGGGDCCDA ARAAYAAAYAA YGARATWCAR), los restos Y representan una mezcla de restos C o T, los restos D representan una mezcla de restos A, G, o T, los restos H representan una mezcla de restos A, C, o T, los restos R representan una mezcla de restos A o G, y los restos W representan una mezcla de restos A o T. El ADN total de la cepa EG2934 de *B. thuringiensis* se preparó utilizando un protocolo que emplea un paso de extracción de CTAB (Current Protocols in Molecular Biology (1997) John Wiley and Sons, Inc.). Este ADN no se pudo cortar con la enzima de restricción *Sau3AI*, un cortador de 4 bases típicamente utilizado para preparar bibliotecas genómicas. Sorprendentemente, un isoesquizómero ("isoschizimer") de *Sau3AI* que es sensible a la metilación de ADN, *Mbol*, digirió el ADN genómico eficazmente. El ADN digerido se fraccionó por tamaño en un gel TBE 1X de agarosa al 1 %. Los fragmentos *Mbol* de 7-12 kb se extrajeron de cortes de gel utilizando protocolos convencionales y se ligaron en un vector λ -Zap Express digerido con *BamHI* y se empaquetaron en partículas de fagos utilizando un kit GigaPack III Gold (Stratagene, La Jolla, CA). Después de la amplificación de fagos, las transfecciones se colocaron en placas y se realizaron

elevaciones de placas con membranas de nylon Duralon UV (Stratagene, La Jolla, CA). Las membranas se incubaron a 50 grados Celsius en un tampón de prehibridación/ hibridación convencional que contenía SSC 5X, N-lauroil sarcosina 0,1 %, SDS 0,02 %, Reactivo de Bloqueo 1 % (Roche, Indianápolis, IN, Cat. N.º 1585762), 0,1 mg/ml de poly-A, y 4 µg/ml de poli-dA durante varias horas. Los oligonucleótidos se etiquetaron en el extremo 3' con digoxigenina (DIG) utilizando transferasa terminal, DIG-11-dUTP (DIG oligonucleotide tailing kit; Roche, Indianápolis, IN, Cat. N.º 1 417 231) y los protocolos recomendados por el fabricante. Se agregó una mezcla 1:1 de los oligos etiquetados con DIG djc-pr12 y djc-pr13 y las membranas se incubaron durante la noche a 50 grados Celsius. Los filtros se lavaron dos veces durante 15 minutos a temperatura ambiente en SSC 3X, SDS 0,1 % y dos veces durante 15 minutos a 50 grados Celsius en SSC 1X, SDS 0,1 %. Las placas de hibridación se visualizaron por quimiluminiscencia utilizando el set y protocolos de tampón de Lavado y Bloqueo de Roche (Indianápolis, IN) (Roche, Indianápolis, IN, Cat. N.º 11585762001), fragmentos Fab anti-DIG-fosfatasa alcalina (Roche, Indianápolis, IN, Cat. N.º 11093274910) y el sustrato CSPD (3-(4-metoxispiro {1,2-dioxetan-3,2-(5-cloro)tricciclo [3.3.1.1^{3,7}]decan}-4-il)fenilfosfato disódico) (Roche, Indianápolis, IN). Los doce clones recombinantes se recogieron de las placas primarias, se diluyeron y se colocaron en placas y re-sondearon con los oligos etiquetados con DIG. Solamente dos rondas de plaqueo/sondeo fueron necesarias para obtener clones puros. Los doce clones de fagos en su totalidad se sometieron a reacciones de escisión proporcionando 12 clones de fagémidos individuales. Estos fueron digeridos con *Sa*I y *N*oI para liberar los insertos clonados. Las digestiones se resolvieron en un gel TBE 1X de 1 % de agarosa y se transfirieron a una membrana Nytran® para el análisis de Southern. Los tamaños de los insertos eran mucho más pequeños de lo esperado, oscilando en tamaño entre 2-5 kb. Sin embargo, el análisis de Southern demuestra la presencia de ADN de hibridación en 9 de 12 clones.

Se llevaron a cabo reacciones de amplificación térmica utilizando combinaciones de los oligos degenerados, djc-pr12 y djc-pr13 con cebadores específicos para secuencias vectoriales que flanquean los insertos para mapear la localización de la región codificadora de TIC807 en los clones de fagémidos. Basándose en estos resultados, se determinó que el gen entero estaba presente en cuatro clones de fagémidos diferentes designados pIC17039 a pIC17042. El tamaño de los insertos y la identificación de cepas correspondiente a cada uno de estos clones de fagémidos se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Cepas de *Escherichia coli* que contienen fagémidos de TIC807 y el tamaño de inserto asociado.

Cepa	Fagémido	Tamaño de Inserto Estimado (kilobases)
SIC8087	pIC17039	2,3
SIC8088	pIC17040	3,5
SIC8089	pIC17041	5,5
SIC8090	pIC17042	1,5

El inserto del gen TIC807 en el plásmido pIC17042 se secuenció. La región codificadora deducida (presentada como SEQ ID NO: 4) codifica una proteína de 309 aminoácidos y es presentada como SEQ ID NO: 5. Una búsqueda BlastP (versión 2.2.9) de la base de datos de proteínas no redundantes reveló que el emparejamiento más cercano con la secuencia de la proteína TIC807 era con la proteína cristalina de *B. thuringiensis* Cry15Aa1 (SEQ ID NO: 41). Una alineación global Needleman-Wunsch de las dos proteínas demostró una identidad de secuencias del 25,5 % entre la secuencia de la proteína TIC807 y la secuencia de la proteína de Cry15Aa1. La alineación de TIC807 (SEQ ID NO: 5) y Cry15Aa (SEQ ID NO: 41) se ilustra en la Figura 1. Aunque las proteínas TIC807 y Cry15Aa1 no están altamente conservadas, las regiones localizadas de las proteínas exhiben una conservación de secuencia completa en tramos cortos de secuencias de aminoácidos contiguos de hasta siete restos de longitud.

El vector pIC17040 que alberga la cepa de *Escherichia coli* SIC8088 se depositó el 16 de marzo de 2007 en la Colección de Cultivos de Investigación Agrícola, Northern Regional Research Laboratory (NRRL) en Peoria, Illinois y con N° de Acceso NRRLB-50030.

Ejemplo 4: Expresión de TIC807 en una cepa huésped de *B. thuringiensis* libre de toxina

Este ejemplo ilustra la clonación de la región codificadora de TIC807 en un plásmido para la expresión en una cepa huésped de *B. thuringiensis* libre de toxina. Este ejemplo también ilustra un proceso mediante el cual una toxina proteica tal como TIC807 puede ser producida en pureza para bioensayo contra plagas de insectos.

Los plásmidos de TIC807 pIC17040 y pIC17041 (Tabla 1) fueron digeridos con las endonucleasas de restricción *N*oI y *X*maI y se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 1 % en TBE 1X. Los fragmentos de ADN únicos resultantes se purificaron siguiendo electroforesis en gel de agarosa utilizando un kit de purificación de ADN de

Qiagen (Valencia, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Asimismo, el vector lanzadera de *E. coli*-*B. thuringiensis* pEG854 (Baum y col. 1990) se digirió con las endonucleasas de restricción *NotI* y *XmaI* y un fragmento de ADN de 4,3 kilobases aproximadamente que contenía el origen de replicación de plásmido Bt ori43 y el gen de cloranfenicol acetiltransferasa (*cat*) se purificó tras la electroforesis en gel de agarosa. El ligamiento de los fragmentos de genes TIC807 con el fragmento génico ori43-*cat* proporcionó plásmidos capaces de replicación en *B. thuringiensis*. Los productos de ligamiento se utilizaron para transformar la cepa huésped de *B. thuringiensis* acristalífera (Cry-) EG10650 para resistencia al cloranfenicol por electroporación, proporcionando los aislados recombinantes de *B. thuringiensis* SIC8091, SIC8092, SIC8093 y SIC8094 que se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Plásmidos que contienen las cepas de *B. thuringiensis* para la expresión de TIC807

Cepa	Plásmido	Tamaño de Inserto Estimado (kilobases)
SIC8091	pIC17043	3,5
SIC8092	pIC17044	3,5
SIC8093	pIC17045	5,5
SIC8094	pIC17046	5,5

Las cepas recombinantes se cultivaron a 25 hasta 28 grados Celsius en medio C2 durante 3-4 días o hasta la esporulación y lisado completos. Las esporas y los cristales se recogieron por centrifugación (por ejemplo, 4000 x g durante 30 minutos), se resuspendieron en tampón de lavado (Tris-HCl 10 mM, EDTA 0,1 mM, Triton X-100 0,005 %, pH 6,8), y se recogieron nuevamente por centrifugación. Los sedimentos de esporas-cristales se resuspendieron en tampón de lavado a 1/10 el volumen del cultivo original. Las proteínas cristalinas presentes en estos concentrados C2 10X se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida SDS (SDS-PAGE). Las cuatro cepas recombinantes produjeron una proteína cristalina de la masa molecular aparente esperada de aproximadamente 35 kDa. Se determinaron las concentraciones proteicas mediante densitometría utilizando albúmina sérica bovina (BSA) como un patrón.

Ejemplo 5: TIC807 es tóxica para *Lygus hesperus* y *Lygus lineolaris*

Este ejemplo ilustra el ensayo de alimentación utilizado para identificar la molécula de proteína TIC807 como tóxica para la chinche opaca de las plantas (WTPB), *Lygus hesperus* y la chinche de las plantas (TPB), *Lygus lineolaris*. Las WTPB y TPB son insectos fitófagos, perforadores-chupadores que atacan numerosas malezas y cultivos. Las WTPB y TPB dañan cultivos agrícolas, incluyendo el algodón, mediante daño por alimentación directa. Debido a que las WTPB y TPB se alimentan perforando-chupando, el ensayo utilizado para ensayar toxinas de proteínas para esta clase de insectos debe permitir el comportamiento alimenticio natural de los insectos. El ensayo de alimentación empleado se basó en un formato de 96 pocillos y un sistema de bolsitas según lo descrito por Habibi y col., (Archives of Insect Biochem. and Phys. 50: 62-74 (2002)). La dieta artificial fue suministrada por Bio-Serv® (Bio-Serv® Diet F9644B, Frenchtown, NJ), cuyos componentes son presentados en la Tabla 4.

Tabla 4. La dieta artificial de WTPB Bio-Serv® F9644B.

Ingredientes de la Dieta	Gramos/Litro
Germen de Trigo, Estabilizado	44,60
Colesterol	0,50
ARN	5,00
Mezcla de Vitaminas, Vanderzant	8,90
Ácido para-aminobenzoico	0,18
Niacina	0,18
Acetato de Vitamina E	0,10
Aureomicina	0,10
Sulfato de Estreptomicina	0,135

(continuación)

Ingredientes de la Dieta	Gramos/Litro
Carragenina (musgo de Irlanda)	3,00
Judías de Lima, molidas	45,00
Hidrolizado de Caseína	17,90
Mezcla de Sales, Hesperus	2,90
Sacarosa	27,10
Lecitina, Líquida, Soja	0,50
Aceite de Cártamo	0,20
Huevos de Gallina (4)	No agregado

Quinientos dieciocho mililitros de agua en ebullición, esterilizada por autoclave, se combinaron con 156,3 gramos de la dieta Bio-Serv® F9644B en una mezcladora de superficie esterilizada. Se rompieron cuatro huevos de gallina de superficie esterilizada y el contenido se agregó a la mezcladora que contenía la mezcla de la dieta. La mezcla se mezcló hasta que obtuvo un aspecto uniforme y se ajustó a un litro de volumen y se dejó enfriar. Se prepararon muestras de toxina mezclando la preparación de proteína de toxina TIC807 en la concentración deseada con un volumen equivalente de la dieta mezclada.

Se colocó una lámina de Parafilm® (Pechiney Plastic Packing, Chicago, IL) sobre un colector de vacío con formato de 96 pocillos (Analytical Research Systems, Gainesville, FL) con un vacío de aproximadamente -20 milímetros de mercurio, el cual es suficiente para causar la extrusión del Parafilm® en los pocillos. Se agregaron cuarenta microlitros de muestra de ensayo a los pocillos con Parafilm®. Luego se colocó una lámina de película Mylar (Clear Lam Packaging, Inc., Elk Grove Village, IL) sobre el Parafilm® y se selló suavemente con una espátula calentadora (Bienfang Sealector II, Hunt Corporation, Filadelfia, PA). Luego, las bolsitas de Parafilm® se colocaron sobre una placa de 96 pocillos con fondo plano que contenía los huevos de *Lygus* suspendidos en agarosa. Tras la eclosión, las ninfas de *Lygus* se alimentarán perforando la bolsita que está presentada por encima de los mismos. Sin desear estar limitados por teoría alguna, se cree que la digestión extraoral en la bolsita puede conducir a la proteólisis y a la degradación con anterioridad a la ingestión por el insecto. Para asegurar que la proteína intacta estuviese siendo presentada al insecto en su dieta, las bolsitas de la dieta fueron reemplazadas cada dos días. Esta mejora en teoría permite una más larga presentación de las proteínas de toxinas intactas en la dieta del insecto durante el transcurso del ensayo de alimentación. Además, pueden ensayarse concentraciones más bajas de proteína de toxina potencial puesto que no se requerirán cantidades más grandes de proteína para compensar efectos digestivos extraorales potenciales. Las bolsitas de la dieta de los insectos se reemplazaron en los días dos y cuatro. Se determinaron las puntuaciones de la atrofia y la mortalidad en el día 5 y se compararon con el control no tratado (UTC).

Las Tablas 5 a 8 ilustran la toxicidad de TIC807 para la chinche opaca de las plantas (WTPB), *Lygus hesperus* y la chinche de las plantas (TPB), *Lygus lineolaris*. La dieta fue menos que óptima para la TPB, reduciendo el índice de crecimiento de las ninfas en la muestra del UTC (control sin tratar) con relación al UTC para WTPB. Sin embargo, se demostró una mortalidad y atrofia significativos contra TPB.

Tabla 5. Resultados de atrofia por TIC807 para la chinche opaca de las plantas (WTPB), *Lygus hesperus*

Tratamiento	concentración (mg/ml)	N	Atrofia Media	Desviación Típica	P> t
UTC	0,00	12	0,00	0,00	
TIC807	1,00	5	1,60	0,55	<0,0001

Tabla 6. Resultados de porcentaje de mortalidad por TIC807 para la chinche opaca de las plantas (WTPB), *Lygus hesperus*

Tratamiento	concentración (mg/ml)	N	% Medio de mortalidad	Desviación Típica	P> t
UTC	0,00	12	0,00	0,00	
TIC807	1,00	5	56,79	15,89	<0,0001

Tabla 7. Resultados de atrofia por TIC807 para la chinche de las plantas (TPB), *Lygus lineolaris*

Tratamiento	concentración (mg/ml)	N	Atrofia Media	Desviación Típica	P> t
UTC	0,00	6	0,00	0,00	
TIC807	1,00	5	1,20	0,20	<0,05

Tabla 8. Resultados de porcentaje de mortalidad por TIC807 para la chinche de las plantas (TPB), *Lygus lineolaris*

Tratamiento	concentración (mg/ml)	N	% Medio de mortalidad	Desviación Típica	P> t
UTC	0,00	6	0,00	0,00	
TIC807	1,00	5	45,33	7,65	<0,05

5

Ejemplo 6: Síntesis de un gen que codifica una proteína TIC807 que está diseñada para la expresión en plantas

Se diseña y se sintetiza una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína TIC807. Esta región codificadora no nativa diseñada para la expresión en plantas está provista aquí como SEQ ID NO: 6. La secuencia codificadora está caracterizada por un contenido A+T inferior que la región codificadora de TIC807 nativa que fue derivada de *Bacillus thuringiensis*, eliminando regiones del gen TIC807 nativo que son ricas en A+T y reemplazando aquellas con secuencias que tienen menos cantidad de restos A+T.

10

Ejemplo 7: Casetes de expresión para la expresión de una proteína TIC807 en células de plantas transgénicas o plantas transgénicas

15

Se construyó una diversidad de casetes de expresión en plantas con la región codificadora de TIC807 no nativa (SEQ ID NO: 6). Dichos casetes de expresión son útiles para la expresión transitoria en protoplastos de plantas o callos de plantas.

20

Un primer casete de expresión de planta de TIC807 comprende un promotor CaMV35S mejorado que está ligado operativamente a una región codificadora que comprende una secuencia codificadora de TIC807 no nativa con una fusión en C-terminal en fase a una etiqueta de epítipo de proteína myc (SEQ ID NO: 19). Esta región codificadora está ligada operativamente a un sitio de poliadenilación de nopalina sintasa (NOS) 3' terminal. La secuencia de este casete de expresión 5'-e35S-TIC807-myc-NOS-3' etiquetado y no direccionado es provisto como (SEQ ID NO: 20) y se clonó en pMON59221. El casete de expresión entero 5'-e35S-TIC807-myc-NOS-3' está contenido en un fragmento de restricción *NotI* en el vector lanzadera pMON59221.

25

Un segundo casete de expresión en plantas de TIC807 comprende un promotor CaMV35S mejorado que está ligado operativamente a una región codificadora que comprende una secuencia codificadora del péptido del cloroplasto de *Arabidopsis shgK* N-terminal (es decir, CTP2) fusionada en fase a una secuencia codificadora de TIC807 no nativa con una fusión en C-terminal en fase a una etiqueta del epítipo de proteína myc (SEQ ID NO: 21). Esta región codificadora está ligada operativamente a un sitio de poliadenilación de nopalina sintasa (NOS) 3' terminal. La secuencia de este casete de expresión e35S-CTP2-TIC807-myc-NOS etiquetado y direccionado es provisto como (SEQ ID NO: 22) y se clonó en pMON59223. El casete de expresión 5'-e35S-CTP2-TIC807-myc-NOS-3' entero está contenido en un fragmento de restricción *NotI* en el vector lanzadera pMON59223.

30

Un tercer casete de expresión en plantas TIC807 comprende un promotor CaMV35S mejorado que está ligado operativamente a una región codificadora que comprende una secuencia codificadora de TIC807 no nativa (SEQ ID NO: 6). Esta región codificadora está ligada operativamente a un sitio de poliadenilación de nopalina sintasa (NOS) 3' terminal. La secuencia de este casete de expresión de TIC807 no direccionado es provista como (SEQ ID NO:40) y se clonó en pMON59224. El casete de expresión 5'-e35S-TIC807-NOS-3' entero está contenido en un fragmento de restricción *NotI* en el vector lanzadera pMON59224.

35

Un cuarto casete de expresión en plantas de TIC807 comprende un promotor CaMV35S mejorado que está ligado operativamente a una región codificadora que comprende una secuencia codificadora de péptido del cloroplasto de *Arabidopsis shgK* N terminal (es decir, CTP2) fusionada en fase a una secuencia codificadora de TIC807 no nativa

40

(SEQ ID NO: 7). La secuencia peptídica de la proteína de fusión CTP2-TIC807 codificada por esta construcción se proporciona como SEQ ID NO: 8. Esta región codificadora está ligada operativamente a un sitio de poliadenilación de nopalina sintasa (NOS) 3' terminal. La secuencia de este casete de expresión 5'-e35S-CTP2-TIC807-NOS-3' direccionado es provista como (SEQ ID NO: 23) y se clonó en pMON59222. El casete de expresión 5'-e35S-CTP2-TIC807-NOS-3' entero está contenido en un fragmento de restricción *NotI* en el vector lanzadera pMON59222.

Un quinto casete de expresión direccionado al plastidio comprende un promotor CaMV35S mejorado que está ligado operativamente a una secuencia guía no traducida en 5' derivada del gen Hsp17.9 de *Glycine max* la cual está ligada operativamente a una región codificadora que comprende una secuencia codificadora de péptido del cloroplasto de *Arabidopsis* shkG N terminal (es decir, CTP2) fusionada en fase a una secuencia codificadora de TIC807 no nativa (SEQ ID NO: 6). La secuencia peptídica de la proteína de fusión CTP2-TIC807 codificada por esta construcción se proporciona como SEQ ID NO: 8. Esta región codificadora está ligada operativamente a un sitio de poliadenilación de nopalina sintasa (NOS) 3' terminal. La secuencia de este casete de expresión 5'-e35S-Hsp17.9-CTP2-TIC807-NOS-3' direccionado es provista como (SEQ ID NO: 42).

Un sexto casete de expresión comprende un promotor CaMV35S mejorado que está ligado operativamente a una secuencia guía no traducida en 5' derivada del gen Hsp17.9 de *Glycine max* el cual está ligado operativamente a una región codificadora que comprende una secuencia codificadora de TIC807 no nativa (SEQ ID NO: 6). La secuencia peptídica de la proteína TIC807 codificada por esta construcción se proporciona como SEQ ID NO: 5. Esta región codificadora está ligada operativamente a un sitio de poliadenilación de nopalina sintasa (NOS) 3' terminal. La secuencia de este casete de expresión 5'-e35S-Hsp17.9-TIC807-NOS-3' se proporciona como (SEQ ID NO: 43).

Ejemplo 8: Construcción de vectores de transformación mediados por *Agrobacterium* que contienen casetes de expresión de TIC807 y transferencia con *Agrobacterium*

Para construir vectores de transformación mediados por *Agrobacterium*, se clonan casetes de expresión de TIC807 en vectores adecuados entre las secuencias límite de *Agrobacterium* de modo que serían transferidos al genoma de una célula de planta huésped por huéspedes *Agrobacterium* que contienen los vectores construidos junto con un gen marcador seleccionable. Más específicamente, el fragmento de restricción que contiene el casete de expresión 5'-e35S-Hsp17.9-CTP2-TIC807-NOS-3' entero (SEQ ID NO: 42) se clona en un vector de transformación de planta con *Agrobacterium*. Similarmente, el fragmento de restricción que contiene el casete de expresión 5'-e35S-Hsp17.9-TIC807-NOS-3' entero (SEQ ID NO: 43) es clonado en un vector de transformación vegetal con *Agrobacterium*. Los vectores que contienen los casetes de expresión de TIC807 (es decir, casete no direccionado de SEQ ID NO: 43 y casete direccionado de SEQ ID NO: 42) se introducen en *Agrobacterium* por electroporación o por apareamiento tri-parental.

Ejemplo 9. Transformación de algodón con vectores de transformación de *Agrobacterium* de TIC807

El algodón puede ser transformado con los vectores de transformación con *Agrobacterium* de TIC807 pMON105863 y pMON105864 o sus equivalentes utilizando un procedimiento sustancialmente similar al procedimiento descrito en la Patente de los Estados Unidos N.º 5.159.135.

Para iniciar el proceso de transformación y regeneración para plantas de algodón, es necesario esterilizar superficialmente, en primer lugar, semillas de algodón para prevenir la contaminación inadvertida del cultivo resultante. Luego, las semillas se dejan germinar en un medio de germinación apropiado que contiene un fungicida.

Cuatro a seis días después de la germinación, la porción de hipocótilo de la planta inmadura se retira y se secciona en segmentos pequeños que promedian aproximadamente 0,5 centímetros por trozo. Los explantes de hipocótilos se dejan estabilizar y permanecen viables en un líquido o medio de cultivo tisular de planta de agar.

Una vez que los segmentos de hipocótilo se han estabilizado, pueden rápidamente ser inoculados con un cultivo en suspensión de *Agrobacterium* no oncogénico competente para transformación. Pueden utilizarse cepas de *Agrobacterium* tales como LBA4404. El proceso de inoculación se deja proceder durante tres a cinco días a temperatura ambiente, es decir 24 °C.

Al final del periodo de tiempo de inoculación, es necesario, en primer lugar, enjuagar el exceso de *Agrobacterium*. Luego, los tejidos tratados remanentes pueden ser transferidos a un segundo medio de agar, el cual también contiene uno o más antibióticos tóxicos para *Agrobacterium*, pero no para los tejidos del hipocótilo, a una concentración suficiente para matar cualquier *Agrobacterium* remanente en el cultivo. Los antibióticos adecuados para utilizar en ese tipo de medio incluyen carbenicilina y cefotaxima. Luego los tejidos se dejan durante un periodo de una a diez días para que se recuperen del proceso de transformación y luego continúan en cultivo.

Los tejidos son luego cultivados en un medio de cultivo tisular el cual, además de sus componentes normales, contiene un agente de selección, siendo el agente de selección tóxico para células de algodón no transformadas aunque no para células de algodón transformadas las cuales tienen incorporada resistencia genética al agente de selección y expresan esa resistencia. Un medio de cultivo tisular adecuado es el medio MS al cual se le agregan las fitohormonas ácido 2,4-diclorofenoxi-acético (2,4,D), 6-furfurilaminopurina y un agente gelificante. Los agentes de

selección adecuados incluyen tanto antibióticos como herbicidas. Los rasgos antibióticos adecuados los cuales pueden servir como marcadores seleccionables dominantes incluyen el gen de aminoglucósido fosfotransferasa-3'-II (APH-(3')-II), también denominado como el gen de neomicina fosfotransferasa II (NPTII), los cuales codifican resistencia al antibiótico kanamicina, y el gen APH-(3')-IV el cual codifica resistencia a Higromicina B. La kanamicina, G418 y la Higromicina B son aminoglucósidos que detendrán el crecimiento de células de algodón no transformadas, aunque estos antibióticos son fosforilados por la enzima apropiada si es expresada en las células transformadas. Otro agente de selección adecuado es el herbicida glifosato el cual puede utilizarse para seleccionar células de algodón transformadas que contienen genes EPSPS resistentes al glifosato. Cuando se utilizan pMON105863 y pMON105864, las células de plantas transformadas son seleccionadas para resistencia a kanamicina o a otro antibiótico que esté cercanamente relacionado con kanamicina y son inactivadas por el gen de neomicina fosfotransferasa II (NPTII) codificado por estos vectores. Los medios dosificados con antibiótico o herbicida permiten solamente que las células transformadas continúen creciendo y desarrollándose. Por lo tanto, las células transformadas, o callos, se dejan crecer en el medio selectivo. Los tejidos transformados supervivientes son transferidos a un medio secundario para inducir la embriogénesis somática. El tejido transformado superviviente continuará por lo tanto formándose en embriones somáticos, los cuales luego pueden regenerarse a través de la técnica de regeneración de la presente invención o a través de cualquier otro protocolo de regeneración de plantas alternativo el cual utiliza embriones somáticos de algodón como su punto de partida.

El proceso de selección debería continuar durante un tiempo prolongado, es decir, 3-4 meses, debido al lento crecimiento de los tejidos transformados uniformemente en el medio antibiótico. Los subcultivos se preparan cada 4-6 semanas para reponer nutrientes y antibióticos. A medida que las células transformadas se seleccionan y se amplifican, las líneas celulares individualmente derivadas son identificables y pueden ser retiradas y amplificadas por separado.

La técnica de regeneración comienza con los tejidos que son resultado del proceso de transformación. Estos tejidos son callos potencialmente transformados los cuales pueden generar embriones somáticos cuando se cultivan en medios de inducción de embriones apropiados.

La técnica de regeneración utilizada por los solicitantes de la presente invención comienza, por lo tanto, con los tejidos que son el resultado del proceso de transformación. Los callos de tejido de algodón, generados de los segmentos de hipocótilos de las plantas de algodón, y transformados potencialmente, se colocan en medio de inducción de embriones somáticos directamente. En este punto, el agente de selección antibiótico debería retirarse del medio de cultivo, aunque de otro modo el medio puede permanecer constante. Estos callos, cultivados en el medio de inducción de embriones somáticos, formarán pequeñas estructuras embrioidales, las cuales han sido denominadas embriones somáticos. Puede tardarse tanto como dos a tres meses para que los embriones somáticos emerjan y maduren. Aproximadamente 5 hasta tantos como 20 embriones somáticos emergerán de un solo callo en una formulación de agar de un medio de inducción de embriones somáticos. Muchos de los embriones somáticos así producidos serán regenerables en plantas enteras de acuerdo con la técnica descrita en esta invención.

Cuando los embriones somáticos en desarrollo son suficientemente grandes, es decir, hasta un tamaño de 4 mm o más de longitud, y parecían tener un buen desarrollo embrionario, es decir, generalmente con un cotiledón y una radícula, pueden transferirse a tubos de ensayo grandes y colocarse en vermiculita fina. La vermiculita es saturada con medio Stewart y Hsu (SH) (Planta 137:113 (1977)) más las fitohormonas ácido indolacético, 6-furfurilaminpurina y ácido gibbélico. Se desarrollan eventualmente pequeñas plántulas, que tienen dos a tres hojas.

Una vez que se establece el crecimiento de las plántulas, es decir, la etapa de 2-3 hojas, las plantas pueden transferirse a macetas de plantas con tierra de vermiculita. También pueden regarse y fertilizarse según lo necesario. También pueden tener que ser introducidas gradualmente al entorno exterior, antes de la exposición al invernadero. Las plántulas pueden ser colocadas otra vez en macetas cuando tienen 4-6 hojas después de lo cual continúan creciendo hasta madurar. Las muestras de las plántulas pueden analizarse para determinar la expresión de TIC807 para identificar plantas transgénicas con actividad inhibidora de insectos.

Ejemplo 11: Ensayo *in-planta* de TIC807 en tejido de callo

Este ejemplo ilustra la expresión en planta de TIC807 para el bioensayo contra *Lygus* y otras plagas de insectos que perforan y/o chupan los fluidos de las células y tejidos de plantas.

Células de algodón son transformadas con construcciones que contienen los genes de interés que codifican la proteína TIC807. En este caso, secuencias de ácidos nucleicos ricas en A+T no nativas que codifican una proteína TIC807 son expresadas en células de algodón utilizando los casetes de expresión de TIC807 en los vectores de transformación de TIC807 descritos en los ejemplos precedentes. Estos casetes de expresión proporcionan ya sea direccionamiento de TIC807 hacia el cloroplasto (es decir, con el casete de expresión 5'-e35S-Hsp17.9-CTP2-TIC807-NOS-3' o 5'-e35S-CTP2-TIC807-NOS-3') o expresión no direccionada (citoplásmica) de TIC807 (es decir, con los casetes de expresión 5'-e35S-Hsp17.9-TIC807-NOS-3' o 5'-e35S-TIC807-NOS-3'). Los vectores de transformación proporcionan un marcador seleccionable, en este caso para la selección de resistencia a kanamicina en tejido de planta transformado. Puede utilizarse ya sea el vector pMON105863 u otros vectores de expresión de plantas de TIC807 equivalentes que contienen casetes de expresión de plantas de TIC807 y un marcador

seleccionable. El tejido calloso se deja desarrollar en cultivo de tejido después de la transformación y selección en una placa de Petri. Luego, las ninfas de *Lygus* se colocan en una placa de Petri o pocillo de placa de microtítulo que contenía callo que se transforma con un casete de expresión de planta de TIC807. Las ninfas de *Lygus* también se colocan en una placa de Petri o pocillo de placa de microtítulo que contiene callo control que no está transformado con un casete de expresión de planta de TIC807. La tapa cerrada de la placa de Petri o del pocillo de la placa de microtítulo previene el escape de las ninfas de *Lygus*. Cualquier material que prevenga el escape de *Lygus* pero que permita el intercambio de gases en la placa de Petri, por ejemplo, Parafilm® puede utilizarse para cerrar la tapa de la placa de Petri o el pocillo de la placa de microtítulo. Un porcentaje de las ninfas de *Lygus* encontrarán el tejido de callo y se alimentarán. Luego, se calculan las puntuaciones de mortalidad y atrofia teniendo en cuenta la muerte de fondo que ocurrirá de aquellos insectos que no pueden alimentarse del tejido del callo para obtener una puntuación ajustada. Las puntuaciones ajustadas para las ninfas de *Lygus* a las que se presenta el tejido transformado de TIC807 se comparan con las puntuaciones ajustadas para las ninfas de *Lygus* a las que se presenta tejido control. Las puntuaciones de la mortalidad y/o atrofia para las ninfas de *Lygus* a las que se les presenta el tejido transformado con TIC807 son significativamente aumentados con relación a los resultados para las ninfas de *Lygus* a las que se les presenta el tejido control.

Ejemplo 12: Ensayos en planta de TIC807 en tejido de hojas

Células de alfalfa, algodón, canola, soja o lechuga son transformadas utilizando los casetes de expresión de TIC807 en los vectores de transformación de TIC807 descritos en los ejemplos precedentes. Estos casetes de expresión proporcionan direccionamiento de TIC807 al cloroplasto (es decir, con los casetes de expresión 5'-e35S-CTP2-TIC807-myc-NOS-3' o 5'-e35S-CTP2-TIC807-NOS-3') o con la expresión no direccionada (citoplásmica) de TIC807 (es decir, con los casetes de expresión 5'-e35S-TIC807-myc -NOS-3' o 5'-e35S-TIC807-NOS-3'). Los vectores de transformación proporcionan un marcador seleccionable, en este caso para la selección de resistencia a kanamicina en tejido de planta transformado. Las células transformadas son seleccionadas para resistencia a kanamicina y son regeneradas en plantas transgénicas. Luego, se permite a plagas de insectos tales como ninfas de *Lygus* alimentarse cuando la planta ha alcanzado un nivel suficiente de madurez, tal como cuando las hojas han crecido hasta un tamaño que permite el uso de una barrera física para prevenir el escape del *Lygus*. La barrera para prevenir el escape de las ninfas de *Lygus* puede ser cualquier dispositivo hecho en casa o disponible en el mercado que permite el contacto de las ninfas del *Lygus* con el tejido de la hoja y permite que el insecto sondee y se alimente del tejido vascular de la hoja. Las jaulas de Clips similares a aquellas descritas por Mowry (1993) (J. Agric. Entomol.10:181-184) serían suficientes para contener las ninfas de *Lygus* para la alimentación. Por lo tanto, se presenta a las ninfas de *Lygus* tejido de hoja de plantas transgénicas que expresan la proteína TIC807 o con tejido de hoja control que no expresa proteína TIC807. El tejido de hoja control es idealmente proporcionado por una planta transgénica que se seleccionó y regeneró en paralelo aunque no contiene un transgén que codifica TIC. Sin embargo, el tejido de hoja de otras plantas de origen y edad similares también puede utilizarse siempre y cuando el tejido no contenga cantidades significativas de proteína TIC807. Luego, las puntuaciones de mortalidad y atrofia son determinados con respecto a la muerte de fondo que se producirá de aquellos insectos que no se pueden alimentar del tejido de la hoja para obtener una puntuación ajustada. Las puntuaciones ajustadas para las ninfas de *Lygus* a las que se les presenta el tejido de hoja transformado con TIC807 se comparan con las puntuaciones ajustadas para las ninfas de *Lygus* a las que se les presenta el tejido de hoja control. Los resultados de mortalidad y/o atrofia para las ninfas de *Lygus* a las que se les presenta el tejido de hoja transformado con TIC807 son aumentados significativamente con relación a las puntuaciones para las ninfas de *Lygus* a las que se les brinda el tejido de hoja control.

Ejemplo 13: Control de insectos utilizando TIC807 en combinación con otros agentes de control de insectos

Habiendo obtenido plantas de algodón transgénicas que expresan proteína TIC807 direccionada o citoplásmica, es también deseable obtener plantas de algodón que expresan otras proteínas inhibidoras de insectos en combinación con TIC807. Este ejemplo ilustra diversos procedimientos mediante los cuales puede lograrse una mayor resistencia a una plaga de insectos específica o una resistencia más amplia a diversas clases de plagas de insectos para proporcionar mayor protección contra insectos para una planta de cultivo. Todas las estrategias descritas a continuación también pueden utilizarse para mejorar un programa de manejo de resistencia a un insecto.

I) Combinación de TIC807 con Moléculas de ARNbci inhibidoras de insectos en Plantas

La supresión génica mediada por ARN bicatenario de la función biológica dentro de las plagas de insectos objetivos puede combinarse con genes que codifican una proteína TIC807. Los genes de insectos que llevan a cabo funciones biológicas claves que pueden ser dianas de ARNbci son descritos en N° de Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos US 2006/0021087.

Dichas moléculas de ARNbci pueden ser direccionadas hacia la inhibición de *Lygus*, el cual es el mismo insecto objetivo que es inhibido por TIC807. Mediante la inhibición simultánea de *Lygus* con una molécula de ARNbci y TIC807, se logra la inhibición a través de dos modalidades de acción diferentes. Se espera que la inhibición mediante diferentes modalidades de acción dé como resultado un manejo mejorado de resistencia a insectos. Para el control de *Lygus*, las moléculas de ARNbci son derivadas de cualquiera de SEQ ID NO: 4 a SEQ ID NO: 39 que corresponde a genes expresados en *Lygus*. El uso de SEQ ID NO: 24 a SEQ ID NO: 39 en el control de insectos se

desvela en N° de Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos 20060021087. Las moléculas de ARN_{bci} dirigidas contra una cualquiera de SEQ ID NO: 24 a SEQ ID NO: 39 son expresadas en plantas de algodón transgénicas con vectores de transformación mediada por *Agrobacterium* diseñados para la expresión de moléculas de RNAbci. La expresión de moléculas de ARN_{bci} se logra por recuperación de plantas transgénicas que comprenden un promotor activo en aquellas plantas que está ligado operativamente a fragmentos de las secuencias de *Lygus* (es decir, SEQ ID NO: 24 a SEQ ID NO: 39) de por lo menos 19-24 nucleótidos de longitud y los complementos inversos de esas secuencias.

Dichas moléculas de ARN_{bci} también pueden ser dirigidas a otros insectos perforadores chupadores tales como áfidos, saltamontes o moscas blancas. Para el control de áfidos, las moléculas de ARN_{bci} derivadas de, u homólogas a, las secuencias de *Toxoptera citricida* o *Acyrtosiphon pisum* de la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 2006/0021087 son expresadas en plantas transgénicas con vectores de transformación mediada por *Agrobacterium* diseñados para la expresión de moléculas de RNAbci. Para el control de saltamontes, moléculas de ARN_{bci} derivadas de, u homólogas a, secuencias de *Homalodisca coagulata* de la Publicación de la Solicitud de Patente de los Estados Unidos N.º 2006/0021087 se expresan en plantas transgénicas con vectores de transformación mediada por *Agrobacterium* diseñados para la expresión de moléculas de RNAbci. Para el control de las moscas blancas, las moléculas de ARN_{bci} adecuadas pueden ser expresadas en plantas transgénicas con vectores de transformación mediada por *Agrobacterium* diseñados para la expresión de moléculas de RNAbci. La expresión de moléculas de ARN_{bci} se logra mediante la recuperación de plantas transgénicas que comprenden un promotor activo en aquellas plantas que está ligado operativamente a fragmentos de las secuencias del áfido, saltamontes o mosca blanca respectivas de por lo menos 19-24 nucleótidos de longitud y los complementos inversos de aquellas secuencias.

Dichas moléculas de ARN_{bci} también pueden ser dirigidas a plagas de coleópteros. En este caso, la expresión de la molécula de ARN_{bci} en conjunto con TIC807 provee el control de una plaga de coleópteros y una plaga de dípteros en una planta transgénica. Para el control del picudo del algodón, *Anthonomus grandis* Boheman, moléculas de ARN_{bci} derivadas de una secuencia de ortólogo de V-ATPasa A descrita en la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 2006/0021087 se expresan en plantas de algodón transgénicas con vectores de transformación mediada por *Agrobacterium* diseñados para la expresión de moléculas de ARN_{bci}. La expresión de moléculas de ARN_{bci} se logra mediante la recuperación de plantas de algodón transgénicas que comprenden un promotor activo en aquellas plantas que está ligado operativamente a fragmentos de la V-ATPasa A del picudo del algodón de por lo menos 19-24 nucleótidos de longitud y los complementos inversos de aquellas secuencias.

Dichas moléculas de ARN_{bci} también pueden ser dirigidas a plagas Lepidópteras. En este caso, la expresión de la molécula de ARN_{bci} en conjunto con TIC807 provee un control de tanto una plaga Lepidóptera como de una plaga Díptera en una planta transgénica. Para un control del gusano cortador, las moléculas de ARN_{bci} derivadas de una secuencia de gusano cortador expresada en el intestino medio (es decir, secuencias de *Helicoverpa armigera* de la Solicitud de Patente de los Estados Unidos N.º 2006/0021087) son expresadas en plantas de algodón transgénicas con vectores de transformación mediada por *Agrobacterium* diseñados para la expresión de moléculas ARN_{bci}. La expresión de moléculas ARN_{bci} se logra mediante la recuperación de plantas de algodón transgénicas que comprenden un promotor activo en aquellas plantas que está ligado operativamente a fragmentos de la secuencia del Gusano cortador de por lo menos 19-24 nucleótidos de longitud y los complementos inversos de aquellas secuencias.

I) Combinación de TIC807 con Proteínas Inhibidoras de Insectos que no son TIC807 en Plantas

Para el control de insectos chupadores perforadores tales como áfidos, saltamontes, *Lygus* o moscas blancas, pueden combinarse diversas moléculas de toxinas con la expresión de TIC807 en planta para mayor control. Dichas moléculas expresadas en planta junto con TIC807 pueden incluir: i) ET29, ET37 o TIC809 y TIC810, TIC812, TIC127 o TIC128 (PCT US 2006/033867; Patente de los Estados Unidos N.º 6.093.695); ii) AXMI-027, AXMI-036 y/o AXMI-038 (WO 06/107761); iii) AXMI-018, AXMI-020 y/o AXMI-021 (WO 06/083891); iv) AXMI-010 (WO 05/038032); v) AXMI-003 (WO 05/021585) vi) AXMI-008 (US 2004/0250311); vii) AXMI-006 (US 2004/0216186) viii) AXMI-007 (US 2004/0210965); ix) AXMI-009 (US 2004/0210964); x) AXMI-014 (US 2004/0197917); xi) AXMI-004 (US 2004/0197916); xii) AXMI-028 y/o AXMI-029 (WO 06/119457) y xiii) AXMI-007, AXMI-008, AXMI-0080rf2, AXMI-009, AXMI-014 y AXMI-004 (WO 04/074462). Se ha mostrado previamente que la combinación de las moléculas proteicas de toxinas TIC809 (presentada como SEQ ID NO: 10) y TIC810 (presentada como SEQ ID NO: 12) es inhibidora de la chinche opaca de las plantas (WTPB), *Lygus hesperus* Knight en bioensayos (PCT US 2006/033867). Las proteínas de fusión de TIC809 y TIC810, TIC127 (presentada como SEQ ID NO: 14) y TIC128 (presentada como SEQ ID NO: 16) también pueden ser activas contra *Lygus*. El polinucleótido que codifica TIC127 está compuesto por la molécula de ácido nucleico que codifica TIC809 ligada a la molécula de ácido nucleico que codifica TIC810 mediante una secuencia de nucleótidos polienlazadora (presentada como SEQ ID NO: 17) que codifica el enlazador de aminoácidos presentado como SEQ ID NO: 18. El polinucleótido que codifica TIC128 está compuesto por la molécula de ácido nucleico que codifica TIC810 ligada a la molécula de ácido nucleico que codifica TIC809 por una secuencia nucleotídica polienlazadora (presentada como SEQ ID NO: 17) que codifica el enlazador de aminoácidos presentado como SEQ ID NO: 18. La expresión de TIC807 en combinación con TIC127 o TIC128 puede proporcionar un mayor control de *Lygus*. Las plantas dicotiledóneas tales como algodón pudieron transformarse con construcciones de expresión de plantas que contenían secuencias de nucleótidos optimizadas

para dicotiledóneas que codifican TIC807 (presentada como SEQ ID NO:6) junto con TIC809 (presentada como SEQ ID NO:9) y TIC810 (presentada como SEQ ID NO:11), o TIC127 (presentada como SEQ ID NO:13), o TIC128 (presentada como SEQ ID NO:15) para proporcionar una mayor resistencia a *Lygus* o especificidad más amplia a especies contenidas dentro del género, *Lygus*. La expresión óptima de las moléculas de toxina puede requerir la expresión direccionada tal como hacia el cloroplasto de las células. Esto puede lograrse mediante la adición de una molécula de ácido nucleico que codifica un péptido de tránsito, bien conocida en la técnica para dirigir la proteína traducida al cloroplasto de la célula, al extremo 5' de la molécula de ácido nucleico que codifica las toxinas.

Las secuencias de ADN que codifican los casetes de expresión de TIC807 pueden combinarse con una o ambas secuencias de ADN que codifican ARN bicatenario inhibidor de insectos y/o moléculas de proteínas inhibidoras de insectos que no son TIC807. Estas moléculas de ADN pueden combinarse ya sea a través de la transformación directa o mediante cría, o una combinación de las mismas, para producir líneas de plantas híbridas o elite que demuestran mayor resistencia a *Lygus*.

Se prefiere la combinación de una proteína o proteínas insecticidas con uno o más ARN bicatenario, todos independientemente activos contra una plaga de Hemípteros tal como *Lygus*, ya que proporciona dos modalidades de acción diferentes (manejo de resistencia), y da como resultado efectos sinérgicos inesperados que no se observan con la proteína insecticida por sí sola, el ARN bicatenario por sí solo, o con las combinaciones de dos proteínas insecticidas diferentes, ambas activas contra una plaga de Hemípteros, o combinaciones de dos ARNbc diferentes, ambos activos contra una plaga de Hemípteros. Además, el espectro de resistencia de la planta de cultivo pudo ampliarse para contener resistencia a clases adicionales de plagas de insectos tales como plagas de Coleópteros, Lepidópteros o Dípteros además de una plaga de Hemípteros tal como *Lygus* utilizando tanto la expresión de proteínas de toxinas de insectos como moléculas de ARN bicatenario dentro de la planta.

Para un control de plagas Lepidópteras y plagas Hemípteras en una planta transgénica, pueden obtenerse plantas que expresan tanto una proteína TIC807 como una o más proteínas activas contra plagas Lepidópteras. Los procedimientos para obtener plantas transgénicas que expresan proteínas activas contra Lepidópteros tales como proteínas Cry1A (Patente de Estados Unidos N° 5880275), Cry1B (Solicitud de Patente de los Estados Unidos N.º 10/525318), Cry1C (Patente de Estados Unidos N° 6033874), Cry1F, quimeras Cry1A/F (Patentes de los Estados Unidos N.º 7070982, 6962705, y 6713063), y una proteína Cry2Ab (Patente de Estados Unidos N° 7064249) están bien caracterizados. Las plantas que expresan tanto una proteína TIC807 como una proteína activa contra Lepidópteros pueden obtenerse cruzando plantas transgénicas individuales que expresan TIC807 o la o las proteínas de Lepidópteros. Como alternativa, los vectores de transformación de plantas que proporcionan la expresión de tanto TIC807 o una o más proteínas activas contra Lepidópteros pueden utilizarse para transformar plantas.

Ejemplo 14. Toxicidad de preparaciones de esporas cristalinas purificadas de TIC807 hacia *Lygus hesperus*.

La toxicidad de TIC807 hacia *Lygus hesperus* también se analizó utilizando una preparación de esporas cristalinas purificadas. Los cristales paraesporales que contenían la proteína TIC807 se purificaron parcialmente mediante centrifugación con gradiente de sacarosa. Una preparación de esporas-cristales concentrada 10X de la proteína TIC807 se trató con Benzonase™ (Novagen; muestra de 10 U/ml) para reducir la viscosidad de la muestra. La muestra tratada se dejó asentar durante toda la noche a 4 °C. Se prepararon gradientes de sacarosa en tubos Ultraclear™ o Polyclear™ adecuados para un rotor SW28: etapas de 10 ml de 79 %, 70 % y 55 % de sacarosa en Tris-HCl 10 mM, EDTA 0,1 mM, Triton X-100 0,005 % (pH 7). Se cargaron aproximadamente 6-7 ml de muestra por gradiente (tubos llenados hasta 0,635 cm (1/4 de pulgada) desde la parte superior). Los gradientes se realizaron a 18K durante la noche (16-18 horas) en un rotor SW28 a 4°C. Los cristales se sacaron de la interfase de 55-70 % o de la interfase de 70-79 %. Los cristales se diluyeron al menos 5 veces en tampón de gradiente y se sedimentaron mediante centrifugación (por ejemplo, 8K durante 20 min. a 4 °C). Los sedimentos de cristales se resuspendieron en tampón y se examinaron bajo un microscopio de contraste de fases para evaluar la contaminación de esporas. Los cristales purificados se trataron posteriormente con CAPS 50 mM -NaOH (pH 11) y se incubaron a 37 °C hasta que la suspensión se aclaró. La proteína solubilizada se dializó contra carbonato sódico 25 mM, NaCl 10 mM (pH 8,0), cargado en una columna Q-Sepharose equilibrada con el mismo tampón, y se eluyó utilizando un gradiente de NaCl de 10 mM-500 mM lineal. La proteína eluida se dializó contra carbonato sódico 25 mM (pH 8,5). Se juzgó que la proteína era altamente purificada por análisis de SDS-PAGE. Se observó que esta preparación de proteína TIC807 causaba mortalidad y atrofia (reducción de masa) significativos de ninfas de *Lygus hesperus* en el ensayo de alimentación cuando se comparó con el control sin tratar y se presentan en las Tablas 9 y 10 que aparecen a continuación.

Tabla 9. Puntuación de atrofia con TIC807 para la chinche opaca de las plantas (WTPB), *Lygus hesperus*

Tratamiento	concentración (mg/ml)	N	Atrofia Media	Desviación Típica	P> t
UTC	0	8	0	0	
TIC807	0,05	5	2,0	0	<0,0001

Tabla 10. Puntuaciones del porcentaje de mortalidad por TIC807 para la chinche opaca de las plantas (WTPB), *Lygus hesperus*

Tratamiento	Concentración (mg/ml)	N	% Medio de mortalidad	Desviación Típica	P> t
UTC	0	8	0	0	
TIC807	0,05	5	39,0	16,7	0,0003

Se obtuvieron resultados similares en ensayos de alimentación con *Lygus lineolaris*.

5 Ejemplo 15. Síntesis de genes adicionales que codifican una proteína TIC807 que están diseñados para la expresión en plantas

Se diseñaron y se sintetizaron secuencias de nucleótidos adicionales que codifican una proteína TIC807. Estas regiones codificadoras no nativas diseñadas para la expresión en plantas son proporcionadas aquí como SEQ ID NO: 44 a SEQ ID NO: 53. Las secuencias codificadoras presentadas como SEQ ID NO: 44 a SEQ ID NO: 53 son caracterizadas por un contenido A+T más bajo que la región codificadora de TIC807 nativa que fue derivada de *Bacillus thuringiensis*, eliminando regiones del gen TIC807 nativo que son ricas en A+T y reemplazando aquellas con secuencias que tienen menos cantidad de restos A+T. SEQ ID NO: 44 es la región codificadora de TIC807 nativa con el codón de inicio de Metionina iniciador cambiado del codón de inicio bacteriano de "TTG" al codón de inicio de planta, "ATG".

15 Ejemplo 16: Casetes de expresión adicionales para la expresión de una Proteína TIC807 en células de plantas transgénicas o plantas transgénicas

Un séptimo casete de expresión direccionado al plastidio comprende un promotor CaMV35S mejorado que está ligado operativamente a una secuencia guía no traducida en 5' derivada del gen Hsp17.9 de *Glycine max* el cual está ligado operativamente a una región codificadora que comprende una secuencia codificadora del péptido del cloroplasto de *Arabidopsis* shkG N terminal (es decir, CTP2) fusionada en fase a una secuencia codificadora de TIC807 no nativa (SEQ ID NO: 6). La secuencia peptídica de la proteína de fusión CTP2-TIC807 codificada por esta construcción se proporciona como SEQ ID NO: 8. Esta región codificadora está ligada operativamente a un sitio de poliadenilación de CaMV35S 3' terminal (T-35S). La secuencia de este casete de expresión 5'-e35S-Hsp17.9-CTP2-TIC807-T-35S-3' direccionado se proporciona como SEQ ID NO: 54.

Un octavo casete de expresión comprende un promotor CaMV35S mejorado que está ligado operativamente a una secuencia guía no traducida en 5' derivada del gen Hsp17.9 de *Glycine max* el cual está ligado operativamente a una región codificadora que comprende una secuencia que codifica TIC807 no nativa (SEQ ID NO: 6). La secuencia peptídica de la proteína TIC807 codificada por esta construcción se proporciona como SEQ ID NO: 5. Esta región codificadora está ligada operativamente a un sitio de poliadenilación de CaMV35S 3' terminal. La secuencia de este casete de expresión 5'-e35S-Hsp17.9-TIC807-T-35S-3' se proporciona como SEQ ID NO: 55.

Un noveno casete de expresión direccionado al plastidio comprende un promotor de Badnavirus de la caña de azúcar (ScBV) (Patente de los Estados Unidos N.º 5.994.123) que está ligado operativamente a una secuencia guía no traducida en 5' derivada del gen Hsp17.9 de *Glycine max* el cual está ligado operativamente a una región codificadora que comprende una secuencia codificadora del péptido del cloroplasto *Arabidopsis* shkG N-terminal (es decir, CTP2) fusionada en fase a una secuencia codificadora de TIC807 no nativa (SEQ ID NO: 6). La secuencia peptídica de la proteína de fusión CTP2-TIC807 codificada por esta construcción se proporciona como SEQ ID NO: 8. Esta región codificadora está ligada operativamente a un sitio de poliadenilación de CaMV35S 3' terminal. La secuencia de este casete de expresión 5'-P-ScBV-Hsp17.9-CTP2-TIC807-T-35S-3' direccionado se proporciona como SEQ ID NO: 56.

Un décimo casete de expresión comprende un promotor del Badnavirus de la Caña de Azúcar (ScBV) que está ligado operativamente a una secuencia guía no traducida en 5' derivada del gen Hsp17.9 de *Glycine max* el cual está ligado operativamente a una región codificadora que comprende una secuencia codificadora de TIC807 no nativa (SEQ ID NO: 6). La secuencia peptídica de la proteína TIC807 codificada por esta construcción se proporciona como SEQ ID NO: 5. Esta región codificadora está ligada operativamente a un sitio de poliadenilación de CaMV35S 3' terminal. La secuencia de este casete de expresión 5'-P-ScBV-Hsp17.9-TIC807-T-35S-3' se proporciona como SEQ ID NO: 57.

Ejemplo 17. Construcción de vectores de transformación mediada por *Agrobacterium* adicionales que contienen Casetes de Expresión de TIC807 y transferencia a *Agrobacterium*

Para construir vectores de transformación mediada por *Agrobacterium*, los casetes de expresión de TIC807 son clonados en vectores adecuados entre las secuencias límite de *Agrobacterium* de modo que serían transferidos al genoma de una célula vegetal huésped por huéspedes *Agrobacterium* que contienen los vectores construidos junto

con un gen marcador seleccionable. Más específicamente, el fragmento de restricción que contiene el casete de expresión 5'-e35S-Hsp17.9-CTP2-TIC807-T-35S-3' entero (SEQ ID NO: 54) es clonado en un vector de transformación de planta de *Agrobacterium* para obtener pMON105863 (Figura 2). Similarmente, el fragmento de restricción que contiene el casete de expresión 5'-e35S-Hsp17.9-TIC807-T-35S-3' entero (SEQ ID NO: 55) es clonado en un vector de transformación de planta *Agrobacterium* para obtener pMON105864 (Figura 3). Para la expresión utilizando un promotor diferente, el fragmento de restricción que contiene el casete de expresión 5'-P-ScBV-Hsp17.9-CTP2-TIC807-T-35S-3' entero (SEQ ID NO: 56) es clonado en un vector de transformación vegetal de *Agrobacterium* para obtener pMON78892 (Figura 4). Similarmente, el fragmento de restricción que contiene el casete de expresión 5'-P-ScBV-Hsp17.9-TIC807-T-35S-3' entero (SEQ ID NO: 57) es clonado en un vector de expresión de planta de *Agrobacterium* para obtener pMON78893 (Figura 5). Los vectores que contienen los casetes de expresión de TIC807 (es decir, casete no direccionado de SEQ ID NO: 55 y SEQ ID NO: 57 y casete direccionado de SEQ ID NO: 54 y SEQ ID NO: 56) son introducidos en *Agrobacterium* por electroporación o por apareamiento triparental.

Los vectores de transformación de plantas binarios contienen un marcador seleccionable (indicado como "Marcador Seleccionable" en las figuras 2 a 5) para la selección de células de plantas transformadas utilizando el antibiótico Kanamicina. La selección de antibióticos utilizando Espectinomicina se utiliza para la selección bacteriana. Esto es indicado como "SPC/STR" en las figuras 2 a 5 que está compuesto por un promotor para Tn7 adeniltransferasa, la región codificadora para un gen que codifica 3" (9)-0-aminoglucósido adeniltransferasa (AAD) derivado de *Staphylococcus aureus* y la región terminadora de la transcripción de Tn7 adeniltransferasa que confiere resistencia a espectinomicina y estreptomina. Dos orígenes de replicación bacteriana son incluidos en cada plásmido, un origen de replicación para la replicación de *Agrobacterium tumefaciens* (indicada como "Ec.oriV-RK2" en las figuras 2 a 5) y un origen de replicación en *Escherichia coli* (indicado como "Ori-322" en las figuras 2 a 5). Una región codificadora de *Escherichia coli* que codifica un cebador represor utilizado en conjunto con el origen de replicación de *E. coli* se indica como "Ec.rop" en las figuras 2 a 5. Los bordes izquierdo y derecho utilizados para la integración estable del T-ADN en el genoma de la planta son indicados como "LB" y "RB", respectivamente en las figuras 2 a 5. La Figura 5 también muestra un casete de expresión adicional utilizado en el cual la proteína de toxina TIC128 (PCT US 2006/033867) es expresada y es etiquetada, "Casete de Expresión de TIC128" en la Figura 5.

Ejemplo 18. Ensayos en planta adicionales de TIC807 en Tejido Calloso

Este ejemplo ilustra ejemplos adicionales de expresión en planta de TIC807 para bioensayos contra *Lygus* y otras plagas de insectos que perforan y/o succionan los fluidos de las células y de los tejidos de las plantas.

Células de alfalfa, algodón, canola, soja o maíz son transformadas utilizando los casetes de expresión de TIC807 en los vectores de transformación de TIC807 descritos en los ejemplos precedentes. Estos casetes de expresión proporcionan el direccionamiento de TIC807 hacia el cloroplasto (es decir, con el casete de expresión 5'-e35S-Hsp17.9-CTP2-TIC807-T-35S-3' o 5'-P-ScBV-Hsp17.9-CTP2-TIC807-T-35S-3') o la expresión no direccionada (citoplásmica) de TIC807 (es decir, con los casetes de expresión 5'-e35S-Hsp17.9-TIC807-T-35S-3' o 5'-P-ScBV-Hsp17.9-TIC807-T-35S-3'). Los vectores de transformación proporcionan un marcador seleccionable, en este caso para la selección para resistencia a kanamicina en tejido de planta transformado. Las células transformadas se seleccionan para determinar la resistencia a kanamicina y se regeneran en plantas transgénicas. Se permite que las plagas de insectos tales como ninfas de *Lygus* luego se alimenten cuando la planta ha alcanzado un nivel suficiente de madurez, tal como cuando las hojas han crecido hasta un tamaño que permite el uso de una barrera física para prevenir el escape de *Lygus*. La barrera para prevenir el escape de las ninfas de *Lygus* puede ser cualquier dispositivo disponible en el mercado o preparado de forma casera que permita el contacto de las ninfas de *Lygus* con el tejido de hoja y que permita al insecto sondear y alimentarse del tejido vascular de la hoja. Jaulas de clips similares a aquellas descritas por Mowry (1993) (J. Agric. Entomol.10:181-184) serían suficientes para contener las ninfas de *Lygus* para la alimentación. Las ninfas de *Lygus* son así presentadas con el tejido de hoja de plantas transgénicas que expresan la proteína TIC807 o con tejido de hoja control que no expresa la proteína TIC807. El tejido de hoja control es idealmente proporcionado por una planta transgénica que se seleccionó y se regeneró en paralelo aunque no contiene un transgén que codifica TIC. Sin embargo, también puede utilizarse tejido de hoja de otras plantas de origen y edad similares siempre y cuando el tejido no contenga cantidades significativas de proteína TIC807. Luego se determinan los resultados de mortalidad y atrofia con respecto a la muerte de fondo que se producirá de aquellos insectos que no se alimentan del tejido de la hoja para obtener una puntuación ajustada. Las puntuaciones ajustadas para las ninfas de *Lygus* presentadas con el tejido de hoja transformado de TIC807 se comparan con las puntuaciones ajustadas para las ninfas de *Lygus* presentadas con el tejido de hoja control. Las puntuaciones para la mortalidad y/o atrofia para las ninfas de *Lygus* a las que se ha presentado el tejido de hoja transformado de TIC807 son aumentados significativamente con relación a las puntuaciones para las ninfas de *Lygus* a las que se ha presentado el tejido de hoja control.

Ejemplo 19: Ensayo en planta de TIC807 en Tejido de Hojas de Lechuga

Las células de lechuga son transformadas utilizando los casetes de expresión de TIC807 en los vectores de transformación de TIC807 descritos en los ejemplos precedentes. Estos casetes de expresión proporcionan el direccionamiento de TIC807 hacia el cloroplasto (es decir, con los casetes de expresión 5'-e35S-Hsp17.9-CTP2-TIC807-T-35S-3' o 5'-P-ScBV-Hsp17.9-CTP2-TIC807-T-35S-3') o la expresión no direccionada (citoplásmica) de

TIC807 (es decir, con los casetes de expresión 5'-e35S-Hsp17.9-TIC807-T-35S-3' o 5'-P-ScBV-Hsp17.9-TIC807-T-35S-3'). Los vectores de transformación proporcionan un marcador seleccionable, en este caso para la selección de resistencia a kanamicina en tejido de planta transformado. Las células transformadas son seleccionadas para determinar la resistencia a kanamicina y son regeneradas en plantas transgénicas.

- 5 Las semillas de lechuga son esterilizadas en la superficie durante 20 minutos en solución de hipoclorito sódico al 1,2 % seguido por 3 lavados en agua desionizada esterilizada. Las semillas se dejan secar durante la noche en una placa de Petri en una campana de flujo laminar. Las semillas son luego colocadas en placas en 100 ml de sales de Hoagland 0,5X (véase la Tabla 11 a continuación) en bandejas Phytatrays (Sigma, St. Louis, MO, Catálogo n.º: P1552) a una densidad de 60 semillas/bandeja. Las semillas son cultivadas bajo la luz a 22 hasta 23 grados Celsius
- 10 durante 4 a 5 días con un fotoperiodo de 16 horas. Se prepara *Agrobacterium* transformada con el vector de transformación de planta de interés por inoculación de 10 ml de medio líquido de Manitol-Glutamato/Luria con 100 microlitros de suspensión bacteriana. El medio está compuesto por los siguientes ingredientes:

Caldo LB, Miller (Difco #044-017-3)	12,5 g
Manitol	5,0 g
glutamato monosódico (ácido glutámico)	1,16 g
KH ₂ PO ₄	0,25 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,10 g
Biotina	0,001 g
Volumen total	1000 ml
pH hasta 7,00 y autoclave	

- 15 El cultivo líquido se incuba en un agitador giratorio a 28 grados Celsius durante 24 horas. Se diluyen cinco mililitros de los primeros cultivos durante la noche con 15 mililitros de medio de Extracto de Levadura de Triptona complementado con 40 mg/l de Acetosiringona (5 gramos de Triptona, 3 gramos de Extracto de Levadura y 20 ml de 2 mg/ml de Acetosiringona en volumen total de 1000 ml, pH 5,5 y se esterilizó por autoclave). Luego, esto se dejó
- 20 incubar en un agitador giratorio a 28 grados Celsius durante 24 horas en la oscuridad con 50 mg/l de kanamicina y 100 mg/l de espectinomicina. Un ml de cultivo durante la noche se agrega a 19 mililitros de medio de Extracto de Levadura Triptona y la densidad óptica de 600 nm de longitud de onda del cultivo se ajusta a 0,08 hasta 0,09.

- 25 Los cotiledones de plántulas de lechuga se cortan tanto en la base como en la punta y se empapan en el medio diluido de *Agrobacterium* durante 15 minutos. Luego, los cotiledones se colocan en placas en medio MSO-C sin transferencia y se mantienen a 22 hasta 23 grados Celsius con un fotoperiodo de 16 horas. Las placas se sellan con cinta microporosa. Después de 48 horas, los cotiledones se transfieren a medio MSO-I en placas de Petri de 100 mm X 25 mm. Los explantes son posteriormente subcultivados a 7 y 14 días a medio MSO-I. A medida que los brotes se desarrollan, se cortan y se transfieren a medio MSO-SE. Los brotes se transfieren después de la
- 30 elongación a bandejas Phytatrays que contienen 100 ml de medio MSO-SE. Después de 6 a 8 semanas, los brotes en desarrollo se transfieren a cajas Magenta que contienen 100 ml de medio MSO-R. En 7 a 14 días de incubación a 23 grados Celsius, las raíces comenzarán a desarrollarse. Luego, los brotes se transfieren a macetas de 7,6 cm (3 pulgadas) que contienen tierra y se dejan crecer. La composición de los medios de MSO se muestra en la tabla 11.

Tabla 11. Componentes del medio MSO.

Ingredientes	Sal de Hoagland 0,5 X	MSO-C	MSO-I	MSO-SE	MSO-R
Sales MSO (sales mínimas)		34,6 g	34,6 g	34,6 g	34,6 g
Sal de Hoagland	0,8 g				
Ácido naftalenacético (1 mg/ml)		0,1 ml	0,1 ml	0,05 ml	
Benciladenina (1 mg/ml)		0,1 ml	0,1 ml	0,01 ml	
Acetosiringona (2 mg/ml)		20 ml			
Kanamicina (50 mg/ml)			2 ml	2 ml	2 ml
Carbenicilina (250 mg/ml)			2 ml	2 ml	2 ml
Agar de calidad para cultivo tisular	7,5 g	7,5 g	7,5 g	8 g	8 g
Volumen total	1000 ml	1000 ml	1000 ml	1000 ml	1000 ml
pH		5,7	5,7	5,7	5,7

Las plantas transgénicas son auto-fertilizadas y se deja que produzcan semilla o se utilizan directamente para ensayos. Las hojas de las plantas de lechuga transformadas se utilizan en un sistema de cultivo para ensayar contra *Lygus*. Se agregan diez mililitros de medio de crecimiento de planta estéril (Murashige y Skoog, vitaminas B5 Gamborg, 3 % de sacarosa y 1,5 % de agar) mientras que está en estado líquido a tubos cónicos estériles de polipropileno de 50 mililitros. El medio se deja enfriar y se endurece en condiciones estériles. Una vez endurecido, un divisor de espuma circular estéril, aproximadamente del diámetro del tubo que contiene un pequeño orificio en el medio se coloca sobre el medio de crecimiento de plantas. Las hojas jóvenes de lechuga se cortan con una navaja de afeitar estéril y se enjuagan en agua desionizada estéril, dejando una porción del pecíolo unida a la hoja. El pecíolo de la hoja de lechuga cortada se inserta a través del orificio y se deja que entre en contacto con el medio. Se agregan diez ninfas de *Lygus* recientemente nacidas (<12 horas después de nacer) al tubo y se utiliza un tapón de espuma para cerrar el tubo para permitir el intercambio de gases. El tubo se guarda en un incubador fijado a 25 grados Celsius con un fotoperiodo de 14:10 día:noche. Luego se determinan las puntuaciones de mortalidad y atrofia con respecto a la muerte de fondo que se producirá de aquellos insectos los cuales no se pueden alimentar del tejido de hoja para obtener una puntuación ajustada. Las puntuaciones ajustadas para las ninfas de *Lygus* presentadas con el tejido de hoja transformado con TIC807 se comparan con las puntuaciones ajustadas para las ninfas de *Lygus* a las que se les presenta el tejido de hoja control. Los resultados para la mortalidad y/o la atrofia para las ninfas de *Lygus* a las que se les presenta el tejido de hoja transformado con TIC807 son aumentados significativamente con relación a las puntuaciones para las ninfas de *Lygus* a las que se les presenta el tejido de hoja control.

Ejemplo 20: Expresión de TIC807 en Lechuga transgénica y demostración de toxicidad en planta

Este ejemplo demuestra la toxicidad para *Lygus hesperus* de la proteína TIC807 cuando se expresa en plantas de Lechuga. Las plantas de lechuga se transformaron con el vector de transformación de plantas, pMON105863 el cual contiene el casete de expresión de TIC807, 5'-e35S-Hsp17.9-CTP2-TIC807--T-35S-3' (SEQ ID NO: 54) mediante el procedimiento descrito en el Ejemplo 18. Una línea control de lechuga se transformó utilizando un vector control en el cual solamente el casete de selección para transformación estaba contenido. Se produjo la semilla F1 de las plantas transformadas. Las plantas se cultivaron de la semilla F1 y se muestrearon para la expresión de la proteína TIC807. Los niveles de expresión proteica se determinaron para la descendencia F1 utilizando procedimientos ELISA convencionales y anticuerpo policlonal de TIC807. Las plantas se seleccionaron para ensayos con *Lygus hesperus* basándose en los niveles de expresión de la proteína TIC807. Se sacaron muestras de hojas de descendencia F1 seleccionada y se ensayaron para determinar la toxicidad en *Lygus hesperus* utilizando el procedimiento de ensayo descrito en el Ejemplo 18. Los datos de las líneas de lechuga transgénicas seleccionadas se presentan en la Tabla 12. Los eventos de las líneas A028 y A055 dieron mejores resultados de forma significativa que el control (es decir, la línea de lechuga no transformada SVR3606). El análisis general de las líneas que expresan la proteína TIC807 demostró una mortalidad significativa con relación a las plantas transformadas controles.

Tabla 12. Media \pm error típico del porcentaje de mortalidad de *Lygus hesperus* en hojas de lechuga transformadas con TIC807 de 15 ninfas teneales infestadas (n = 16) seis días después de la infestación.

Evento	Concentración de TIC807 (ppm)	Porcentaje de Mortalidad
A028	43,22	67,71 \pm 5,55 $P \geq 0,05$
A055	41,62	62,08 \pm 5,83 $P \geq 0,05$
A035	30,77	51,04 \pm 2,73
A002	33,02	50,00 \pm 5,51
A059	42,90	48,96 \pm 2,83
Control	0,00	28,33 \pm 2,15

Ejemplo 21: TIC807 es tóxica para el Escarabajo de las Patatas de Colorado

Este ejemplo ilustra la toxicidad de las moléculas de toxinas de insectos TIC807 hacia los coleópteros, el escarabajo de las patatas de Colorado (CPB), *Leptinotarsa decemlineata*. Los bioensayos con CPB se llevaron a cabo utilizando una dieta artificial que consiste en agar 13,2 g/l (Serva 11393), premezcla Bio-Serve 140,3 g/l (Bio-Serve, Frenchtown, NJ Catálogo N.º F9380B), Hidróxido de potasio 5 ml/l (18,3 % p/p) y formalina 1,25 ml/l (37 %). La dieta se dispuso en alícuotas de 200 microlitros en pocillos de una placa de 96 pocillos y se secó poco antes de la aplicación de la muestra. Se aplicaron veinte microlitros de muestra de ensayo por pocillo, sirviendo el agua estéril como el control sin tratar (UTC). Las placas se dejaron secar antes del agregado de las larvas de insectos. Se agregó una larva de CPB neonato por pocillo con un pincel para pintar fino. Las placas se sellaron con mylar y se ventilaron utilizando un alfiler para insectos. Se analizaron cuarenta larvas por tratamiento. Las placas de bioensayo se incubaron a 27 grados Celsius con 60 % de humedad relativa en oscuridad completa durante 10 a 12 días. Las

placas se calificaron para determinar la mortalidad de las larvas. Los datos se analizaron utilizando un programa informático estadístico JMP® 4 (SAS Institute, Cary, NC). TIC807 demostró mortalidad cuando se dio como alimento al CPB. En la Tabla 13 se presentan los resultados del porcentaje medio de mortalidad para TIC807.

- 5 Por lo tanto, se contempla que las proteínas TIC807 de la invención pueden utilizarse para controlar insectos Coleópteros. Los insectos Coleópteros controlados por proteínas TIC807 de la invención, incluyen el escarabajo de las patatas de Colorado, el gusano alambre y el picudo del algodonero.

Tabla 13. Resultados del porcentaje de mortalidad con TIC807 para el escarabajo de las patatas de Colorado (CPB), *Leptinotarsa decemlineata*.

Tratamiento	concentración (mg/ml)	N	% Medio de mortalidad	Desviación Típica	P> t
UTC	0	3	13,10	1,03	
TIC807	0,5	3	68,45	23,03	0,0142

10 **Ejemplo 22: Transformación de Algodón con TIC807 y ensayo de toxinas utilizando plantas de algodón enteras.**

Se transforman células de algodón con construcciones que contienen un gen de interés que codifica la proteína TIC807. En este caso, las secuencias de ácidos nucleicos con rediseño de codón que codifican la proteína TIC807 son expresadas en células de algodón que utilizan los casetes de expresión de TIC807 en los vectores de transformación de TIC807 descritos en los ejemplos que anteceden. Estos casetes de expresión proporcionan el direccionamiento de la proteína TIC807 hacia el cloroplasto (es decir, con los casetes de expresión, 5'-e35S-Hsp17.9-CTP2-TIC807-T-35S-3' encontrado en pMON105863 o 5'-P-ScBV-Hsp17.9-CTP2-TIC807-T-35S-3' encontrado en pMON78892) o la expresión no direccionada (citoplásmica) de la proteína TIC807 (es decir, con los casetes de expresión, 5'-e35S-Hsp17.9-TIC807-T-35S-3' encontrado en pMON105864 o el 5'-P-ScBV-Hsp17.9-TIC807-T-35S-3' encontrado en pMON78893). Los vectores de transformación proporcionan un marcador seleccionable, en este caso para la selección de resistencia a kanamicina en tejido de planta transformado. Puede utilizarse ya sea el vector pMON105863 (Figura 2), el vector pMON105864 (Figura 3) o el vector pMON78892 (Figura 4) o el vector pMON78893 (Figura 5) u otros vectores de expresión de planta de TIC807 equivalentes que contienen casetes de expresión de plantas de TIC807 y un marcador seleccionable.

Los bioensayos en plantas que expresan la molécula de toxina TIC807 pueden llevarse a cabo utilizando un ensayo en ramas del algodón cerrado. Las plantas de algodón son cultivadas hasta una etapa temprana de floración donde están disponibles varias ramas de frutos que contienen cuadrados (es decir, flores de algodón inmaduras). Se preparan manguitos utilizando láminas de plástico respirables (Vilutis and Co. Inc., Frankfort, IL). Los manguitos se preparan utilizando una espátula calentadora provisional de fotografía o de artesanía fina convencional para crear una costura que produce una bolsa con una dimensión aproximada de 12,7 cm (5 pulgadas) X 12,7 cm (5 pulgadas) X 30,5 cm (12 pulgadas) de longitud. Las ramas terminales que incluyen por lo menos un cuadrado de pre-floración y una hoja de terminal desplegada se insertan en el extremo abierto del manguito. Como alternativa, las bolsas pueden disponerse para contener vainas u otros tejidos si se desea. La bolsa se cierra alrededor de la rama utilizando un cordón para cierre. Las hojas y los cuadrados debajo del tejido encerrado deseado pueden retirarse para facilitar una fijación más segura con el cordón para cierre. El otro extremo del manguito se deja abierto para permitir la infestación de insectos. Las ninfas de *Lygus* se recogen con una aspiradora y 4 ninfas se colocan en un frasco con tapa de 2 dracmas. Se registra la masa inicial de las ninfas para cada frasco que contiene las ninfas. El tubo se tapa suavemente para asegurar que las ninfas estén en el fondo del tubo y se retira la tapa del tubo. El tubo se coloca dentro del manguito exponiendo las ninfas al tejido de la planta de algodón. El extremo abierto del manguito se cierra luego utilizando un cordón de cierre. Los insectos se dejan en los manguitos y se deja que se alimente con el material de planta de algodón encerrado durante una cantidad especificada de días. Tras el tiempo especificado, se retiran las ramas del algodón. Los manguitos son abiertos cuidadosamente para contar las ninfas supervivientes. Todas las ninfas se recogen y se pesan. Luego se determinan las puntuaciones de mortalidad y atrofia con respecto a las plantas controles no transformadas. Las puntuaciones ajustadas para las ninfas de *Lygus* presentadas con el tejido de algodón transformado con TIC807 se comparan con las puntuaciones ajustadas para las ninfas de *Lygus* a las que se les presenta tejido de algodón control que carece de la proteína TIC807. Los resultados para la mortalidad y/o atrofia para las ninfas de *Lygus* a las que se les presenta el tejido de algodón transformado con TIC807 son aumentados significativamente con relación a las puntuaciones para las ninfas de *Lygus* a las que se les presenta el tejido del algodón control.

50 **Ejemplo 23: Combinación de la toxina de TIC807 con algodón sin nectarias**

Este ejemplo ilustra el uso del fenotipo sin nectarias del algodón en combinación con la expresión de la proteína TIC807 para proporcionar un mayor control de una plaga de insecto. La falta de nectarias ha sido identificada como procedente de la homocigosis para mutaciones recesivas en dos lugares por duplicado en *Gossypium*

tomentosum (Meyer y Meyer, 1961, Crop Science, 1: 167–169). Los cruces con *Gossypium hirsutum* con *Gossypium tomentosum* demostraron una reducción significativa en poblaciones de gusanos medidores del repollo y gusanos de las hojas del algodón en experimentos en jaulas con relación a variedades comunes de algodón en las cuales están presentes nectarinos florales (Lukefahr y Rhyne, 1960, Econ. Entomol. 53: 242–244). Esto es supuestamente el resultado directo de las líneas de algodón sin nectarías que son menos apetitosas para la plaga de insectos así como también la falta de alimento proporcionado por los néctares. Los múltiples mecanismos de resistencia pueden ser particularmente cruciales en especies *Gossypieae* puesto que los nectarios extraflorales pueden atraer directamente a ciertas especies herbívoras. Los nectarios extraflorales en algodón cultivado pueden aumentar la abundancia de o aumentar el daño por diversas plagas de los cultivos que incluyen lepidópteros y chinches de las plantas (Trelease, 1879, Nectar; what it is, and some of its uses. In J. H. Comstock [ed.], Report upon cotton insects, 319–343. U.S. Department of Agriculture Publication, U.S. Government Publication Office, Washington, D.C., Estados Unidos. Lukefahr y Rhyne, 1960; Lukefahr y col., 1960, Journal of Econ Entom 53: 516–518; Benschoter y Leal, 1974, Journal of Econ Entom 67: 217–218; Schuster y col., 1976, Journal of Econ Entom 69: 400–402; Wilson y Wilson, 1976, Journal of Econ Entom 69: 623–624; Henneberry y col., 1977, Journal of Econ Entom 70: 797–799; Adjei-Maafa y col., 1983, Environ Entom 12: 353–358; Beach y col., 1985, Journal of Entomological Science 20: 233–236; Smith, 1992, Advances in Agronomy 48: 251–296; Summy y King, 1992, Crop Protection 11: 307–319), principalmente debido a que los adultos de estos grupos taxonómicos consumen néctar extrafloral.

Las líneas producidas por cruces de *G. hirsutum* con *G. tomentosum* se seleccionan para determinar la presencia del fenotipo sin nectarías y características agrónomas favorables. Las líneas obtenidas del germoplasma comercial Stoneville 825 pueden utilizarse como una fuente de germoplasma que comprende el fenotipo sin nectarías. Las líneas sin nectarías seleccionadas son luego transformadas con un casete de expresión que codifica una proteína TIC807, las proteínas TIC809/TIC810, la proteína TIC128 o combinaciones de las mismas, o cualquier otra molécula de toxina dirigida hacia una plaga de algodón en la cual la presencia de nectarías actúa como un atrayente para la plaga de insectos. Insertos de transgenes que comprenden un casete de expresión que codifica ya sea una proteína TIC807, las proteínas TIC809/TIC810, la proteína TIC128 o sus combinaciones, o cualquier otra molécula de toxina dirigida a una plaga de algodón en la cual la presencia de nectarías actúa como un atrayente a la plaga de insectos se pueden obtener en cualquier germoplasma de algodón adecuado y luego se pueden someter a introgresión en líneas producidas por cruces de *G. hirsutum* con *G. tomentosum* que se han seleccionado para determinar la presencia del fenotipo sin nectarías y características agronómicas favorables. A través de procedimientos de cría conocidos por un experto en la técnica, las líneas transformantes que expresan los fenotipos sin nectarías se seleccionan y se mantienen en generaciones posteriores para contener tanto el fenotipo sin nectarías como la molécula de toxina de insecto.

Ejemplo 24. Comparación de las proteínas TIC807 y Cry51Aa

Para identificar regiones conservadas y no conservadas de las proteínas TIC807 (SEQ ID NO: 5) y Cry51Aa (SEQ ID NO: 59), se creó una alineación de las dos proteínas utilizando ClustalW. La proteína Cry51Aa se aisló de la cepa de Bt F14-1, tiene una identidad informada de 22 % con cry15Aa, y se informa que tiene actividad contra *Bombyx mori*, un insecto lepidóptero (Huang y col., J. Invertebr. Pathol. 95 (3), 175–180, 2007). Una secuencia para el gen de cry51Aa1 (SEQ ID NO: 58) y la proteína Cry51Aa1 codificada (SEQ ID NO: 59) se presentó como el número de Acceso del GenBank del NCBI DQ836184. La comparación por ClustalW de TIC807 (SEQ ID NO: 5) y Cry51Aa1 demuestra que las dos proteínas tienen una identidad de secuencia total de aproximadamente 97,4 % en una longitud de 301 aminoácidos (véase la Figura 6 y Tabla 14). El número de Acceso del GenBank DQ836184 informa de un extremo N deducido para Cry51Aa1 que corresponde al uso de un codón de inicio ATG potencial que daría como resultado un producto de traducción primario de 309 aminoácidos. En contraste, la proteína TIC807 tiene un extremo amino distinto basándose en una secuencia peptídica N-terminal de proteína TIC807 aislada que se determinó por degradación Edman (véase el Ejemplo 2 y SEQ ID NO: 1). Un codón de metionina iniciador de TTG de SEQ ID NO: 4 es aparentemente utilizado para generar la proteína TIC807 de SEQ ID NO: 5. Por consiguiente, la proteína Cry51Aa1 presentada comprende tres aminoácidos adicionales en su extremo N que no se presentan en TIC807 (SEQ ID NO: 5). En Cry51Aa1, el resto de aminoácidos correspondiente a fenilalanina 46 de TIC807 es sustituido por un resto de serina, el resto de aminoácidos correspondiente a tirosina 54 de TIC807 es sustituido por un resto de histidina, el resto de aminoácido correspondiente a serina 167 de TIC807 sustituye un resto de arginina, los restos de tres (3) aminoácidos correspondientes a histidina 199 a Serina 201 de TIC807 son deletados, y el resto de aminoácido correspondiente a serina 217 de TIC807 sustituye un resto de asparagina. Esta comparación de las proteínas TIC807 y Cry51Aa1 se muestra en la Figura 6.

Tabla 14.

N.º	Secuencia	1	2
1	TIC807 (SEQ ID NO: 5)	-	97,4 (301)
2	Cry51Aa1 (SEQ ID NO: 59)	97,4 (301)	-

Aunque la proteína TIC807 comparte identidad de secuencia significativa con la proteína Cry51Aa1, la proteína TIC807 no exhibía sorprendentemente nivel significativo alguno de actividad cuando se da como alimento a ciertos insectos lepidópteros. La proteína TIC807 purificada se analizó contra el barrenador europeo del maíz (ECB; *Ostrinia nubilalis*) y el gusano cogollero (TBW; *Heliothis virescens*) y no tenía actividad alguna contra cualquiera de esos insectos lepidópteros. La misma muestra de la proteína TIC807 exhibió actividad contra el Escarabajo de las Patatas de Colorado CPB aunque no contra el gusano de la raíz del maíz (CRW; *Diabroticus*). Por lo tanto, la ausencia de actividad de la TIC807 purificada contra ECB y TBW no se debe a la inactividad de la proteína TIC807 purificada.

La presente invención por lo tanto contempla proteínas TIC807 que son activas contra insectos hemípteros y coleópteros aunque son inactivas contra insectos lepidópteros. Las proteínas TIC807 de la invención pueden comprender proteínas TIC807 donde el resto correspondiente 54 de la proteína TIC807 no es una histidina, donde el resto correspondiente 167 de la proteína TIC807 no es una arginina, donde los restos de tres (3) aminoácidos correspondientes a histidina 199 a Serina 201 de TIC807 están presentes, y/o donde el resto correspondiente 217 de la proteína TIC807 no es un resto de asparagina.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Monsanto Company Baum, James A. Rao, Sukuru U Penn, Stephen Flasinski, Stanislaw Shi, Xiaohong Heck, Gregory

<120> Proteínas toxinas activas contra hemípteros de *Bacillus thuringiensis*

<130> 38-21(54839)

<140> PCT/US2008/005542

<141> 25-04-2008

<150> US 60/914.364

<151> 27-04-2007

<150> US 12/109.122

<151> 24-04-2008

<160> 59

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 25

<212> PRT

<213> *Bacillus thuringiensis*

<400> 1

Ala Ile Leu Asp Leu Lys Ser Leu Val Leu Asn Ala Ile Asn Tyr Trp
1 5 10 15

Gly Pro Lys Asn Asn Asn Glu Ile Gln
20 25

<210> 2

<211> 30

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Sintético

<400> 2

aaygcdatha aytaytgggg dccdaaraay 30

<210> 3

<211> 30

<212> ADN

ES 2 644 945 T3

	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Sintético	
5	<400> 3	
	tggggdccda araayaayaa ygaratwcar	30
10	<210> 4	
	<211> 930	
	<212> ADN	
	<213> <i>Bacillus thuringiensis</i>	
15	<400> 4	
	ttggcaattt tagatttaaa atcttttagta ctcaatgcaa taaattattg gggtcctaaa	60
	aataataatg gcatacaggg tgggtgatttt ggttacccta tatkagaaaa acaaatagat	120
	acgtctatta taactttttac tcatcctcgt ttaattocat atgatttaac aattcctcaa	180
	aatttagaaa ctattttttac tacaactcaa gtattaacaa ataatacaga ttacaacaa	240
	agtcaaaactg tttctttttgc taaaaaaaca acgacaacaa cttcaacttc aactacaaat	300
	gggttgacag aagggtgggaa aatttcagat acattagaag aaaaagtaag tgtatctatt	360
	ccttttattg gagagggagg aggaaaaaac agtacaacta tagaagctaa ttttgcacat	420
	aactctagta ctactacttt tcaacaggct tcaactgata tagagtggaa tatttcacaa	480
	ccagtattgg ttcccccag taaacaagtt gtagcaacat tagttattat gggaggtaat	540
	tttactattc ctatggattt gatgactact atagattcta cagaacatta tagccattat	600
	agtggttatc caatattaac atggatatcg agcccccata atagttatag tgggtccattt	660
	atgagttggt attttgcaaa ttggcccaat ttaccatcgg ggtttggtcc tttaaattca	720
	gataatacgg tcacttatac aggttctggt gtaagtcaag tatkagctgg tgtatatgcc	780
	actgtacgat ttgatcaata tgatatacac aatttaagga caattgaaaa aacttggtat	840
	gcacgacatg caactcttca taatggaaag aaaatatcta taaataatgt tactgaaatg	900
	gcaccaacaa gtccaataaa aacaaattaa	930
20	<210> 5	
	<211> 309	
	<212> PRT	
	<213> <i>Bacillus thuringiensis</i>	
	<400> 5	

ES 2 644 945 T3

Met Ala Ile Leu Asp Leu Lys Ser Leu Val Leu Asn Ala Ile Asn Tyr
1 5 10 15

Trp Gly Pro Lys Asn Asn Asn Gly Ile Gln Gly Gly Asp Phe Gly Tyr
20 25 30

Pro Ile Ser Glu Lys Gln Ile Asp Thr Ser Ile Ile Thr Phe Thr His
35 40 45

Pro Arg Leu Ile Pro Tyr Asp Leu Thr Ile Pro Gln Asn Leu Glu Thr
50 55 60

ES 2 644 945 T3

Ile Phe Thr Thr Thr Gln Val Leu Thr Asn Asn Thr Asp Leu Gln Gln
 65 70 75 80
 Ser Gln Thr Val Ser Phe Ala Lys Lys Thr Thr Thr Thr Thr Ser Thr
 85 90 95
 Ser Thr Thr Asn Gly Trp Thr Glu Gly Gly Lys Ile Ser Asp Thr Leu
 100 105 110
 Glu Glu Lys Val Ser Val Ser Ile Pro Phe Ile Gly Glu Gly Gly Gly
 115 120 125
 Lys Asn Ser Thr Thr Ile Glu Ala Asn Phe Ala His Asn Ser Ser Thr
 130 135 140
 Thr Thr Phe Gln Gln Ala Ser Thr Asp Ile Glu Trp Asn Ile Ser Gln
 145 150 155 160
 Pro Val Leu Val Pro Pro Ser Lys Gln Val Val Ala Thr Leu Val Ile
 165 170 175
 Met Gly Gly Asn Phe Thr Ile Pro Met Asp Leu Met Thr Thr Ile Asp
 180 185 190
 Ser Thr Glu His Tyr Ser His Tyr Ser Gly Tyr Pro Ile Leu Thr Trp
 195 200 205
 Ile Ser Ser Pro Asp Asn Ser Tyr Ser Gly Pro Phe Met Ser Trp Tyr
 210 215 220
 Phe Ala Asn Trp Pro Asn Leu Pro Ser Gly Phe Gly Pro Leu Asn Ser
 225 230 235 240
 Asp Asn Thr Val Thr Tyr Thr Gly Ser Val Val Ser Gln Val Ser Ala
 245 250 255
 Gly Val Tyr Ala Thr Val Arg Phe Asp Gln Tyr Asp Ile His Asn Leu
 260 265 270
 Arg Thr Ile Glu Lys Thr Trp Tyr Ala Arg His Ala Thr Leu His Asn
 275 280 285
 Gly Lys Lys Ile Ser Ile Asn Asn Val Thr Glu Met Ala Pro Thr Ser
 290 295 300
 Pro Ile Lys Thr Asn

305

ES 2 644 945 T3

<210> 6
<211> 930
<212> ADN
<213> Artificial

5

<220>
<223> Sintético

<400> 6

10

```

atggctatcc tagaccttaa gtccctcgtg ctgaacgcc a ttaactactg gggccctaag      60
aacaacaacg gcatccaggg cggtgacttc ggctacccca tctctgagaa gcagatcgac      120
actagcatca ttaccttcac ccaccctcgc ttgatccctt acgatcttac tatcccgag      180
aaccttgaga ccatcttcac cacaacgcag gtgctcacca ataactactga cctccagcaa      240
tcccagaccg tgagctttgc gaagaagacc actaccacga cctcaactag caccaccaac      300
ggttgacag aaggaggcaa gatcagcgac acgctggagg agaaagtctt ggtagcatt      360
ccgttcacg gtgaggggtg cgggaagaac tcgactacca tagaggccaa ctccgcacac      420
aactctagca ccactacctt ccagcaagca agcactgaca ttgagtggaa cattagccaa      480
ccggtgctgg ttctccctc taaacaagtt gtccgcaccc ttgtgatcat gggaggcaac      540
tttaccatcc ctatggactt gatgaccacg attgatagta cagagcacta ctcccactac      600
tcgggttacc ctatcctcac ctggatctcg tcccagata actcttactc cggtcctttt      660
atgtcatggt actttgcaa ctggcctaac cttccgagtg gattcggccc actgaatagt      720
gataaacacg tcacatacac tggctctgtc gtgtcccaag ttccggccgg tgtctacgct      780
accgtccggt tcgatcagta tgacattcac aatctccgta ctatcgagaa gaattggtat      840
gctcgccatg cgacgctgca taatggcaag aagatttcta tcaacaatgt caccgaaatg      900
gctccaacat ccctatcaa gacaaattga      930

```

<210> 7
<211> 1158
<212> ADN
<213> Artificial

15

<220>
<223> Sintético

20

<400> 7

atggcgcaag ttagcagaat ctgcaatggg gtgcagaacc catctcttat ctccaatctc	60
tcgaaatcca gtcaacgcaa atctccctta tcggtttctc tgaagacgca gcagcatcca	120
cgagcttata cgatttcgtc gtcgtgggga ttgaagaaga gtgggatgac gttaatggc	180
tctgagcttc gtcctcttaa ggtcatgtct tctgtttcca cggcgtgcat ggctatccta	240
gaccttaagt ccctcgtgct gaacgccatt aactactggg gccctaagaa caacaacggc	300
atccagggcg gtgacttcgg ctaccccatc tctgagaagc agatcgacac tagcatcatt	360
accttcaccc accctcgctt gatccctac gatcttacta tcccgagaa ccttgagacc	420
atcttcacca caacgcaggt gctcaccaat aactactgac tccagcaatc ccagaccgtg	480
agctttgcga agaagaccac taccacgacc tcaactagca cgaccaacgg ttggacagaa	540
ggaggcaaga tcagcgacac gctggaggag aaagtctcgg ttagcattcc gttcatcggg	600
gagggtggcg ggaagaactc gactaccata gaggccaact tcgcacacaa ctctagcacc	660
actaccttc agcaagcaag cactgacatt gagtggaaac ttagccaacc ggtgctgggt	720
cctccctcta aacaagttgt cgctaccctt gtgatcatgg gaggcaactt taccatccct	780
atggacttga tgaccaagat tgatagtaca gagcactact ccactactc cggttaacct	840
atcctcacct ggatctcgtc ccagataac tcttactccg gtccctttat gtcatggtag	900
tttgcaaact ggccataact tccgagtggg ttccggccac tgaatagtga taacacggtc	960
acatacactg gctctgtcgt gtcccaagtt tcggccgggtg tctacgctac cgtccggttc	1020
gatcagtatg acattcacia tctccgtact atcgagaaga cttggtatgc tcgccatgag	1080
acgctgcata atggcaagaa gatttctatc aacaatgtca cggaaatggc tccaacatcc	1140
cctatcaaga caaattga	1158

<210> 8
 <211> 385
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 8

ES 2 644 945 T3

Met Ala Gln Val Ser Arg Ile Cys Asn Gly Val Gln Asn Pro Ser Leu
1 5 10 15

Ile Ser Asn Leu Ser Lys Ser Ser Gln Arg Lys Ser Pro Leu Ser Val
20 25 30

Ser Leu Lys Thr Gln Gln His Pro Arg Ala Tyr Pro Ile Ser Ser Ser
35 40 45

Trp Gly Leu Lys Lys Ser Gly Met Thr Leu Ile Gly Ser Glu Leu Arg
50 55 60

Pro Leu Lys Val Met Ser Ser Val Ser Thr Ala Cys Met Ala Ile Leu
65 70 75 80

Asp Leu Lys Ser Leu Val Leu Asn Ala Ile Asn Tyr Trp Gly Pro Lys

ES 2 644 945 T3

85					90					95					
Asn	Asn	Asn	Gly	Ile	Gln	Gly	Gly	Asp	Phe	Gly	Tyr	Pro	Ile	Ser	Glu
			100					105					110		
Lys	Gln	Ile	Asp	Thr	Ser	Ile	Ile	Thr	Phe	Thr	His	Pro	Arg	Leu	Ile
		115					120					125			
Pro	Tyr	Asp	Leu	Thr	Ile	Pro	Gln	Asn	Leu	Glu	Thr	Ile	Phe	Thr	Thr
	130					135					140				
Thr	Gln	Val	Leu	Thr	Asn	Asn	Thr	Asp	Leu	Gln	Gln	Ser	Gln	Thr	Val
145					150					155					160
Ser	Phe	Ala	Lys	Lys	Thr	Thr	Thr	Thr	Thr	Ser	Thr	Ser	Thr	Thr	Asn
				165					170						175
Gly	Trp	Thr	Glu	Gly	Gly	Lys	Ile	Ser	Asp	Thr	Leu	Glu	Glu	Lys	Val
			180					185					190		
Ser	Val	Ser	Ile	Pro	Phe	Ile	Gly	Glu	Gly	Gly	Gly	Lys	Asn	Ser	Thr
		195					200					205			
Thr	Ile	Glu	Ala	Asn	Phe	Ala	His	Asn	Ser	Ser	Thr	Thr	Thr	Phe	Gln
	210					215					220				
Gln	Ala	Ser	Thr	Asp	Ile	Glu	Trp	Asn	Ile	Ser	Gln	Pro	Val	Leu	Val
225					230					235					240
Pro	Pro	Ser	Lys	Gln	Val	Val	Ala	Thr	Leu	Val	Ile	Met	Gly	Gly	Asn
				245					250					255	
Phe	Thr	Ile	Pro	Met	Asp	Leu	Met	Thr	Thr	Ile	Asp	Ser	Thr	Glu	His
			260					265					270		
Tyr	Ser	His	Tyr	Ser	Gly	Tyr	Pro	Ile	Leu	Thr	Trp	Ile	Ser	Ser	Pro
		275					280					285			
Asp	Asn	Ser	Tyr	Ser	Gly	Pro	Phe	Met	Ser	Trp	Tyr	Phe	Ala	Asn	Trp
	290					295					300				
Pro	Asn	Leu	Pro	Ser	Gly	Phe	Gly	Pro	Leu	Asn	Ser	Asp	Asn	Thr	Val
305					310					315					320
Thr	Tyr	Thr	Gly	Ser	Val	Val	Ser	Gln	Val	Ser	Ala	Gly	Val	Tyr	Ala
				325					330					335	

ES 2 644 945 T3

Thr Val Arg Phe Asp Gln Tyr Asp Ile His Asn Leu Arg Thr Ile Glu
340 345 350

Lys Thr Trp Tyr Ala Arg His Ala Thr Leu His Asn Gly Lys Lys Ile
355 360 365

Ser Ile Asn Asn Val Thr Glu Met Ala Pro Thr Ser Pro Ile Lys Thr
370 375 380

Asn
385

<210> 9
<211> 702
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 9

atggcctttct tcaacagggc tatcaccctg accgtgccta gctctgacgt ggtgaactac	60
tctgaaatct accaagttgc ccctcagtag gtgaaccagg ccctgaccct agccaagtac	120
ttccagggcg ccattgacgg tagcaccctt agattogact tcgagaaggc cctccagatc	180
gccaacgaca tcccacagggc cgctgtgggc aacaacctca accagaccgt gcagcaaggc	240
accgtgcaag tgagcgtgat gatcgacaag atcgtggaca tcatgaagaa cgtgctctcc	300
atcgtgatcg acaacaagaa attctgggac caagtgcacg ccgctatcac caacaccttc	360
accaacctca actcccagga gtccgaggct tggatcttct actacaagga ggacgcccac	420
aagacctcct actattacaa catcctcttc gccatccagg acgaggaaac aggcggtgtg	480
atggctacac tccccatcgc ttctgacatc tccgtggaca tcgagaagga gaaagtcctc	540
ttcgtcacca tcaaggacac cgagaactac gctgtcactg tcaaggctat caacgtcgtt	600
caggctctcc agtccagccg cgactccaaa gtctgtgacg ctttcaagtc tcccaggcac	660
ctccctagga agaggcacia gatttgcagc aacagctgat aa	702

<210> 10
<211> 232
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 10

ES 2 644 945 T3

Met	Ala	Phe	Phe	Asn	Arg	Val	Ile	Thr	Leu	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Asp
1				5					10					15	
Val	Val	Asn	Tyr	Ser	Glu	Ile	Tyr	Gln	Val	Ala	Pro	Gln	Tyr	Val	Asn
			20					25					30		
Gln	Ala	Leu	Thr	Leu	Ala	Lys	Tyr	Phe	Gln	Gly	Ala	Ile	Asp	Gly	Ser
		35					40					45			
Thr	Leu	Arg	Phe	Asp	Phe	Glu	Lys	Ala	Leu	Gln	Ile	Ala	Asn	Asp	Ile
	50					55					60				
Pro	Gln	Ala	Ala	Val	Val	Asn	Thr	Leu	Asn	Gln	Thr	Val	Gln	Gln	Gly
65					70					75					80
Thr	Val	Gln	Val	Ser	Val	Met	Ile	Asp	Lys	Ile	Val	Asp	Ile	Met	Lys
				85					90					95	
Asn	Val	Leu	Ser	Ile	Val	Ile	Asp	Asn	Lys	Lys	Phe	Trp	Asp	Gln	Val
			100					105					110		
Thr	Ala	Ala	Ile	Thr	Asn	Thr	Phe	Thr	Asn	Leu	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser
		115					120					125			
Glu	Ala	Trp	Ile	Phe	Tyr	Tyr	Lys	Glu	Asp	Ala	His	Lys	Thr	Ser	Tyr
	130					135					140				
Tyr	Tyr	Asn	Ile	Leu	Phe	Ala	Ile	Gln	Asp	Glu	Glu	Thr	Gly	Gly	Val
145					150					155					160
Met	Ala	Thr	Leu	Pro	Ile	Ala	Phe	Asp	Ile	Ser	Val	Asp	Ile	Glu	Lys
				165					170					175	
Glu	Lys	Val	Leu	Phe	Val	Thr	Ile	Lys	Asp	Thr	Glu	Asn	Tyr	Ala	Val
			180					185					190		
Thr	Val	Lys	Ala	Ile	Asn	Val	Val	Gln	Ala	Leu	Gln	Ser	Ser	Arg	Asp
		195					200					205			
Ser	Lys	Val	Val	Asp	Ala	Phe	Lys	Ser	Pro	Arg	His	Leu	Pro	Arg	Lys
	210					215					220				
Arg	His	Lys	Ile	Cys	Ser	Asn	Ser								
225					230										

<210> 11
 <211> 660
 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Sintético

5

<400> 11

atgagcaagg agatccgtct caacctctct cgggagtcgt gcgcggacct ctacctgaag	60
atcctggcgt tcgtcaagcc cgagcatttc ttccaggcgt acctgctttg ccgggagttc	120
gagtctatcg togatccgac tactagagag tcagatttcg ataagactct gactattgtc	180
aagtcggatt ctactctggt cactgtcggc actatgaaca ctaagctggt caactcgcaa	240
gagattctgg tctcggtatct gattactcaa gttggtagtc agattgcgga tacgctgggc	300
attacggaca ttgatgcaaa cacacagcaa caactgacag agcttatttg gaatcttttc	360
gttaatctta atagtcaagt tcaagagtac atctacttct acgaagagaa ggagaagcaa	420
acgtcatatc gttacaacat tctctttgtt ttcgagaagg aatcattcat taccatactt	480
ccaatgggat ttgatgttac ggtgaacaca aataaggaag cagttctaaa gttgacacca	540
aaggataaag ttacttatgg acacgtatca gtaaaggcac ttaatatcat tcaacttatc	600
acagaagata aattcaattt tctcgcaaca ctcaagaagg ctttgaagac cttgtgataa	660

10

<210> 12

<211> 218

<212> PRT

<213> Artificial

15

<220>

<223> Sintético

<400> 12

ES 2 644 945 T3

Met	Ser	Lys	Glu	Ile	Arg	Leu	Asn	Leu	Ser	Arg	Glu	Ser	Gly	Ala	Asp	1	5	10	15
Leu	Tyr	Leu	Lys	Ile	Leu	Ala	Phe	Val	Lys	Pro	Glu	His	Phe	Phe	Gln	20	25	30	
Ala	Tyr	Leu	Leu	Cys	Arg	Glu	Phe	Glu	Ser	Ile	Val	Asp	Pro	Thr	Thr	35	40	45	
Arg	Glu	Ser	Asp	Phe	Asp	Lys	Thr	Leu	Thr	Ile	Val	Lys	Ser	Asp	Ser	50	55	60	
Thr	Leu	Val	Thr	Val	Gly	Thr	Met	Asn	Thr	Lys	Leu	Val	Asn	Ser	Gln	65	70	75	80
Glu	Ile	Leu	Val	Ser	Asp	Leu	Ile	Thr	Gln	Val	Gly	Ser	Gln	Ile	Ala	85	90	95	
Asp	Thr	Leu	Gly	Ile	Thr	Asp	Ile	Asp	Ala	Asn	Thr	Gln	Gln	Gln	Leu	100	105	110	
Thr	Glu	Leu	Ile	Gly	Asn	Leu	Phe	Val	Asn	Leu	Asn	Ser	Gln	Val	Gln	115	120	125	
Glu	Tyr	Ile	Tyr	Phe	Tyr	Glu	Glu	Lys	Glu	Lys	Gln	Thr	Ser	Tyr	Arg	130	135	140	
Tyr	Asn	Ile	Leu	Phe	Val	Phe	Glu	Lys	Glu	Ser	Phe	Ile	Thr	Ile	Leu	145	150	155	160
Pro	Met	Gly	Phe	Asp	Val	Thr	Val	Asn	Thr	Asn	Lys	Glu	Ala	Val	Leu	165	170	175	
Lys	Leu	Thr	Pro	Lys	Asp	Lys	Val	Thr	Tyr	Gly	His	Val	Ser	Val	Lys	180	185	190	
Ala	Leu	Asn	Ile	Ile	Gln	Leu	Ile	Thr	Glu	Asp	Lys	Phe	Asn	Phe	Leu	195	200	205	
Ala	Thr	Leu	Lys	Lys	Ala	Leu	Lys	Thr	Leu	210	215								

<210> 13
 <211> 1413
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sintético

ES 2 644 945 T3

<400> 13

```

atggcctttct tcaacagggt tatcaccctg accgtgccta gctctgacgt ggtgaactac      60
tctgaaatct accaagttgc cctcagtagt gtgaaccagg cctgaccct agccaagtag      120
ttccagggtg ccattgacgg tagcaccctt agattcgact tcgagaaggc cctccagatc      180
gccaaacgaca tcccacaggc ogctgtgggt aacaccctca accagaccgt gcagcaaggc      240
accgtgcaag tgagcgtgat gatcgacaag atcgtggaca tcatgaagaa cgtgctctcc      300
atcgtgatcg acaacaagaa attctgggac caagtgaccg ccgctatcac caacaccttc      360
accaacctca actcccagga gtccgagggt tggatcttct actacaagga ggacgcccac      420
aagacctcct actattacaa catcctcttc gccatccagg acgaggaaac aggcggtgtg      480
atggctacac tcccacatgc ttctgacatc tccgtggaca tcgagaagga gaaagtcctc      540
ttcgtcacca tcaaggacac cgagaactac gctgtcactg tcaaggctat caacgtcgtt      600
caggctctcc agtcacagcg cgactccaaa gtcgttgacg ctttcaagtc tcccaggcac      660
ctccctagga agaggcacaa gatttgcagc aacagcaagc ctgctttgct taaggaagct      720
cctagggcag aagaggagtt gcctccacgt aagatgagca aggagatccg tctcaacctc      780

tctcgggagt ctggcgcgga cctctacctg aagatcctgg cgttcgtcaa gcccgagcat      840
ttctttcagg cgtacctgct ttgccgggag ttogagtcta tcgtcgatcc gactactaga      900
gagtcagatt tcgataagac tctgactatt gtcaagtcgg attctactct ggtcactgtc      960
ggcactatga acactaagct ggtcaactcg caagagattc tgggtctogga tctgattact     1020
caagttggta gtcagattgc ggatacgtg ggcattacgg acattgatgc aaacacacag     1080
caacaactga cagagcttat tgggaatctt ttcgttaatc ttaatagtca agttcaagag     1140
tacatctact tctacgaaga gaaggagaag caaacgtcat atcgttacaa cattctcttt     1200
gttttcgaga aggaatcatt cattaccata ctccaatgg gatttgatgt tacgggtgaac     1260
acaaataagg aagcagttct aaagttgaca ccaaaggata aagttactta tggacacgta     1320
tcagtaaagg cacttaatat cattcaactt atcacagaag ataaattcaa ttttctcgca     1380
acactcaaga aggctttgaa gaccttgtga taa                                     1413

```

5 <210> 14
 <211> 469
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Sintético

<400> 14

ES 2 644 945 T3

Met	Ala	Phe	Phe	Asn	Arg	Val	Ile	Thr	Leu	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Asp
1				5					10					15	
Val	Val	Asn	Tyr	Ser	Glu	Ile	Tyr	Gln	Val	Ala	Pro	Gln	Tyr	Val	Asn
			20					25					30		
Gln	Ala	Leu	Thr	Leu	Ala	Lys	Tyr	Phe	Gln	Gly	Ala	Ile	Asp	Gly	Ser
		35					40					45			
Thr	Leu	Arg	Phe	Asp	Phe	Glu	Lys	Ala	Leu	Gln	Ile	Ala	Asn	Asp	Ile
	50					55					60				
Pro	Gln	Ala	Ala	Val	Val	Asn	Thr	Leu	Asn	Gln	Thr	Val	Gln	Gln	Gly
65						70				75					80
Thr	Val	Gln	Val	Ser	Val	Met	Ile	Asp	Lys	Ile	Val	Asp	Ile	Met	Lys
				85					90					95	
Asn	Val	Leu	Ser	Ile	Val	Ile	Asp	Asn	Lys	Lys	Phe	Trp	Asp	Gln	Val
			100					105						110	
Thr	Ala	Ala	Ile	Thr	Asn	Thr	Phe	Thr	Asn	Leu	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser

ES 2 644 945 T3

115					120					125					
Glu	Ala	Trp	Ile	Phe	Tyr	Tyr	Lys	Glu	Asp	Ala	His	Lys	Thr	Ser	Tyr
130						135					140				
Tyr	Tyr	Asn	Ile	Leu	Phe	Ala	Ile	Gln	Asp	Glu	Glu	Thr	Gly	Gly	Val
145					150					155					160
Met	Ala	Thr	Leu	Pro	Ile	Ala	Phe	Asp	Ile	Ser	Val	Asp	Ile	Glu	Lys
				165					170					175	
Glu	Lys	Val	Leu	Phe	Val	Thr	Ile	Lys	Asp	Thr	Glu	Asn	Tyr	Ala	Val
			180					185					190		
Thr	Val	Lys	Ala	Ile	Asn	Val	Val	Gln	Ala	Leu	Gln	Ser	Ser	Arg	Asp
		195					200					205			
Ser	Lys	Val	Val	Asp	Ala	Phe	Lys	Ser	Pro	Arg	His	Leu	Pro	Arg	Lys
	210					215					220				
Arg	His	Lys	Ile	Cys	Ser	Asn	Ser	Lys	Pro	Ala	Leu	Leu	Lys	Glu	Ala
225					230					235					240
Pro	Arg	Ala	Glu	Glu	Glu	Leu	Pro	Pro	Arg	Lys	Met	Ser	Lys	Glu	Ile
			245						250					255	
Arg	Leu	Asn	Leu	Ser	Arg	Glu	Ser	Gly	Ala	Asp	Leu	Tyr	Leu	Lys	Ile
		260						265					270		
Leu	Ala	Phe	Val	Lys	Pro	Glu	His	Phe	Phe	Gln	Ala	Tyr	Leu	Leu	Cys
		275					280					285			
Arg	Glu	Phe	Glu	Ser	Ile	Val	Asp	Pro	Thr	Thr	Arg	Glu	Ser	Asp	Phe
	290					295					300				
Asp	Lys	Thr	Leu	Thr	Ile	Val	Lys	Ser	Asp	Ser	Thr	Leu	Val	Thr	Val
305					310					315					320
Gly	Thr	Met	Asn	Thr	Lys	Leu	Val	Asn	Ser	Gln	Glu	Ile	Leu	Val	Ser
			325						330					335	
Asp	Leu	Ile	Thr	Gln	Val	Gly	Ser	Gln	Ile	Ala	Asp	Thr	Leu	Gly	Ile
			340					345					350		
Thr	Asp	Ile	Asp	Ala	Asn	Thr	Gln	Gln	Gln	Leu	Thr	Glu	Leu	Ile	Gly
		355					360					365			

ES 2 644 945 T3

Asn Leu Phe Val Asn Leu Asn Ser Gln Val Gln Glu Tyr Ile Tyr Phe
370 375 380

Tyr Glu Glu Lys Glu Lys Gln Thr Ser Tyr Arg Tyr Asn Ile Leu Phe
385 390 395 400

Val Phe Glu Lys Glu Ser Phe Ile Thr Ile Leu Pro Met Gly Phe Asp
405 410 415

Val Thr Val Asn Thr Asn Lys Glu Ala Val Leu Lys Leu Thr Pro Lys
420 425 430

Asp Lys Val Thr Tyr Gly His Val Ser Val Lys Ala Leu Asn Ile Ile
435 440 445

Gln Leu Ile Thr Glu Asp Lys Phe Asn Phe Leu Ala Thr Leu Lys Lys
450 455 460

Ala Leu Lys Thr Leu
465

<210> 15
<211> 1413
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 15

ES 2 644 945 T3

```

atgagcaagg agatccgtct caacctctct cgggagttct gcgcggacct ctacctgaag      60
atcctggcgt tcgtcaagcc cgagcatttc ttccaggcgt acctgctttg cggggagttc      120
gagtctatcg tcgatccgac tactagagag tcagatttcg ataagactct gactattgtc      180
aagtcggatt ctactctggt cactgtcggc actatgaaca ctaagctggt caactcgcaa      240
gagattctgg tctcggatct gattactcaa gttggtagtc agattgcgga tacgctgggc      300
attacggaca ttgatgcaaa cacacagcaa caactgacag agcttattgg gaatcttttc      360
gttaatctta atagtcaagt tcaagagtac atctacttct acgaagagaa ggagaagcaa      420
acgtcatatc gttacaacat tctctttggt ttcgagaagg aatcattcat taccatactt      480
ccaatgggat ttgatgttac ggtgaacaca aataaggaag cagttctaaa gttgacacca      540
aaggataaag ttacttatgg acacgtatca gtaaaggcac ttaatatcat tcaacttadc      600
acagaagata aattcaattt totcgcaaca ctcaagaagg ctttgaagac cttgaagcct      660
gctttgctta aggaagctcc tagggcagaa gaggagttgc ctccacgtaa gatggctttc      720
ttcaacaggg ttatcacccct gaccgtgcct agctctgacg tggatgaacta ctctgaaatc      780

taccaagttg cccctcagta cgtgaaccag gcctgacct tagccaagta cttccagggt      840
gccattgacg gtagcacccct tagattcgac ttcgagaagg cctccagat cgccaacgac      900
atcccacagg ccgctgtggt caacaccctc aaccagaccg tgcagcaagg caccgtgcaa      960
gtgagcgtga tgatcgacaa gatcgtggac atcatgaaga acgtgctctc catcgtgatc     1020
gacaacaaga aattctggga ccaagtgacc gccgctatca ccaacacctt caccaacctc     1080
aactcccagg agtccgagggc ttggatcttc tactacaagg aggacgccc caagacctcc     1140
tactattaca acatcctctt cgccatccag gacgaggaaa caggcgggtg gatggctaca     1200
ctcccatcgt ctttogacat ctccgtggac atcgagaagg agaaagtcc cttcgtcacc     1260
atcaaggaca ccgagaacta cgctgtcact gtcaaggcta tcaacgtcgt tcaggctctc     1320
cagtcagacc gcgactccaa agtcgttgac gctttcaagt ctcccaggca cctccctagg     1380
aagaggcaca agatttgcag caacagctga taa                                     1413

```

<210> 16
 <211> 469
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 16

ES 2 644 945 T3

Met	Ser	Lys	Glu	Ile	Arg	Leu	Asn	Leu	Ser	Arg	Glu	Ser	Gly	Ala	Asp
1				5					10					15	
Leu	Tyr	Leu	Lys	Ile	Leu	Ala	Phe	Val	Lys	Pro	Glu	His	Phe	Phe	Gln
			20					25					30		
Ala	Tyr	Leu	Leu	Cys	Arg	Glu	Phe	Glu	Ser	Ile	Val	Asp	Pro	Thr	Thr
		35					40					45			
Arg	Glu	Ser	Asp	Phe	Asp	Lys	Thr	Leu	Thr	Ile	Val	Lys	Ser	Asp	Ser
	50					55					60				
Thr	Leu	Val	Thr	Val	Gly	Thr	Met	Asn	Thr	Lys	Leu	Val	Asn	Ser	Gln
65					70					75					80
Glu	Ile	Leu	Val	Ser	Asp	Leu	Ile	Thr	Gln	Val	Gly	Ser	Gln	Ile	Ala
				85					90					95	
Asp	Thr	Leu	Gly	Ile	Thr	Asp	Ile	Asp	Ala	Asn	Thr	Gln	Gln	Gln	Leu
			100					105					110		
Thr	Glu	Leu	Ile	Gly	Asn	Leu	Phe	Val	Asn	Leu	Asn	Ser	Gln	Val	Gln
		115					120					125			

ES 2 644 945 T3

Glu Tyr Ile Tyr Phe Tyr Glu Glu Lys Glu Lys Gln Thr Ser Tyr Arg
 130 135 140
 Tyr Asn Ile Leu Phe Val Phe Glu Lys Glu Ser Phe Ile Thr Ile Leu
 145 150 155 160
 Pro Met Gly Phe Asp Val Thr Val Asn Thr Asn Lys Glu Ala Val Leu
 165 170 175
 Lys Leu Thr Pro Lys Asp Lys Val Thr Tyr Gly His Val Ser Val Lys
 180 185 190
 Ala Leu Asn Ile Ile Gln Leu Ile Thr Glu Asp Lys Phe Asn Phe Leu
 195 200 205
 Ala Thr Leu Lys Lys Ala Leu Lys Thr Leu Lys Pro Ala Leu Leu Lys
 210 215 220
 Glu Ala Pro Arg Ala Glu Glu Glu Leu Pro Pro Arg Lys Met Ala Phe
 225 230 235 240
 Phe Asn Arg Val Ile Thr Leu Thr Val Pro Ser Ser Asp Val Val Asn
 245 250 255
 Tyr Ser Glu Ile Tyr Gln Val Ala Pro Gln Tyr Val Asn Gln Ala Leu
 260 265 270
 Thr Leu Ala Lys Tyr Phe Gln Gly Ala Ile Asp Gly Ser Thr Leu Arg
 275 280 285
 Phe Asp Phe Glu Lys Ala Leu Gln Ile Ala Asn Asp Ile Pro Gln Ala
 290 295 300
 Ala Val Val Asn Thr Leu Asn Gln Thr Val Gln Gln Gly Thr Val Gln
 305 310 315 320
 Val Ser Val Met Ile Asp Lys Ile Val Asp Ile Met Lys Asn Val Leu
 325 330 335
 Ser Ile Val Ile Asp Asn Lys Lys Phe Trp Asp Gln Val Thr Ala Ala
 340 345 350
 Ile Thr Asn Thr Phe Thr Asn Leu Asn Ser Gln Glu Ser Glu Ala Trp
 355 360 365
 Ile Phe Tyr Tyr Lys Glu Asp Ala His Lys Thr Ser Tyr Tyr Tyr Asn

ES 2 644 945 T3

370

375

380

Ile Leu Phe Ala Ile Gln Asp Glu Glu Thr Gly Gly Val Met Ala Thr
385 390 395 400

Leu Pro Ile Ala Phe Asp Ile Ser Val Asp Ile Glu Lys Glu Lys Val
405 410 415

Leu Phe Val Thr Ile Lys Asp Thr Glu Asn Tyr Ala Val Thr Val Lys
420 425 430

Ala Ile Asn Val Val Gln Ala Leu Gln Ser Ser Arg Asp Ser Lys Val
435 440 445

Val Asp Ala Phe Lys Ser Pro Arg His Leu Pro Arg Lys Arg His Lys
450 455 460

Ile Cys Ser Asn Ser
465

<210> 17
<211> 57
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 17
aagcctgctt tgctaagga agctcctagg gcagaagagg agttgcctcc acgtaag 57

<210> 18
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 18

Lys Pro Ala Leu Leu Lys Glu Ala Pro Arg Ala Glu Glu Glu Leu Pro
1 5 10 15

Pro Arg Lys

<210> 19
<211> 980
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 19

ccatggctat cctagacctt aagtcctctg tgctgaacgc cattaactac tggggcccta 60
 agaacaacaa cggcatccag ggcgggtgact tcggctaccc catctctgag aagcagatcg 120
 acactagcat cattaccttc acccaccttc gcttgatccc ctacgatctt actatccgcg 180
 agaaccttga gaccatcttc accacaacgc aggtgctcac caataacact gacctccagc 240
 aatcccagac cgtgagcttt gcgaagaaga ccactaccac gacctcaact agcacgacca 300
 acggttggac agaaggaggc aagatcagcg acacgctgga ggagaaagtt tcggttagca 360
 ttccgttcat cggtgagggg ggcgggaaga actcgactac catagaggcc aacttcgcac 420
 acaactctag caccactacc ttccagcaag caagcactga cattgagtgg aacattagcc 480
 aaccggtgct ggttcctccc tctaaacaag ttgtcgcgac ccttgtgatc atgggaggca 540
 actttaaccat ccctatggac ttgatgacca cgattgatag tacagagcac tactcccact 600
 actcoggtta ccctatcctc acctggatct cgtccccaga taactcttac tccggctcct 660
 ttatgtcatg gtactttgca aactggccta acctcccgag tggattcggc ccactgaata 720
 gtgataaacac gggtcacatac actggctctg tcgtgtccca agtttcggcc ggtgtctacg 780
 ctaccgtccg gttcgatcag tatgacattc acaatctccg tactatcgag aagacttggg 840
 atgctcgcca tgcgacgctg cataatggca agaagatttc tatcaacaat gtcacggaaa 900
 tggtcccaac atcccctatc aagacaaatg agcaaaagtt gatttctgag gaggatttgt 960
 gaggatocaa ttcccgatcg 980

<210> 20
 <211> 1924
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 20

ggtcgattg agacttttca acaaagggtg atatccggaa acctcctcgg attccattgc 60
 ccagctatct gtcactttat tgtgaagata gtggaaaagg aaggtggctc ctacaaatgc 120
 catcattgcg ataaaggaaa ggccatcgtt gaagatgcct ctgccgacag tgggtccaaa 180
 gatggacccc caccacagag gagcatcgtg gaaaaagaag acgttccaac cagctcttca 240
 aagcaagtgg attgatgtga tgggtccgatt gagacttttc aacaaagggt aatatccgga 300
 aacctcctcg gattccattg ccagctatc tgtcacttta ttgtgaagat agtggaaaag 360
 gaaggtggtc cctacaaatg ccattcattgc gataaaggaa aggccatcgt tgaagatgcc 420
 totgcgcaca gtggtcccaa agatggaccc ccaccacga ggagcatcgt ggaaaaagaa 480

ES 2 644 945 T3

```

gacgttccaa ccacgtcttc aaagcaagtg gattgatgtg atatctccac tgacgtaagg      540
gatgacgcac aatcccacta tccttogcaa gacccttcct ctatataagg aagttcattt      600
catttggaga ggacacgctg acaagctgac tctagcagat atcaaacaag tttgtacaaa      660
aaagcaggct cgcgggccgc ccccttcacc agatctccat ggctatccta gaccttaagt      720
ccctcgtgct gaacgccatt aactactggg gccctaagaa caacaacggc atccagggcg      780
gtgacttcgg ctaccccatc tctgagaagc agatcgacac tagcatcatt accttcaccc      840
accctcgttt gatcccttac gatottacta tcccgagaa ccttgagacc atcttcacca      900
caacgcagggt gctcaccaat aactactgac tccagcaatc ccagaccgtg agctttgcga      960
agaagaccac taccacgacc tcaactagca cgaccaacgg ttggacagaa ggaggcaaga     1020
tcagcgacac gctggaggag aaagtttcgg ttagcattcc gttcatcggg gaggggtggcg     1080
ggaagaactc gactaccata gagggcaact tcgcacacaa ctctagcaac actaccttcc     1140
agcaagcaag cactgacatt gagtggaaaca ttagccaacc ggtgctgggt cctccctcta     1200
aacaagttgt cgcgaccctt gtgatcatgg gaggcaactt taccatccct atggacttga     1260
tgaccacgat tgatagtaca gagcaactact cccactactc cggttaccct atoctcacct     1320
ggatctcgtc ccagataaac tottactccg gtccctttat gtcatggtac tttgcaaact     1380
ggcctaacct tccgagtgga ttcggccac tgaatagtga taacacggtc acatacactg     1440
gctctgtcgt gtcccaagtt tcggccgggtg tctacgctac cgtccgggtc gatcagtatg     1500
acattcacaa tctccgtact atcgagaaga cttgggtatgc tcgccatgog acgctgcata     1560
atggcaagaa gatttctatc aacaatgtca cggaaatggc tccaacatcc cctatcaaga     1620
caaatgagca aaagttgatt tctgaggagg atttgtgagg atccaattcc cgatcgttca     1680
aacatttggc aataaagttt cttaagattg aatcctgttg ccggtcttgc gatgattatc     1740
atataatttc tgttgaatta cgttaagcat gtaataatta acatgtaatg catgacgtta     1800
tttatgagat gggtttttat gattagagtc ccgcaattat acatttaata cgcgatagaa     1860
aacaaaatat agcgcgcaaa ctaggataaa ttatcgcgcg cgggtgtcatc tatgttacta     1920
gato                                     1924

```

<210> 21
 <211> 1196
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 21

ES 2 644 945 T3

ccatggcgca agttagcaga atctgcaatg gtgtgcagaa cccatctctt atctocaatc	60
tctcgaaatc cagtcaacgc aaatctccct tatcggtttc tctgaagacg cagcagcatc	120
cacgagctta tccgatttctg tctgctggtg gattgaagaa gagtgggatg acgttaattg	180
gctctgagct tctctctctt aaggctcatgt cttctgtttc cacggcgtgc atggctatcc	240
tagaccttaa gtccctcgtg ctgaacgcca ttaactactg gggccctaag aacaacaacg	300
gcattccaggg cggtagcttc ggctacccca tctctgagaa gcagatcgac actagcatca	360
ttaccttcac ccacctctgc ttgatccctt acgatcttac tatcccgagc aaccttgaga	420
ccatcttcac cacaacgcag gtgctcacca ataactactg cctccagcaa tcccagaccg	480
tgagctttgc gaagaagacc actaccacga cctcaactag cagaccaac gggtggacag	540
aaggaggcaa gatcagcgac acgctggagg agaaagtctt ggtagcatt ccgttcacg	600
gtgaggggtg cggaagaac togactacca tagaggccaa cttcgcacac aactotagca	660
ccactacctt ccagcaagca agcactgaca ttgagtggaa cattagccaa ccggtgctgg	720
ttctccctc taaacaagtt gtgcgcaccc ttgtgatcat gggaggcaac tttaccatcc	780
ctatggactt gatgaccacg attgatagta cagagcacta ctcccactac tccggttacc	840
ctatcctcac ctggatctcg tcccagata actcttactc cggctccctt atgtcatggt	900
actttgcaaa ctggcctaac cttccgagtg gattcgccc actgaatagt gataacacgg	960
tcacatacac tggctctgtc gtgtcccaag tttcggccgg tgtctacgt accgtccggt	1020
tcatcagta tgacattcac aatctccgta ctatcgagaa gacttggtat gctcgccatg	1080
cgacgctgca taatggcaag aagatttcta tcaacaatgt cacggaaatg gctccaacat	1140
cccctatcaa gacaaatgag caaaagttga tttctgagga ggatttgtga ggatcc	1196

<210> 22
 <211> 2152
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 22

ES 2 644 945 T3

ggtcgattg agacttttca acaaagggtg atatccggaa acctcctcgg attccattgc	60
ccagctatct gtcactttat tgtgaagata gtggaaaagg aaggtggctc ctacaaatgc	120
catcattgcg ataaaggaaa ggccatcgtt gaagatgcct ctgccgacag tggtoccaaa	180
gatggacccc caccacgag gagcatcgtg gaaaaagaag acgttccaac cacgtcttca	240
aagcaagtgg attgatgtga tggtcgatt gagacttttc aacaaagggt aatatccgga	300
aacctcctcg gattccattg ccagctatc tgtaacttta ttgtgaagat agtgaaaag	360
gaaggtggct cctacaaatg ccatcattgc gataaaggaa aggccatcgt tgaagatgcc	420
tctgccgaca gtggtcccaa agatggaccc ccaccacga ggagcatcgt ggaaaaagaa	480

gacgttccaa ccaogtcttc aaagcaagtg gattgatgtg atatctccac tgacgtaagg 540
 gatgacgcac aatccacta tccttcgcaa gacccttcct ctatataagg aagttcattt 600
 catttggaga ggacacgctg acaagctgac tctagcagat atcaaacaag tttgtacaaa 660
 aaagcaggct ccgcgccgc ccccttcacc agatctocat ggcgcaagtt agcagaatct 720
 gcaatggtgt gcagaacca tctcttatct ccaatctctc gaaatccagt caacgcaaat 780
 ctccottatc gggttctctg aagacgcagc agcatccacg agcttatccg atttcgtcgt 840
 cgtggggatt gaagaagagt gggatgacgt taattggctc tgagcttcgt cctcttaagg 900
 tcatgtcttc tgtttccacg gcgtgcatgg ctatcctaga ccttaagtc ctcgtgctga 960
 acgccattaa ctactggggc cctaagaaca acaacggcat ccagggcggg gacttcggct 1020
 accocatctc tgagaagcag atcgacacta gcatcattac cttaaccac cctcgcttga 1080
 tccoctacga tcttactatc ccgcagaacc ttgagacat cttaaccaca acgcaggtgc 1140
 tcaccaataa cactgacctc cagcaatccc agaccgtgag ctttgogaag aagaccacta 1200
 ccacgacctc aactagcacg accaacggtt ggacagaagg aggcaagatc agcgacacgc 1260
 tggaggagaa agtttcgggt agcattccgt tcatcgggtga gggtgccggg aagaactcga 1320
 ctaccataga ggccaacttc gcacacaact ctagcaccac taccttcag caagcaagca 1380
 ctgacattga gtggaacatt agccaaccgg tgcgtggttc tccctotaaa caagttgtog 1440
 cgaccottgt gatcatggga ggcaacttta ccatccctat ggacttgatg accacgattg 1500
 atagtacaga gcaactactc cactactocg gttaccctat cctcacctgg atctcgtccc 1560
 cagataactc ttaactccgt ccctttatgt catggtaact tgcaaactgg cctaaccctc 1620
 cgagtggatt cggcccaactg aatagtata acacggtcac atacactggc tctgtcgtgt 1680
 cccaagtttc ggccgggtgc tacgctaccg tccggttcga tcagtatgac attcacaatc 1740
 tccgtactat cgagaagact tggatgctc gccatgcgac gctgcataat ggcaagaaga 1800
 tttctatcaa caatgtcacg gaaatggctc caacatcccc tatcaagaca aatgagcaaa 1860
 agttgatctc tgaggaggat ttgtgaggat ccaattcccg atcgttcaaa catttgcaa 1920
 taaagtttct taagattgaa tcctgttgcc ggtcttgcca tgattatcat ataatttctg 1980
 ttgaattacg ttaagcatgt aataattaac atgtaatgca tgacgttatt tatgagatgg 2040
 gtttttatga ttagagtccc gcaattatac atttaatacg cgatagaaaa caaatatag 2100
 cgcgcaaaact aggataaatt atcgcgcgcg gtgtcatcta tgttactaga tc 2152

<210> 23
 <211> 2122
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 23

ggtcogattg agacttttca acaaagggtg atatccggaa acctcctcgg attccattgc	60
ccagctatct gtcactttat tgtgaagata gtggaaaagg aaggtggctc ctacaaatgc	120
catcattgcg ataaaggaaa ggccatcgtt gaagatgcct ctgccgacag tgggtccaaa	180
gatggacccc caccacagag gagcatcgtg gaaaaagaag acgttccaac cacgtcttca	240
aagcaagtgg attgatgtga tgggtccgatt gagacttttc aacaaagggg aatatccgga	300
aacctcctcg gattccattg cccagctatc tgtcacttta ttgtgaagat agtggaagag	360
gaaggtggct cctacaaatg ccatcattgc gataaaggaa aggccatcgt tgaagatgcc	420
tctgccgaca gtggtcccaa agatggaccc ccaccacga ggagcatcgt ggaaaaagaa	480
gacgttccaa ccacgtcttc aaagcaagtg gattgatgtg atatctccac tgacgtaagg	540
gatgacgcac aatcccacta tccttcgcaa gacccttcct ctatataagg aagttcattt	600
catttgagga ggacacgctg acaagctgac tctagcagat atcaaacaag tttgtacaaa	660
aaagcaggct ccgoggccgc ccccttcacc agatctccat ggcgcaagtt agcagaatct	720
gcaatggtgt gcagaacca tctcttatct ccaatctctc gaaatccagt caacgcaaat	780
ctcccttatc ggtttctctg aagacgcagc agcatccacg agcttatccg atttcgtcgt	840
cgtgggggatt gaagaagagt gggatgacgt taattggctc tgagcttcgt cctcttaagg	900
tcattgtctc tgtttccacg gcgtgcatgg ctatcctaga ccttaagtcc ctctgtctga	960
acgccattaa ctactggggc cctaagaaca acaacggcat ccaggggcggg gacttcggct	1020
accccatctc tgagaagcag atcgacacta gcatcattac cttcaccac cctcgcttga	1080
tccctacga tottactatc ccgcagaacc ttgagaccat cttcaccaca acgcagggtc	1140
tcaccaataa cactgacctc cagcaatccc agaccgtgag ctttgccaag aagaccacta	1200
ccacgacctc aactagcacg accaacgggt ggacagaagg aggcaagatc agcgacacgc	1260
tggaggagaa agtttcgggt agcattccgt tcatcggtga gggtaggggg aagaactcga	1320
ctaccataga ggccaacttc gcacacaact ctagcaccac taccttcag caagcaagca	1380
ctgacattga gtggaacatt agccaaccgg tgctggttcc tccctctaaa caagttgtcg	1440
cgacccttgt gatcatggga ggcaacttta ccatccctat ggacttgatg accacgattg	1500
atagtacaga gcaactactc cactactccg gttaccctat cctcacctgg atctcgtccc	1560
cagataactc ttactccggg ccccttatgt catgggtactt tgcaaactgg cctaaccctc	1620
cgagtggatt cggcccactg aatagtgata acacggtcac atacactggc tctgtcgtgt	1680
cccaagtttc ggccgggtgc tacgctaccg tccgggtcga tcagtatgac attcacaatc	1740
tcogtactat cgagaagact tggatatgctc gccatgcgac gctgcataat ggcaagaaga	1800

tttctatcaa caatgtcacg gaaatggctc caacatcccc tatcaagaca aattgaggat	1860
ccaattcccg atcgttcaaa catttgga taagtttct taagattgaa tctgttgcc	1920
ggtcttgcca tgattatcat ataatttctg ttgaattacg ttaagcatgt aataattaac	1980
atgtaatgca tgacgttatt tatgagatgg gtttttatga ttagagtccc gcaattatac	2040
atttaatacg cgatagaaaa caaaatatag cgcgcaaact aggataaatt atcgcgcgcg	2100
gtgtcatcta tgttactaga tc	2122

<210> 24
 <211> 1919
 <212> ADN
 <213> *Lygus hesperus*

<400> 24

acacccccag ggtccccatt gttgttcagc cgtttgaaag gagtcagcaa acagcgggct	60
ttctttcttag gagatttgcg tccgtcggac cggcacaccc ccagggtccc cattttgttc	120
agtgtttgaa aggagtcagc aaacagcggc aagatgtgtg acgacgatgt agcggcgcctc	180
gtagtcgaca acggctcagg aatgtgcaag gcgggcttcg ccggagatga cgctcccagg	240
gctgtcttcc cctccatcgt cggcgcgcgc aggcacacag gtgtgatggc cggatgggt	300
caaaaggact cctacgtcgg cgacgaggct cagagcaaga gaggtatcct cactctgaag	360
taccccatcg agcacggcat catcaccaac tgggacgaca tggagaagat ctggcaccac	420
acctttctaca acgagctcgg cgtcgtctcc gaggagcaac ccacccctct cacggaggct	480
cccctcaacc ccaaagccaa cagggagaag atgactcaga tcatgtttga gaccttcaac	540
acccccgcca tgtacgtcgc catccaggcc gtcctttccc tctacgcttc cggctcgtacc	600
accggtatcg tctcgcactc cggagatggc gtctcccaca ccgtcccat ctatgaaggt	660
taagcccttc ctcacgccat cctccgtctg gacttggtg gcggtgactt gactgactac	720
ctgatgaaga tctcaccga gaggggttac tctttacca ccaccgctga gagggaaatc	780
gtccgcgaca tcaaggagaa gctctgctac gtcgctctgg acttcgagca ggaaatggcc	840
accgcgcgcg cctccacctc cctcgagaag tcctacgagc ttcccgacgg acaggtcatc	900
accatcggca acgagaggtt ccgttgcccc gaagccctct tccagccttc cttcctgggt	960
atggaatcct gcggtatcca cgagaccgtc tacaactcca tcatgaagtg cgacgtcgac	1020
atcaggaaag acctgtacgc caacaccgtc ctctccggag gcaccaccat gtaccccggt	1080
atcgccgaca ggatgcagaa ggaaatcacc gcctcgcctc cctcgaccat caagatcaag	1140
atcatcgctc cccagaaag gaagtactcc gtatggatcg gtggctccat cctcgcctcc	1200
ctctccacct tccaacagat gtggatctcc aagcaggagt acgacgagtc cggccccggc	1260
atcgtccacc gcaagtgctt ctaagcgaaa cactcaccac atcaatacac cactacatca	1320

ES 2 644 945 T3

aaccacacaa	gacgcgccag	ttacaatcgg	gaccgtggtg	ggcgcgtctt	gttgtggttt	1380
gatgcccccc	ccccccccc	cacccccac	ctaaaaatcc	caggggctcc	ctcgagaaag	1440
tctacgagc	tttcccgacg	tcaccatcgc	gaaagggtccc	ccccctgtg	gaattggcct	1500
ccccgctga	ctaccatcat	gtctgccaac	tatcgacacc	ctcgacgtgg	acaatatcat	1560
tactggcgtc	ctctactctt	acgctattgc	gccactatt	ctagtccatt	gctactocat	1620
taatagagat	ctacttcatt	gtccatacta	tatacaactac	tattttttac	atacttactg	1680
ctcacttatt	attgagtttc	aattttacat	attcgtttaa	tacattatgc	agatcttatt	1740
ctccaactag	tttcgcgtag	tggcttttcg	gggtgaaata	ggtgcgtatt	gctggacttg	1800
agggtgtgtc	acgctatact	gttttcttgc	actattctat	cggtaggtag	gagtcagttt	1860
cggcattttt	attgttcattg	cctcattcat	attcatgtta	tttaaactgt	gatagggtga	1919

<210> 25
 <211> 991
 <212> ADN
 <213> *Lygus hesperus*

<400> 25

acaaacgctt	tgcagtgagg	aagggtggaag	gaactgaaaa	tatatcttga	aggagtttaa	60
catcatacaa	ggtgatttca	tctcgtgtca	acggtacctg	catctatcgg	tgagatgatt	120
tacttaattt	tggctctggc	cataatatgg	gccttcgtga	aactctacac	gcaggtcttc	180
aattactggg	agcaacgagg	gtttccgtac	gtggaaggga	aattccctct	tggcagtgc	240
ccctgcctct	ctgcccgtc	caagttcttg	ggtttcgaag	ttcaggaaca	ttacaggaaa	300
ctttcggggc	accctctcgg	cgggatatac	gtcggcagga	gaccagatct	catcgtcagg	360
gaccccaaaa	taatcaagaa	catcatggtc	aaagattttg	ctcattttcg	gaatcgagct	420
gttgagatcc	cttctaaaga	caatccactg	acacaacact	tgttctcgtc	ggaaggcacg	480
aaatggagag	ctctccgagt	caagctcaca	cctactttca	cgtctggcaa	gttgaaactg	540
atgtacagcc	tattcgtaga	atgcgctcaa	cgtttggaac	gcaaattaaa	cgaagattct	600
atgaagaacg	aaggggtggt	ggatataaag	gacaccatcg	caaggtttac	cactgacata	660
atcggctctt	gcgcgttcgg	cctagaaatc	gacagtctca	acaaccccg	cgagcccttc	720
aggaaaatcg	gaatgcgttt	attccgacgt	aacctgaaag	gaagactcat	cgagttgac	780
tacagtttgg	caccgagcct	acgaaactac	ttgaaactat	cgaggacatc	caaagagacg	840
gaaaaaatgg	tcatgtcggg	tatcgccag	actatcgaat	atcgtgagaa	aaacaacgtc	900
cgcgaaatg	attttctcga	tctcctcatc	gagctgaaaa	acagggacat	tttgtacgtt	960
gatcgacaga	aagacagcaa	atattgaaaa	c			991

<210> 26
 <211> 2656
 <212> ADN

<213> *Lygus hesperus*

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> n e s a, c, g o t

<400> 26

```

ncccttttaa agccccogca cccgaggtgt ttccgtgatc aatattatth catcctatth 60
catctccatt acattccogt catgcacttg gagaaccact ttgagaccgt ttcttactth 120
taactaatca accatgggaa aagagaagat tcatatcaac atcgtcgtca ttggacacgt 180
cgactccggc aaatccacga ccacoggaca cttgatctac aaatgcggtg gtatcgacaa 240
gogtacgatc gagaaattcg agaaggaagc ccaggaaatg ggtaaagggt ccttcaagta 300
cgcttgggtt ttggacaagc tgaaggccga gcgtgagcgt ggtatcacca tcgatatcgc 360
cctctggaag ttcgaaactg gcaaatacta cgtgaccatc atcgacgccc ctggacacag 420
ggatttcatc aagaacatga tcaactggaac ctacacaggct gattgcgctg tgctgatcgt 480
agcagccggt accggtgagt tcgaagctgg tatctccaag aacggacaaa cccgagaaca 540
cgcccttctc gccttcaacc tcggtgtgaa acagctcatc gttggtgtga acaagatgga 600
ctctactgag cccccctaca gcgagaaccg ttctgaggaa atcaaaaagg aagtctcgtc 660
ctacatcaag aagatcgggt acaaccagc ggccgtcgcc ttcggttccca tctccggatg 720
gcacggcgac aacatggttg aacctctga caagatgcc tggttcaagg ggtgggccgt 780
cgagaggaag gaaggcaagg ctgaacgcaa gtgcctcatc gaagccctcg acgcatcct 840
ccccccctcc cgccctaccg acaaagccct caggcttccc ctocaggacg tgtacaagat 900
cggcggtatc ggaactgtcc ccgtgggtcg tgttgagacc ggtgtcctga aaccggtat 960
ggtcgtcacc ttgcccccg tcaacctgac cactgaagtc aagtcogtg agatgcacca 1020
cgaagccctc caggaagccg tgcccggcga caacgtcggc ttcaacgtca agaacgtctc 1080
cgtcaaggaa ttgcgtcgag ggtacgtcgc cggagactcc aaggttctc ctccaaggc 1140
cgcttccgac ttacccgcac aggttattgt cctgaacct cctggacaga tcgccaatgg 1200
ctacacccca gtgttgatt gccacaactg tcacatcgca tgcaaattcc aagacatcaa 1260
ggagaaatgc gaccgtcgta ctggtaaaac caccgaacag aaccccaaat ccatcaagtc 1320
cggtgacgct gccatcatca cctcgtccc gaccaagccc atgtgcgtcg agtccttcca 1380
ggagttcccc cctcttgga gtttcgctgt gcgtgacatg agacagaccg tcgctgtcgg 1440
tgtcatcaag agcgtcacta acaaggacat caccaccggc aaagtaacga aggccgcaga 1500
gaaggcccag aagaagaaat aactaggtgt catggaatca catacactca tcaaggggaa 1560

```

ccttggtcgc tattctgtac tctgccact cctottgtcc aagtgggtgc tocaaccgtg	1620
tttccatcgc aaagagttca gaaggaaaag cggttaaagt caccacttaa ctataatccc	1680
aactttatta tatatatata aatatatagc ctcgacttgt gtacacgttt ttaattaaag	1740
aaggagactg tttattatatt ttgggttttgt ttttatcatt taaaaaatct atttcttttt	1800
togaaaaaaa gaaaacgaac ttgggttttt tttttgtatt ttacatctgg tgggtataact	1860
gtgccctttt gtctgttttt gtgtgaaaaa tagcgaattt tgttttttaa tttatttttt	1920
tgggatttta ttcttcgtca aaataatttt aaaaaaattt atttacagca ttttttaa	1980
taattgaagc aaaaactata attgacattc tgtatagatt ggtgactaaa taaactcgaa	2040
tgtttcatga aaaaaaaaaa aaaagggcgg ccaaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	2100
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	2160
aaaaaaaaaa gggggggggc cctttaaaaa tccccccggg gggccaatt ttcccgacc	2220
cccttttttt tgaaaaaggg ggcccctaaa gggggcctat ttaaaagtag ggccggggcc	2280
gcgtttttta accgcggggg ggggaaaaat ggttatttgg gattttttgg aaagaacct	2340
ttttttgggg gggggaaata ttgggaaaaa tcccccaaaa aatttaaagg tttaagggaa	2400
aaaaaaaaatt tttaagggga aaaggggta aaaaaacttg cttttttttg tgggtgaaaa	2460
tttttttttt tgggtttttt tttttaaaaa ttttttcccc gggggttggg gtttttattg	2520
gttggggttt ttaaaattcc aagccccagg gtttttttgg ggccccccac ccccccaagt	2580
ttgttttgat ttaaaatccc ccaaccaat tttggaagg gttttttttg tttaaaaaac	2640
ccccccccc ccccc	2656

<210> 27
 <211> 1043
 <212> ADN
 <213> *Lygus hesperus*
 <400> 27

ES 2 644 945 T3

gtcctctogt cttgtttcca gaggaggtgt gaatttttagg atgaaatott tgctgggtgt	60
tatgtcagtg gtgggcttgg ccatgtgcca gtggggccag cctggacttc ctcaggacac	120
tcctgaagta gccgctgcca aagctgcca ctacgccgct ctgccagag ccggtacccc	180
agttcacaa gccgctccca cctggaacgc cggccctgcc tggggaactc ccgccgccc	240
cgccgtccct caagatacgc ctgaagtcgc cgtgccaaag gccgctcatt tcgctgcgt	300
cgctcaggtt cagagccaca cgcctcagca gtcttgggt cctcagcagt cctggactcc	360
ccagagccag cagtggacta gcgagacca acccaggtgg aacggaccca tcgctctgcc	420
cccgggcttc gaccagaacg gcgctccct ccccgctcaa gacacccctg aagtagctgc	480
tgagcgcgca aggcacttca acctctactc cagcgggtgga catccttccc tcgccccgc	540
tcagccttcc tggaacgcgc ctctcaatg gaacgcgcgt cctcagtggc ccgctccgc	600
taccagtggt aacgctcaac ccggtctccc tcaggacacc ccgaagtgc ccgctgcca	660
ggccgctcac ttgcgcgtc acgctcaact tgctcctgcc tccaaccacg gtaggtggaa	720
gagaggaatc ctgcgtgcc cagtcaccac cgtcagcgt cactccacct ccacgtcca	780
ctctgcccc gtggtccacg ccaccccggt cgtccacgca actccattg ttgcgcgtgc	840
tcccgtagtc cacaccttgc cctaccttgc caccctggtc cacaccgcc ccacgtccc	900
caccgcccc atcgtccca cccgcccctc tcgcccacg gctccactgg gtaattaatg	960
actggcgaag aagccacgac tgattttttg tgcgtagtt tacgagcttt gtagaaaaac	1020
gaaaatttga atgaattgat tgg	1043

<210> 28
 <211> 2346
 <212> ADN
 <213> *Lygus hesperus*

<400> 28

ES 2 644 945 T3

actcgttcta gatcgcgatg gacgcgtggg cgagaaacga gaacgagcta cgttgagcat	60
caagagcttt cgtactattg aaattctcga aaaatcgag atcttcgtta aaactttcga	120
ctcgggaaga ccatcacctt cgaggctcag ccttctcgat accattgaaa acgtgaaggc	180
gaaaattcag gataaagaag gcatcccccc agatcagcag aggttgatct ttgccggcaa	240
gcagttggaa gacggacgta ctttgtctga ctacaacatc caaaaagaat ccactctcca	300
cctgggtcttg agattgagag gtggcatgca gatcttcgtg aagaccctca caggaaagac	360
catcactctt gaggtcagag cttctgactc catcgaaaac gtcaaggcta aaattcaaga	420
caaggaaggt attcctccag atcagcagag attgatcttc gccggcaaac aactcgaaga	480
tggccgtacc ctctctgact acaatattca aaaagagtcc acccttcaact tgggtgttag	540
attgcgtgga ggtatgcaaa tctttgtcaa aacattgact ggaaagacca tcacccttga	600
agtcgaaccc tccgacacca tcgaaaatgt caaggccaag atccaggaca aggaaggcat	660
ccccccagat cagcagaggt tgattttcgc tggcaaaciaa cttgaagacg gacgtaccct	720
ctcggactac aacatccaga aggagtcgac cctccatctt gtctccgtc tgcgtggtgg	780
tatgcagatt tttgtcaaaa ctctgactgg caagacaatc acccttgaag tagagccctc	840
tgacaccatc gaaaatgtca aggcgaaaat ccaggacaaa gaaggcatcc cccagatca	900
gcagaggttg atcttcgccg gtaagcagct tgaagacggc cgtaccctct cggactacaa	960
catccagaag gagtccaccc ttcattcttg cctccgtctg cgtggtggta tgcagatttt	1020
cgtgaagacc ttgactggca agaccatcac tcttgaggtc gagccctctg acaccatcga	1080
aaacgtcaag gccaaagatcc aggacaagga aggtatcccc ccagatcagc agaggttgat	1140

```

cttcgctggc aagcagctcg aggatggctg taccctctcg gactacaaca tccagaagga 1200
gtccaccctt catcttgtec tccgtctgcg tgggtggtatg cagattttcg tgaagacctt 1260
gactggcaag accatcactc ttgaggtcga gccctctgac accattgaaa acgtcaaggc 1320
caagatccag gacaaggaag gtatccccc agatcagcag aggttgatct tcgccggtaa 1380
gcagcttgaa gacggcogta ctctctctga ttacaacatc cagaaggagt cgaccctcca 1440
ccttgtcctc cgtctgcgtg gtggtatgca gattttctgtg aagaccttga ctggcaagac 1500
catcactctt gaggtcgagc cctctgacac cattgaaaac gtcaaggcca agatccagga 1560
taaggaaggc atccccccag atcagcagag gttgatcttc gccggtaagc agcttgagga 1620
tggaaggtacc ctgtcagact acaacatcca aaaggagtcc accctgcact tgggtgtgag 1680
attgcgtggt ggtatgcaga tcttcgtcaa gaccttgact ggcaagacga tcactttgga 1740
agtcgagccc tctgacacca ttgagaatgt caaagccaaa atccaagata aggaaggcat 1800
ccccccagat cagcagaggt tgatcttcgc tggtaaagcag cttgaagacg gccgcactct 1860
ttcggattac aacatccaga aggagtcgac cctccacctt gtccttcgtc tgcgtggtgg 1920
tatgcagatc ttcgtcaaga cgttgacagg caagaccatc acccttgaag tcgagccctc 1980
tgacaccatc gaaaacgtca aggctaagat ccaggacaag gaaggtatcc cccagatca 2040
gcaaagattg atcttcgcog gcaaacagct cgaagatggc cgtaccctct cagactacaa 2100
cattcaaaag gagtcaactc ttcattctctg tctgaggctc cgtggcggtc gttattgatc 2160
acaattccaa acttaaaaat tgcgttcoga ttttctctct ttatttggtc aaaaatacgt 2220
accctagtta attaaaatga cttgaaattt gattttttta gaatgcttcg aattttttta 2280
tagatggttt gttacgtaga cgaatacaca acagtgaaag ccgaaaaaaa aaaaaaagg 2340
gcggcc 2346

```

<210> 29
 <211> 1151
 <212> ADN
 <213> *Lygus hesperus*

 <400> 29

ES 2 644 945 T3

gctcttctcg ggaatcttcg aattcttcat agcaaatctc ttogaattca tattcgggta 60
acgctcagcc ataaaagaat agtcctcgaa caaagcagta ataagttcaa ttcaggggaa 120
tttaatcttc gtaagcctag ccagggaatg aaccttcggg aaacttcaac aagaatttta 180
acataaccagg gaaaccaggt cattcgaagt ttcttcagag aacgtagttc actttttcag 240
gagtaattca agaaataggg gatatacaagt ttggctctgg cagaatttga gatggggaga 300
aatattcagc agttgaaaag gaaacctcgg aaacctattg gacgtcgagg gacatcgttg 360
gtgggacggc aaaggaggta atggtggaag aaaaaaacca cgttttatgc aagtgacttt 420

ggatgattcc attgtggtgg gactcaacat caagaatact ccaaaagact gcttcatcgt 480
gaattcaagt cataatcttc gtgtcgatcg aattaatatt gacatcaaag atggggataa 540
gaagggaggg cacaacacag acgggtttgg cgtaagtgga tcgagaaatg tcacagtttc 600
aaactgccag gtccacaacc aagacgactg cttcgccacg acatctggaa gtgacacgat 660
attcgagaac agcaagtgca cgggtggtca tggcatatct gtaggatcca tgggagctgg 720
aaaagtcggt gaaagactga cagtgaggaa ctgtaggatt ttggcgaaca gcaatggcat 780
tcgaatcaag acccgacgag gagaaacggg tgcagtcgoc gatattacgt ttgaaaatat 840
agagctgaaa gacataaggc agtatggtat tgtcattcaa ggcaattatt acaacagtgg 900
accgaaggga gacccactc cttttcccat tcataacctg gttgtcaaca acgtgcacgg 960
tactgtgagc cgtaaaggaa ccaacatcct gatctgggtg gatcctggaa gcgtcagcaa 1020
ttggaaatgg aactcaaag tgtccggagg tcagaaggaa cttggttgta aaggagttcc 1080
aagtggactg aacattcgtt gtggcgagaa ataaggtggt tacgaccact tcatgtaaca 1140
occaattaat g 1151

<210> 30
<211> 823
<212> ADN
<213> *Lygus hesperus*

<220>
<221> misc_feature
<222> (729)..(729)
<223> n e s a , c , g o t

<400> 30

ctcaaaactc aaaggttctc tcaggtatat ctttcagctt cctattcgga ttcaagacta 60
 ttcattaata taagacttaa ggagtacaat aataataaat tcacgattaa ggacaaacga 120
 tccttaatta atgatcctcc ttaattaata cctaacgcac tacocctttt atcacgtcag 180
 gcaataaaaa gttctacacc ttatcaaaaa tcaacaaatt cctcaaaggt accttaggta 240
 tgtatcattt acgtaacaat attacaatgc agaatttgca gccactacag aagggaatcg 300
 caacaactat taagatttca caaggtagac taaacttact tagttacgcc gatttgatag 360
 atgtagaatt atacttagtt attgccgaaa ataaattttt cttcgttaaa aaaccaaata 420
 aaaggtaaca ataaacgtgg gtagagaact aaatcacgaa acgtatatat tagtgattgg 480
 ataataaaga aaattttgaa gtttaaacgt tgcacattta tcacacatct cccaaaatta 540
 tgggagcatc aaattcaatt catacagatt tggtcagtag gtacctaaat gaaattatcg 600
 aggcacatc ctacttgagt gggcatcgaa aacatacata atataataag atgctaacat 660
 ctacagcaga aataaatacc tatattattt tttaaattatg gacaagaaag aaaggtaact 720

 tcaactatng agagtagttt gataacatga gaaatattag taattaatca cgaatgggaa 780
 tttaaaggat tgagatttgg ttacgtacaa tattgtagct ctt 823

5 <210> 31
 <211> 759
 <212> ADN
 <213> *Lygus hesperus*

10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(56)
 <223> n es a, c, g o t

15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (127)..(149)
 <223> n es a, c, g o t

20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (286)..(305)
 <223> n es a, c, g o t

25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (457)..(478)
 <223> n es a, c, g o t

30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (609)..(609)
 <223> n es a, c, g o t

<400> 31

ES 2 644 945 T3

```

nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnntttc      60
aaaagttaa catTTTaaac gcaaccacgc cccccaccc cccacacgac cctcacatcc      120
cccccnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnng tgcgctctgg tggettccgag ggTTTcttct      180
TTTTaaatt tactaagaac aatcaaactt cgatttttct attaccotta cttcctttct      240
tctgatttgg gggTtaaagt tttagaatga ttoggaaaaa tggaannnnn nnnnnnnnnn      300
nnnnntataa ttaaggacaa aatgatttac agatttagcg attaaaagaa atagagtaat      360
cgTTTtgata taattcttta tgTTTTatc tTTTTattc ttggggTTTT tgagtgggat      420
ttTggTTTT tgTTTaaat tttgaaaag gggaatnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnntt      480
tggggaatat actgacaact tgtcacccga tgTtaaagga tTTTaact tttcgTTTT      540
ctTTTgttct ttgggttatt taattTTTT cgaatttatt caaaaattta aaattaatca      600
aattttcgng ggTtattggT tTTTaaacca tTtaaagttt ttataccott tacgtTTTTa      660
ccaatggcgt aacacctgta taaatggTtG aaaatgttat attgtTTTTt tctgttcacG      720
ctttcaccat ttcacattt cataaaacgg gaaagggat      759

```

<210> 32
 <211> 903
 <212> ADN
 <213> *Lygus hesperus*

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (246)..(277)
 <223> n es a, c, g o t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (435)..(450)
 <223> n es a, c, g o t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (664)..(664)
 <223> n es a, c, g o t

<400> 32

ES 2 644 945 T3

```

cgacggcggg cogggccctt ctttctttcc ttctttccgg gttaaaacct tctccttttc      60
cacttcaaaa cacaacacaa taacactccc ctacaagtta aaatggccct catcaacaag      120
tctagccgta aaaaatcaag tatggccact taacaaccac taatttcgac aactcggcat      180
ctaagttact tcgataaaaag aaaatcaact acctactccg taacaatcag atcaaacct      240
atcacnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnncaa taataattta ctcgtgtaat      300
ttcaaacggt ttcaagcttc gagtacgatc gaaccttcgt tctgcgaaat aacagttagg      360
gagttgctcg aataccaacg gggatttcgt ttgagaggtc ggaagcacac gottgctctt      420
gagcagagtg accannnnnn nnnnnnnnnn aagcaagcca aacctcatac ctatacagtt      480
cctcggccct tcgcggaacg gaaggaaggt aaagggcgtg atggaggact tcttggtgtc      540
tgagaacctg tctgggtcga acctctcagg gtcgggaaag tactgggggt cgtggtgcag      600
tgagtagacc gggatgagca cacgtattcc ctctcgatt acgtatttgg tccccggaac      660
agcngtaagg ttttgtgcac acccgagtga gtgtgtggag agtcgggtac ttctgatcgc      720
tttcatttat gacctgatcg agataaggca ttctgtgtaa ggcttggtag ttgagaccgc      780
cgaatttact ggtgacttct tcaatttctc tacggacttt atcttgaatc acttgatggt      840
atgccaattc gtagagggcg taactctgta ctgaatgatg acgtctcgaa aacggcaatg      900
aaa                                                                903

```

<210> 33
 <211> 890
 <212> ADN
 <213> *Lygus hesperus*

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(29)
 <223> n es a, c, g o t

<400> 33

ES 2 644 945 T3

cgnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnnt tccagctttc gagttctttc cgtcacccca 60
 ggttttcccg cacctccgtc cacggttccc ctccgggttc ggtttccctc ggtgtcgcgg 120
 acgaaggagt accggcctct tttcgtttcc gggacaggag gtttctcagt agtgtcagcc 180
 gcaggcttcc gtcgaggttc gagcttcaga ggccctccgcc ggcttttcag caggcttttc 240
 tgtttcgtcg gtggttgatt tgggtggcttc accttcagac gtcgaagggt ttgcgtcatc 300
 gggtttggtt gtcagatctt ccactttggg tttgtcctct ttgttgcac tctcctcaac 360
 ctgagtaggt ttgtcgggtg gcgttggagc gggactgggg gcagcactgg tcgcaggggt 420
 gccactactg ctagctgctt ccccaacact ccgggcagggt ttcagctcgc caagttcctg 480
 ccgctttttg aggatcttcg gcatagaata atatccgttg atatgctcga attcttggac 540
 cttcttcctg atgagtgaca tgacgcctat cctcgtaagg acgtgttgtc gagacaaacc 600
 ttgcgcagga actccgtcag caaaggcttc tgcgttgctc gcacccggct cgcaaagggt 660
 ccgcataaag agggaaacgt aggctttgaa atgtttttcg gactttcctc gaaggctctg 720
 aaccaaccac tgcgaattga acgcctcttg gggaggcatt ccataccgca tgatcgcatt 780
 gaggaaggcc tttctttgcc tggcggtgaa accaaggact tcgatgtttc caccaactct 840
 agcgagaagt ggtggcagag gccggctctt ctcttctcgt ctttcgggtc 890

<210> 34
 <211> 763
 <212> ADN
 <213> *Lygus hesperus*

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (22)..(52)
 <223> n es a, c, g o t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (142)..(166)
 <223> n es a, c, g o t

<400> 34

cctcccgaac ccgcctaaaa annnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnaacgcaaa 60
 tatactacta gtacggactc ggtctggtaa acgctcgggg taccgggcag ctacatgaa 120
 attcgccagt aacgtataca annnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnngaaa tcaggaacga 180
 gtatgttaac gggattcttc ttattttcta tggtcgggtt catggcagca togactcatg 240
 cagaaacccg taggctgagt ggatgcatcc tgtccagtgc tcggcattct tgtggtaccc 300

ttcgggctgt	tttcatctcc	ctgggtgctcc	attgcgttcc	tgcttgtttt	tatttatgat	360
gttggtcatt	gctctcctaa	tocagttttg	tacgatggga	gttttcatca	cgtggatggt	420
tgtcaattgg	tggaattgc	tgatatcgcc	aatggagatg	tttatcctcg	gcgactgcat	480
agtgtactag	ctttgatgat	tctcctgctt	atttcagggc	actatgtaca	tgttccacat	540
actgaattga	tattcggaga	gatccctgta	cctgctgtta	ctgatattat	tcgacggaat	600
tgccatatca	tgaaggcttt	ggaaatctga	cttctagcaa	ccaattctct	aaatgataag	660
ctactaacat	gtggattgtg	tgtagagtca	tctgtgtcga	caacatgctt	gatgtctgca	720
tcaagattgt	cgttatcatt	ctctctcact	ccactctcat	cat		763

<210> 35
 <211> 1929
 <212> ADN
 <213> *Lygus hesperus*

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1920)..(1920)
 <223> n es a, c, g o t

<400> 35

cagaggctgt	atcgtggcaa	cgcaatatct	gctgaacgcg	gaagctgtct	aaatttttog	60
taaggatcat	gctggtaggg	ccccttgagc	gcccatagca	attctatcat	gaatcgacag	120
tattaatggc	cgggtgtgaa	acttaacgct	tccggagctt	cttgaactgg	tagaggaacc	180
gaggtctgcc	ttgcgtgaca	acagggtccc	gcactctcaag	cttcttctta	ttgaattatc	240
tccaaccaac	tctcaaaatg	cgtgagtgca	tcagcgtaca	cgtcggccag	gcgggagttc	300
agatcggtaa	tgctgtctgg	gagctctact	gcttggaaac	tggaattcag	cctgatggac	360
acatgcctgc	agacaagacc	gttgggaagc	gtgatgactc	cttcaacacg	ttttctctctg	420
agactggagc	tggaagcac	gttccccgtg	ctgtctttgt	tgatcttgag	cccactgtcg	480
tcgacgaagt	taggactgga	acttacagac	agctcttcca	ccccgagcaa	ctcatcactg	540
gtaaggaaga	tgctgccaac	aactacgccc	gaggtcacta	cacgatcggg	aaggagatcg	600
tagacgtggt	gctggatagg	atccgcaagc	tgtctgatca	gtgtaccgga	ctccagggtc	660
ttttgatatt	ccactccttc	ggcggcggca	ctggctctgg	atttacctcc	cttcttatgg	720
aacgcctttc	ggttgactac	ggcaagaaat	ccaagctcga	attcgtctgc	taccctgtctc	780
ctcagggtctc	taccgtgttt	gttgaaccct	acaactccat	cctcactacg	cacactaccc	840
tcgagcactc	cgactgcgca	ttcatggctg	acaatgaggc	tatttatgac	atctgccgcc	900
gtaacctgga	tattgagagg	ccgaactaca	ccaacctcaa	caggctgatt	ggtcagatcg	960
tttctcaaat	aacagcctct	cttcgggttcg	atggagccct	taatgtcgac	ctcaccggagt	1020

tccagacgaa cttggtcccc taccacagaa tccacttccc cctcgtaacc tacgcccctg	1080
tcattctcggc cgagaaagcc taccacgaac agctctctgt cggtgagatc accaacgctt	1140
gcttcgagcc cgccaaccag atggtgaaat gcgaccgcgc ccaaggcaag tacatggcct	1200
gctgcatgtt gtacagggtt gatgttgtag ccaaagacgt caacgcgcgc atcgccacca	1260
tcaagaccaa gaggtccatc cagttcgtcg actggtgtcc cactgggttc aaggctggca	1320
tcaactacca gccccccacc gtogttcctg gaggtgactt ggocaaagtc cagcgagccg	1380
tctgcatgtt gtccaacacg accgccatcg ccgaggcctg ggctcgccctc gatcacaagt	1440
togacttgat gtacgccaag cgagcctttg tccactggta cgtcggcgag ggcattggagg	1500
aaggagaatt ctctgaagcc cgagaggatt tggctgccct tgagaaagac tacgaagagg	1560
ttggaatgga ctccgtcgaa ggagatggcg aaggagctga agaatactaa aatctacggt	1620
gtattatatt ttatatgtat tattattcaa aacacgtttc tgtgctatat tacttgtacc	1680
tacgagaatt tcatacaata atgtttgtta atttcgcttt ataaattatt acagttttct	1740
acagatcaaa aaaaaaaaaa aagggcgccc acgcgtccgc ccacgcgtcc ggaccacgc	1800
gtccggcaca actgagtact cattctcacg ccaaagtacg tgactaccat cgcgaaagct	1860
ttttttttac ttacctgaag gtttttttcc actatttatt ttaaagcaga ttaattaan	1920
tggcgtaat	1929

<210> 36
 <211> 3641
 <212> ADN
 <213> *Lygus hesperus*

<400> 36

ccccccccc cccacccca aacataaaaa aaaaaaatt ttcttttttg tgttgggggg	60
gtttgtgggg ccccccccc ccccccccc caaaaaaaa accggagaga aaaaaaaa	120
aaaccttttt tttttgtgag aaaaaattgg ggggggtgtt ttttttttt ttttttttt	180
ccccccctt aaaaaaaggc gcaaaaaaaa aaaaataatt acacccccac aaactccctt	240
ttttttctt tttttttttt gttttggggg gggggggggg gggggggtt tttttaaaaa	300
aaaaaaaaac cccccccaa aaatgggggg tgggtgttta tttttacaaa aacaccctt	360
gggggggggg gggggcccaa aaaaaacccc cgggggtttt ttttttaaaa aaccaccac	420
aaaaaaaaaa ccccccccc ccggggtaat ttttttttta aaaaaacccc cggaaaaaaa	480
aatctcccc cccccaaaa aaccggggtt ttccccccc cccccccaa aaaaattttt	540
tttctcccca ggccctaat tttctggggg ggggtttccc aaaaacccc cccccaaaa	600
aaagtgtttt tccaaaaaaa acccaaaaa aattttttoc cccccccgt ttttaaaaac	660
ccccccccc ccccttttt aaaaaacccc ccctttgggg ccccttttt aaaaaaaa	720

```

ggggggccca aaaattggcc cccccgggg aaatttttaa accccccccc cccttttttt 780
tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 840
tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 900
tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 960
ttttcggtag taaatgttga gtgtaatctc aaacaacaat ataaatatat aaaatcaagt 1020
gcgtaataata taaacaatgt tctgccagaa aagagaaaaa attgggaagg cgaaggagcg 1080
agatcgggag tccaaaatat aagttgcaac aaaaacgaag aaagaatata cgtaaaaaaa 1140
ttactaaacc gggtttaaat taacaaagct caaggaatgt tcgatcgcta agctccagtt 1200
tatgttgtag gggtagaaat agagggaggg aactgccagc tggggatata gtgtacaaaa 1260
caaatataga aaaaacactg cgctctcgag gcgcagaatc accaggctgg ccacacgtct 1320
agtgtgaggg aatgaattcg actttttttt tttggtgag gggggacatt tttgttttgt 1380
gtcgggaatg gggggggggg ggggggggat ttagttttcg tcgatctctt gttcttgctc 1440
ctcgtcgaat tcggcgctct cgctcgcggt ggctcctcg tactgctggt actcggacac 1500
caagtcgttc atgttggaact cggcttcagt gaattccatc tcgtccatgc cctcgccggt 1560
gtaccaatgc aagaaagcct ttctcctgaa catggcagtg aattgctcgg agattctctt 1620
gaagagctcc tggatggcag tggagttgcc gatgaaggtg gcggacattt tgagtcctct 1680
ggggggaatg tcgcacacgg ctgtcttcac gttgttgagg atccattcca cgaagtacga 1740
ggagttcttg ttttgatgt tgagcatctg ctctccact tccttcacg acattcgccc 1800
tctgaaaatg gcggcgacag tgaggtatcg tccgtgtctg gggtcgcaag cggccatcat 1860
gttcttgagg tcgaacatct gctgggtcag ttcggggacg gacagagcgc ggtactgctg 1920
ggaccgcgct gacgtcagag gagcgaatcc tggcatgaag aagtggagtc gcgggaaggg 1980
aaccatgttg acggcgagtt tcctcagatc cgcgttgagc tgacctggga atcggaagca 2040
ggtggtgacg ccggacatgg tgaggctcac gagtggttg aggtcgccgt aagtgggggt 2100
cgacagcttc aacgtcctga agcagatgtc gtagagggct tcgttatcta tgcagtaggt 2160
ctcgtccgtg ttttcgacga gttgatgtac cgagagtggt gcgttgtagg gctccactac 2220
agtgtcggac accttgggag atggtacgac cgagtaagtg ttcatgattc tatcggggtg 2280
ttcttctcgg atttttgaga tcaataacgt tcccatgcca gatccagttc cacctccaag 2340
agagttagtc aattgaaatc cctgtaagca atcacagcct tcggcctctt tcctgacgac 2400
atccaaaacg gcatcaacga gttcagcgcc ctccgtgtag tgacctttgg ccagttggt 2460
tcccgctcca gactgtccga aaacgaagtt gtccggtctg aagagctgac caaagggtcc 2520
tgagcggact gagtccatgg ttccgggttc caagtcaacg aggatggctc tcggtacata 2580
ttttccaccg gatgcttcat tgtaataaac gttgatccgt tcaagctgga ggtcggagtc 2640

```


ES 2 644 945 T3

```

gccgtggtag gaaccggtgg ggtcgatgcc gtgttcgtcg gaaatgattt cccagaactt 2700
ggctccgatc tgggtgccgc actggccggc ctgaatgtgt acgatttccc tcatttcgtg 2760
cgactgcgaa gaaaaatgaa aaaacgagag ctgaaaaatt cgactgaaac gaagcaacgg 2820
cttctgacaa cactgccag acccagtaaa gtaaacaag ctactgttgc tgctgcagta 2880
gttgccacca gaaacgatgc tgttgctgcc gtcagttctg ccaagcaaac cgtggctgct 2940
gaagcttccg ctgcatctt taaagtcaac gccaaagtta cctctgcaa aaataacgta 3000
gcctctgctg ttctctctgc caaggacaag gtttccgctg atgtctctca agctaaagag 3060
aaggcttcag ccaccactgc caaaatcgaa gagaagaaga acgccgctaa agagaaggct 3120
tcagaaatcg ctgccaaaat cgaagagaag accagctctg ccgtcgcagc cgctaaagaa 3180
aatatcagca aagctaaagc cacgcgcgcc aacaagcttg agtccgctaa agagacagct 3240
caagagtata tcaaagaagc aaaagctaaa gctgaagctt tgaaggagaa aatcgctgcc 3300
aacgaaaacg tccaaaaagt ccaagagaaa gtggacgcta tgaagagcta cgtgagccag 3360
gccgtcaacc agaaactgga tgcgcaccct caaatcaaag cacagatcca gaaagctgac 3420
cagaaattgt ctgcacttac cgacaccatc aagagccaaa tgaatgaaaa ggtcccagcc 3480
ctgaaggaga agctcgaatc actcagtgcc agcttcaaac aatccttcga caagaacata 3540
gaaaaggcga aggagatgtt cgcctoctcg taattccatt tacaagggcc acacatgctc 3600
gaaaaatcga gtatccgatg tatataatto aataaaacta c 3641

```

<210> 37
 <211> 1760
 <212> ADN
 <213> *Lygus hesperus*
 <400> 37

ggccggaaag tggggaaaaa agccgttcgg gaaaatcccc tgaaacctgg ccagaagtgg	60
aaccagctg gggaatggcc tgctgatcat ggcggtttg gatgtgatgt tagttgggtg	120
tggaggggtg aggaggaacc cctagcctc gagagaatgg atctctcaga catttgagg	180
cgctgggcga ctggggggat cctcgctaac gtcgctggca atcgcgacac gtccgacttc	240
atatcagaca gcagctcctc cagctgttca gtacctgtgg aggacagcat tggcgggctt	300
gttgccagcc aaactctcct tgctcaggtg ctgatgggac tcggccagac attcgacctc	360
cgcgaacctc gcgttgaggg acatggcagg atggttgagg tctcgctca ggttcaggta	420
agcagctctc ctgagttgct cttgatgac caacgcctgc tccaaaagct tgaacctcct	480
ggcaaggaat ttgttcttga tttogaggaa gtttctttg ccaacgtcca ttttgaatgg	540
ttcggtgatg atcgcgaaac ggatgtcgtt ctgaatgtct tgccagcggc cgtaaccgtg	600
cgtaacaata cctccgagca gccagtaatc atgcctcctg tgccagatct cgtactctcg	660
accgggtacc gcagccttct cttcattctg ccacagagtg tggagtctg taaagcctcc	720
gtcgcgatg ttgaacatga acttctctt ggatttgtct tcttogaagt caggaagctt	780
gactttctcc tcgtcctccg tcttctctg cttttcttct ttgacgacgg attcttcttt	840
ttctcgctcg tcacccctt tttttttttt ttctgttca gctttagggt cttccgtcac	900
ctcaggttcc tcgcaccta cgtocatagg ttctctttg ggtttggtt cttccggtgt	960
tgtggacgaa ggagtatcgg cttctttcgt ttctgggaca ggtggttct cagtagtgtc	1020
agctgcaggc tccgttgagg tttgagctc agaggcctct gccggcttt cagcaggctt	1080
ttctgtttcg tcggtggtg atttggtggc ttcacctca gacgtcgaag gttttgcgtc	1140
atcggtttg gttgtcagat cttccacttt gggtttgtcc tctttgttgt cactatcctc	1200
aacctgagta ggtttgtcgg tgggcgttg agcgggactg ggggcagcac tggtcgcagg	1260
ggtgccacta ctgctagctg cttccccaac actcccgga ggtttcagct cgccaagtcc	1320
ctgccgcttt ttgaggattt cgggcataga ataatatcog ttgatatgct cgaattcttg	1380
gaccttcttc ctgatgagt acatgacgcc tatcctcgta aggacgtgt gtcgagacaa	1440
accttcgcga ggaactccgt cagcaaaggt ctctcggtt tcagcaccog gctcgaaaag	1500
gtgcgcgata aagagggaaa cgtaggcttt gaaatgtttt tcggactttc ctogaaggtc	1560
tcgaaccaac cactgcgaat tgaacgcata ttggggaggc attccatacc gcatgatcgc	1620
attgaggaag gcctttcttt gcctggcgtt gaaaccaagg acttcgatgt ttocaccaac	1680
tttagcgaga agtgggtggc gaggcgggtc tttctctct cgtctttcgg gtgcgctctt	1740
cttcttccata gtaccatcgt	1760

<210> 38
 <211> 1156
 <212> ADN
 <213> *Lygus hesperus*

ES 2 644 945 T3

<400> 38

ggctcttgtc tgtgacctg gtcgtcttct gtaacttttt ctcttcgaat ttttgagttt	60
ttgacttttg tgacattcag taggtactaa aatcacogaa aatggctctc agcgacgcag	120
atgtacaaaa acaaatcaaa cacatgatgg ctttcattga gcaagaagcc aatgaaaaag	180
ccgaagaaat cgatgctaaa gctgaggaag agttcaacat tgaaaagggt cgacttgtac	240
agaaccagcg attgaagatc atggactact acgagaggaa agagaagcaa gtcgagctcc	300
agaagaaaaat ccaatcttcc aacatgttga accaagcgag gctgaaggct ttgaaagtac	360
gtgaagatca cgtaagaaat gtcattggacg atgctcgtaa aaggcttgct cagtcgcgcc	420
aaaatctcca acaatactct gaaatcttga taaaactcgt catgcaagct ctcttccagt	480
tggtggagaa ggaagtcacc ctcaaatca gagaaaagga ccaagacctc atcaacaacc	540
ttgtgcccac gatccaggac aagtacaagg agatctccgg tctcgatatc aagctcaaaa	600
tcgacaactga ctcttctctt cctcccaggt ccagcggagg catcgaactc tatgctctta	660
agaactgcat gaaggtgtcc aacactctcg agagccgtct cgacctgatc gctcaacagc	720
tggtccctca ggtccgaact gctctcttcg gcaggaacct caaccgtaga ttogatgatt	780
agatcctcat tttcaaccca tccactcgag aaattatatc tttacgtata aaattattag	840
actcaggaat cccctccaa actcttgcac taaatttttt cggcttagta ccaaattttg	900
aacaacgttt tcgttatcct attagtgtc agcttgctcc cttccactaa cctaaaacta	960
agcctaggta ccattctaatt tccacatctc tcccccccat atgttttctt aacggggggt	1020
ggaaaattaa aggaaaaaaaa taacattcca cttttccaaa aaaccgggcc cccccccct	1080
taaaaacctc aaaaaaatc ctggtttttt ttaggggggc cccccaaaaa aaattttttt	1140
tgggaaagcc ttaaca	1156

5 <210> 39
 <211> 2928
 <212> ADN
 <213> *Lygus hesperus*

10 <400> 39

ES 2 644 945 T3

cccacgcgtc cgggttggtg gtttggttgg actggacgac attctgcgaa gttaactttg	60
tctacaaata acagattcaa ccatggcttt acccagaatc cgtgatgagg agaaagaatc	120
cagatttgga tatgtattcg cegtttctgg ccctgtcgtc actgcggaga agatgtcggg	180
ggccgctatg tacgagctgg tgcgcgtcgg gtacttcgag ttggtcggcg aaatcattcg	240
tcttgaagga gacatggcca ccattcaggt ctacgaagaa acatccggtg taacagttgg	300
agatccggtg ttgagaactg ggaaaccact ttccggtggag ctccggtccgg gtattatgag	360
cagcattttt gacggtattc agcgaccttt gaaagacatt tgcgagctga ctcagagcat	420
ctacatcccc aaggggagtc aagttccagc tctgtccagg tctattgcat gggacttcac	480
tccgtccaac aatatcaagg tgggagcaca catcactggg ggtgatttgt atgccgtcgt	540
tcacgaaaac acgcttgtca agcaaaaaat gatcatgccg gccagaggaa ggggtaccgt	600
gaaatacatc gctccccctg gcaactacac tgttgatgac gtcgtaatgg aaactgaatt	660
cgacggagag aaaactgaaa tcaagatgtt gcaagtttgg cctgtccgac agccccgtcc	720
agttgccgaa aaactgcctg ctaactatcc actcttgact ggtcaacgag ttttgatgc	780
cctcttcccg tgtgtccaag gtggtaccac cgcattccc ggtgccttcg gctgtggaaa	840
aactgtcatc tcacaagctc tgtccaaata ctcaaactct gacgtcatca tttacgtcgg	900
atgcggtgaa cgtggtaacg aaatgtctga ggtattgaga gatttccccg aactcacagt	960
tgagattgac ggtgtaactg agtccatcat gaagcgtact gctctggtcg ccaacacatc	1020

ES 2 644 945 T3

caacatgcct gtagctgctc gagaagcttc catttatact ggtatcacat tgtccgaata	1080
cttcogtgac atgggttaca acgtgtcgat gatggctgac tccacctctc gatggggcca	1140
agccttgaga gaaatttcag gtcgtctcgc tgaaatgcct gctgacagtg gttaccctgc	1200
ctacttgga gccogtttg cttccttcta cgagcgagct ggtcgtgtca aatgtcttg	1260
aagtcgccgac agagagggct cagtcagtat cgtcgggtgc gtgtcgctc ctgggtgtga	1320
cttttcggat cctgtcactt cagccaccct tggatcgta caggtcttct ggggtctcga	1380
caagaaattg gcacaaagga aacacttccc ctccatcaac tggctcatct cttacagtaa	1440
gtacatgaga gctttggacg acttctatga caaacggtac cctgaattcg tgcccctgag	1500
gaccaaggtc aaggagatcc tccaggagga agaagatttg gctgaaattg tgcagctcgt	1560
cggtaaaggc tcgctggccg agtctgataa gatcacattg gaaatcgcta agatcttgaa	1620
agacgatttc ttgcaacaaa acagctactc gccctacgac agattctgtc cgttctacaa	1680
gacggctcgt atgttgaaga acatgatctc tttctatgat cttgcgaggc acacggtgga	1740
atcaacagca caaagcgaca acaagatcac ttggactgtc atcaaagaaa gcatgggcaa	1800
catcctctac cagctgtcct caatgaaatt caaggacccc gtcaaagacg gagaagccaa	1860
gatcaaaggc gacttogaac agctccacga agacatgcaa caagctttcc gcaacctcga	1920
agaactaaaca gttttctcgt togctacott attgttgaca atagtggcac tacagattaa	1980
cttcagtgca atttttaaca gcaacggcaa atatcctcct cctccccccc ttgaaactca	2040
tactatcgtt acacaatttg tacatataaa aacacgtctg ttgtaattac acataattat	2100
tgtatatctt tcgagggtag tatttgggta gcagataatg aaacttagta actagcgagt	2160
agactacaat attaaaaata ttctgtcaac cccaatcaat tcacgagaaa aaaggggaagc	2220
atttatgatt tgtttttctc gcgagcacat tactttctac gagctgcatt ccaatccttt	2280
aatttcttag tcgtgtcatt tcaacgtgtt caatttattg attgacttgc ttgtatcact	2340
tcggctcagg tttccttctc tcggttaatt gttaagcttt acaagtagag aaaaaaagt	2400
actttttaat tcagtattaa attgtttttt tgtaatatag gtggcgtgtc taatagaaaa	2460
agacaatttg ctccgcttg gcaaaactac aaggaaacata actcttcttg atttgattct	2520
ttcgttgtgt gatatttttc gaagtctact tttccccatt ttcgagcgca aaagcttcgg	2580
tacttaccct ccaaattttg aaaattaata tctgaagtgt gaagatgaac gagttcaact	2640
ggaacaactc ttgggagttt ctaattcaca ggatgtttct gtacctataa cttttaatta	2700
ttttctgttc aggatgtttt taatcaaatt aagattaaat attgtattat attgttgaaa	2760
aagggttttt tttttttggc ttccaagtaa agccagtaat tgtttacatt tccttgaaaa	2820
ctttttgtgt agttagggct actgaacgct ctattatttc tgtgaagggg cagagtaaaa	2880
ataaaatatt ttgaaaagtt gttaaaaaaa aaaaaaaaaa gggggggg	2928

<210> 40
<211> 1894

ES 2 644 945 T3

<212> ADN
<213> Artificial

5 <220>
<223> Sintético

<400> 40

```

gggccgattg agacttttca acaaagggta atatccggaa acctcctcgg attccattgc      60
ccagctatct gtcactttat tgtgaagata gtggaaaagg aagggtggctc ctacaaatgc      120
catcattgog ataaaggaaa ggccatcggt gaagatgcct ctgccgacag tgggtcccaa      180
gatggacccc caccacagag gagcatcggt gaaaaagaag acgttccaac cacgtcttca      240
aagcaagtgg attgatgtga tgggccgatt gagacttttc aacaaagggg aatatccgga      300
aacctcctcg gattccattg ccagctatc tgtcacttta ttgtgaagat agtggaaaag      360
gaaggtggct cctacaaatg ccatcattgc gataaaggaa aggccatcgt tgaagatgcc      420
tctgccgaca gtgggtccaa agatggaccc ccaccacga ggagcatcgt ggaaaaagaa      480
gacgttccaa ccacgtcttc aaagcaagtg gattgatgtg atatctccac tgacgtaagg      540
gatgacgcac aatcccacta tccttcgcaa gacccttcct ctatataagg aagttcattt      600
catttggaga ggacacgctg acaagctgac tctagcagat atcaaacaag tttgtacaaa      660
aaagcagggt ccgcggcgcc ccccttcacc agatctocat ggctatccta gaccttaagt      720
ccctcgtgct gaacgccatt aactactggg gccctaagaa caacaacggc atccagggcg      780
gtgacttcgg ctaccccatc tctgagaagc agatcgacac tagcatcatt accttcaccc      840
accctcgttt gatcccctac gatcttacta tccgcagaa ccttgagacc atcttcacca      900
caacgcaggt gctcaccaat aacactgacc tccagcaatc ccagaccgtg agctttgcga      960
agaagaccac taccacgacc tcaactagca cgaccaacgg ttggacagaa ggaggcaaga      1020
tcagcgacac gctggaggag aaagtctcgg ttagcattcc gttcatcggt gaggggtggcg      1080
ggaagaactc gactaccata gaggccaaact tcgcacacaa ctctagcacc actaccttcc      1140
agcaagcaag cactgacatt gagtggaaca ttagccaacc ggtgctggtt cctccctcta      1200
aacaagttgt cgcgaccctt gtgatcatgg gaggcaactt taccatccct atggacttga      1260
tgaccacgat tgatagtaca gagcactact cccactactc cggttaccct atcctcacct      1320
ggatctcgtc ccagataaac tottactccg gtccctttat gtcatggtac tttgcaaact      1380
ggcctaacct tccgagtgga ttcggccccc tgaatagtga taacacggtc acatacactg      1440
gctctgtcgt gtcccaagtt tcggccgggt tctacgctac cgtccgggtc gatcagtatg      1500
acattcacaa tctccgtact atcgagaaga cttgggtatgc tcgccatgcg acgctgcata      1560

```

ES 2 644 945 T3

```

atggcaagaa gatttctatc aacaatgtca cggaaatggc tccaacatcc cctatcaaga      1620
caaattgagg atccaattcc cgatcggttca aacatttggc aataaagttt cttaagattg      1680
aatcctgttg cgggtottgc gatgattatc atataatttc tgttgaatta cgtaagcat      1740
gtaataatta acatgtaatg catgacgtta tttatgagat gggtttttat gattagagtc      1800
ccgcaattat acatttaata cgcgatagaa aacaaaatat agcgcgcaaa ctaggataaa      1860
ttatcgcgcg cgggtgtcatc tatgttacta gatac                                1894

```

<210> 41
 <211> 340
 <212> PRT
 <213> *Bacillus thuringiensis*

<400> 41

```

Met Ala Ile Met Asn Asp Ile Ala Gln Asp Ala Ala Arg Ala Trp Asp
1          5          10          15

Ile Ile Ala Gly Pro Phe Ile Arg Pro Gly Thr Thr Pro Thr Asn Arg
          20          25          30

Gln Leu Phe Asn Tyr Gln Ile Gly Asn Ile Glu Val Glu Pro Gly Asn
          35          40          45

Leu Asn Phe Ser Val Val Pro Glu Leu Asp Phe Ser Val Ser Gln Asp
          50          55          60

Leu Phe Asn Asn Thr Ser Val Gln Gln Ser Gln Thr Ala Ser Phe Asn
65          70          75          80

Glu Ser Arg Thr Glu Thr Thr Ser Thr Ala Val Thr His Gly Val Lys
          85          90          95

Ser Gly Val Thr Val Ser Ala Ser Ala Lys Phe Asn Ala Lys Ile Leu
          100          105          110

Val Lys Ser Ile Glu Gln Thr Ile Thr Thr Thr Val Ser Thr Glu Tyr
          115          120          125

Asn Phe Ser Ser Thr Thr Thr Arg Thr Asn Thr Val Thr Arg Gly Trp
          130          135          140

Ser Ile Ala Gln Pro Val Leu Val Pro Pro His Ser Arg Val Thr Ala
145          150          155          160

Thr Leu Gln Ile Tyr Lys Gly Asp Phe Thr Val Pro Val Leu Leu Ser
          165          170          175

```

Leu Arg Val Tyr Gly Gln Thr Gly Thr Leu Ala Gly Asn Pro Ser Phe
 180 185 190
 Pro Ser Leu Tyr Ala Ala Thr Tyr Glu Asn Thr Leu Leu Gly Arg Ile
 195 200 205
 Arg Glu His Ile Ala Pro Pro Ala Leu Phe Arg Ala Ser Asn Ala Tyr
 210 215 220
 Ile Ser Asn Gly Val Gln Ala Ile Trp Arg Gly Thr Ala Thr Thr Arg
 225 230 235 240
 Val Ser Gln Gly Leu Tyr Ser Val Val Arg Ile Asp Glu Arg Pro Leu
 245 250 255
 Ala Gly Tyr Ser Gly Glu Thr Arg Thr Tyr Tyr Leu Pro Val Thr Leu
 260 265 270
 Ser Asn Ser Ser Gln Ile Leu Thr Pro Gly Ser Leu Gly Ser Glu Ile
 275 280 285
 Pro Ile Ile Asn Pro Val Pro Asn Ala Ser Cys Lys Lys Glu Asn Ser
 290 295 300
 Pro Ile Ile Ile His His Asp Arg Glu Lys His Arg Glu Arg Asp Tyr
 305 310 315 320
 Asp Lys Glu His Ile Cys His Asp Gln Ala Glu Lys Tyr Glu Arg Asp
 325 330 335
 Tyr Asp Lys Glu
 340

<210> 42
 <211> 2101
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 42

ggtccgattg agacttttca acaaagggtg atatccggaa acctcctcgg attccattgc 60
 ccagctatct gtcactttat tgtgaagata gtggaaaagg aagggtggctc ctacaaatgc 120
 catcattgcg ataaaggaaa ggccatcggt gaagatgcct ctgccgacag tgggtcccaaa 180
 gatggacccc cacccacgag gagcatcgtg gaaaaagaag acgttccaac caggtcttca 240

aagcaagtgg attgatgtga tgggtccgatt gagacttttc aacaaagggg aatatccgga	300
aacctcctcg gattccattg ccagctatc tgtcacttta ttgtgaagat agtggaagaa	360
gaaggtggct cctacaaatg ccatcattgc gataaaggaa aggccatcgt tgaagatgcc	420
tctgccgaca gtgggtccaa agatggaccc ccacccacga ggagcatcgt ggaaaaagaa	480
gacgttccaa ccacgtcttc aaagcaagtg gattgatgtg atatctccac tgacgtaagg	540
gatgacgcac aatccacta tccttcgcaa gacccttcct ctatataagg aagttcattt	600
catttgagaa ggacacagaa acattcgcaa aaacaaaatc ccagtatcaa aattcttctc	660
tttttttcat atttcgcaa gatttaaaaa gatctgctag aaataatttt gtttaacttt	720
aagaaggaga tatatccatg ggcgaagta gcagaatctg caatgggtgtg cagaacccat	780
ctcttatctc caatctctcg aaatccagtc aacgcaaatc tcccttatcg gtttctctga	840
agacgcagca gcatccacga gcttatccga tttcgtcgtc gtggggattg aagaagagtg	900
ggatgacgtt aattggctct gagcttcgtc ctcttaaggt catgtcttct gtttccacgg	960
cgtgcatggc tatcctagac cttaagtccc tcgtgctgaa cgccattaac tactggggcc	1020
ctaagaacaa caacggcatc cagggcggtg acttcggcta ccccatctct gagaagcaga	1080
tcgacactag catcattacc ttcacccacc ctgcgttgat cccctacgat ottactatcc	1140
cgacagaacct tgagaccatc ttcaccacaa cgcaggtgct caccaataac actgacctcc	1200
agcaatccca gaccgtgagc tttgcgaaga agaccactac cagcacctca actagcacga	1260
ccaacgggtg gacagaagga ggcaagatca ggcacacgct ggaggagaaa gtttcggtta	1320
gcattccggt catcgggtgag ggtggcggtg agaactcgac taccatagag gccaaactcg	1380
cacacaactc tagcaccact accttcacgc aagcaagcac tgacattgag tggaacatta	1440
gccaaacggg gctgggtccct cctctaaac aagttgtcgc gacccttgtg atcatgggag	1500
gcaactttac catccctatg gacttgatga ccacgattga tagtacagag cactactccc	1560
actactccgg ttaccctatc ctacactgga tctcgtcccc agataactct tactccggtc	1620
cctttatgtc atggtacttt gcaaaactggc ctaaccttcc gaggggattc ggcccactga	1680
atagtataaa caggttcaca tacactggct ctgtcgtgtc ccaagtttcg gccggtgtct	1740
acgctaccgt ccggttcgat cagtatgaca ttcacaatct ccgtactatc gagaagactt	1800
ggtatgctcg ccattgcgac ctgcataatg gcaagaagat ttctatcaac aatgtcacgg	1860
aaatggctcc aacatccctt atcaagacaa attgaggatc caaatcacca gtctctctct	1920
acaaatctat ctctctctat ttttctccag aataatgtgt gagtagttcc cagataaggg	1980
aattagggtt cttatagggt ttgcgtcatg tgttgagcat ataagaaacc cttagtatgt	2040
atttgtattt gtaaaatact tctatcaata aaattttctaa ttcctaaaac caaaatccag	2100
t	2101

<210> 43
 <211> 1873
 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Sintético

5

<400> 43

```

gggccgattg agacttttca acaaagggtg atatccggaa acctcctcgg attccattgc      60
ccagctatct gtcactttat tgtgaagata gtggaaaagg aaggtggctc ctacaaatgc      120
catcattgcg ataaaggaaa ggccatcgtt gaagatgcct ctgccgacag tgggcccaaa      180
gatggacccc caccacagag gagcatcgtg gaaaaagaag acgttccaac cacgtcttca      240
aagcaagtgg attgatgtga tgggccgatt gagacttttc aacaaagggt aatatccgga      300
aacctcctcg gattccattg ccagctatc tgtcacttta ttgtgaagat agtggaaaag      360
gaaggtggct cctacaaatg ccatcattgc gataaaggaa aggccatcgt tgaagatgcc      420
tctgccgaca gtgggcccaa agatggaccc ccaccacga ggagcatcgt ggaaaaagaa      480
gacgttccaa ccacgtcttc aaagcaagtg gattgatgtg atatctccac tgacgtaagg      540
gatgacgcac aatcccacta tccttcgcaa gacccttcct ctatataagg aagttcattt      600
catttgagaga ggacacagaa acattcgcaa aaacaaaatc ccagtatcaa aattcttctc      660
tttttttcat atttcgcaa gatttaaaaa gatctgctag aaataatttt gtttaacttt      720
aagaaggaga tatatccatg gctatcctag accttaagtc cctcgtgctg aacgccatta      780
actactgggg ccctaagaac aacaacggca tccagggcgg tgacttcggc taccctatct      840
ctgagaagca gatcgacact agcatcatta ccttcacca cctcgccttg atcccctacg      900
atcttactat cccgcagaa cttgagacca tcttcaccac aacgcagggt ctcaccaata      960
acactgacct ccagcaatcc cagaccgtga gctttgcgaa gaagaccact accacgacct     1020
caactagcac gaccaacggt tggacagaag gaggcaagat cagcgacacg ctggaggaga     1080
aagtttcggt tagcattccg ttcatcgggt aggggtggcg gaagaactcg actaccatag     1140
aggccaactt cgcacacaac tctagacca ctaccttcca gcaagcaagc actgacattg     1200
agtggaacat tagccaaccg gtgctggttc ctccctctaa acaagttgtc gcgacccttg     1260
tgatcatggg aggcaacttt accatcccta tggacttgat gaccacgatt gatagtacag     1320
agcactactc ccaactactc ggttaccta toctcacctg gatctcgtcc ccagataact     1380
cttactccgg tccctttatg tcatggtact ttgcaaactg gcctaacctt ccgagtggat     1440
tcggcccact gaatagtgat aacacggtca catacactgg ctctgtcgtg tcccaagttt     1500
cggccgggtg ctacgctacc gtccggttcg atcagtatga cattcacaat ctccgtacta     1560

```

ES 2 644 945 T3

tcgagaagac ttggtatgct cgccatgcga cgctgcataa tggcaagaag atttctatca	1620
acaatgtcac ggaaatggct ccaacatccc ctatcaagac aaattgagga tccaaatcac	1680
cagtctctct ctacaaatct atctctctct atttttctcc agaataatgt gtgagtagtt	1740
occagataag ggaattaggg ttcttatagg gtttcgctca tgtgttgagc atataagaaa	1800
cccttagtat gtatttgtat ttgtaaaata cttctatcaa taaaatttct aattcctaaa	1860
acccaaatcc agt	1873

<210> 44
<211> 930
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 44

atggcaattt tagatttaaa atcttttagta ctcaatgcaa taaattattg gggtcctaaa	60
aataataatg gcatacaggg tgggtatttt ggttacccta tatcagaaaa acaaatagat	120
acgtctatta taacttttac tcatcctogt ttaattocat atgatttaac aattcctcaa	180
aatttagaaa ctatttttac tacaactcaa gtattaacaa ataatacaga ttacaacaa	240
agtcaaactg tttcttttgc taaaaaaaca acgacaacaa cttcaacttc aactacaaat	300
ggttggacag aaggtgggaa aatttcagat acattagaag aaaaagtaag tgtatctatt	360
ccttttattg gagagggagg aggaaaaaac agtacaacta tagaagctaa ttttgcacat	420
aactctagta ctactacttt tcaacaggct tcaactgata tagagtggaa tatttcacaa	480
ccagtattgg ttccccaag taaacaagtt gtagcaacat tagttattat gggaggtaat	540
tttactatto ctatggattt gatgactact atagattcta cagaacatta tagccattat	600
agtggttatc caatattaac atggatatcg agccccgata atagttatag tgggccattt	660
atgagttggg attttgcaaa ttggcccaat ttaccatcgg ggtttgggcc tttaaattca	720
gataatacgg tcaacttatac aggttctgtt gtaagtcaag tatcagctgg tgtatatgcc	780
actgtacgat ttgatcaata tgatatacac aatttaagga caattgaaaa aacttggtat	840
gcacgacatg caactcttca taatggaaag aaaatatcta taaataatgt tactgaaatg	900
gcaccaacaa gtccaataaa aacaaattaa	930

<210> 45
<211> 930
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 45

ES 2 644 945 T3

atggctatcc tcgatcttaa gtcctctggt ctgaacgcta tcaactactg gggccccaag	60
aacaataacg gtattcaggg cggtgacttc ggctacccta tctctgagaa gcagattgat	120
acttccatta ttaccttcac tcattcctagg cttattccct atgacctgac tattccacag	180
aatctggaga ctatcttcac taccacgcag gtgcttacta acaacactga cttgcaacag	240
tctcagactg ttagcttgc caagaagact accactacaa cctccacttc taccacaaac	300
gggtggactg aggtggcaa gatcagcgac actctogaag agaaggtgtc agtctctatc	360
cccttcattg gcgaggcggt tggaaagaac tctactacta ttgaagcgaa cttcgctcat	420
aattcttcca ctaccacttt ccaacaggca tctactgaca tagaatggaa catctctcaa	480
cgggtccttg tgcctccctc taaacagggt gttgccactc tcgttatcat ggggtggcaac	540
ttcactattc ctatggatct tatgactacc attgactcta ctgagcatta ctctcactac	600
tctggctacc ccattctcac ttggatctct tctcctgaca atagctactc cgggtccattc	660
atgtcatggt acttcgctaa ctggccgaat ctcccttctg gctttggtcc tottaactct	720
gataaactg tgacctacac tggctctgtc gtcagtcagg tctctgccgg tgtgtacgca	780
actgttcgct tcgatcagta tgacatccat aatctcagga ctattgagaa gacctggtac	840
gctcgctcatg cgacgcttca caacggcaag aagatcagca tcaataacgt gacagaaatg	900
gccctacca gccgatcaa gactaactga	930

5 <210> 46
 <211> 930
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Sintético
 <400> 46

ES 2 644 945 T3

```

atggctatcc tggacttgaa atcccttggt ctcaacgcta tcaactattg gggccctaaa      60
aacaacaacg gaatccaggg cgggtgacttt ggatacccca tctctgagaa acagatcgac      120
acttccatca ttacattcac ccatccacgt cttatccctt acgatcttac cattcctcag      180
aatcttgaga ccatcttcac aactactcag gtgttgacta acaacacaga cctccagcag      240
tcccaaacgg ttctctttgc gaagaaaacg actaccacga caagtacttc gactactaat      300
ggttggacag aggggtggcaa aatctcagac actctggagg agaaagtgag cgtgtctatc      360
ccattcattg gggagggagg tgggaagaac tctacaacca tcgaggcaaa ctctcgctcac      420
aatagtagca caaccacott ccagcaagct tccaccgaca tcgaatggaa catctcacia      480
ccggttctcg tccctccctc taagcaggtc gtcgcaaccc tcgtcatcat gggaggcaac      540
ttcactatcc ctatggatct catgactacc attgattcta cogaacatta ctcacattac      600
agcggttatc ctatcctcac ctggatctca tcccttgata actcatacag cggcccattc      660
atgtcatggt acttcgcaaa ctggcccaac cttccatcag gatttggtcc actaaacagc      720
gataaacaccg tcacttacac tggttccgtg gtctcccagg tttctgctgg cgtttatgca      780
acagtgcgtt tcgatcaata cgacattcat aacctcagga ccatcgagaa gacttggtac      840
gcaaggcacg ctacacttca caatggcaag aagatttcca tcaacaacgt cactgaaatg      900
gcacctacct ctccgatcaa gactaactga      930

```

<210> 47
 <211> 930
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 47

ES 2 644 945 T3

atggccatcc tggacctgaa gagcctcgtg ctgaacgcta tcaactactg gggccctaag	60
aacaacaatg gtatccaagg tggcgacttc ggctaccca tcagcgagaa gcagatcgac	120
acgagcatca tcaogttcac ccatccgccc ctcattccgt acgacctcac catcccgag	180
aacctggaga ccatcttcac gacgaccag gtgctcacca acaacacgga tctccagcag	240
tgcgagaccg tgagcttcgc gaagaagacc actaccacga cctccacgag caccacgaac	300
ggctggaccg aaggaggcaa gatcagcgac accctggagg agaagggtgc cgtgtcgatc	360
cccttcacgc gcgagggcgg cggcaagaac tccaccacca tcgaagcgaa cttcgccac	420
aactccagca ccaactacct ccagcaggcc tcgaccgaca tcgaatggaa catcagccaa	480
ccggtcctgg tcccgccctc caagcagggtg gtggcgagcc tcgtcatcat gggcgggaa	540
ttcaccatcc cgatggatct tatgaccacc atcgacagca ccgagcatta ctgcactac	600
tggggctacc cgatcctcac ctggatctcg tccccgaca actcgtagag cggcccgctc	660
atgtcctggt acttcgcgaa ctggcctaac ctcccagcg ggttcggccc gctgaacagc	720
gacaacacag tgacctacac cggcagcgtg gtctcccagg tgcgggctgg ggtgtacgg	780
accgtccgct tcgatcagta cgacatccac aacctccgca ctatcgagaa gacatggtac	840
gcgaggcacg cgaccctcca caacggcaag aagatcagca tcaacaacgt gaccgagatg	900
gccccgactt ctcccatcaa gaccaactga	930

<210> 48
 <211> 930
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 48

ES 2 644 945 T3

atggccatcc tggacctgaa gagcctcgtg ctgaacgcta toaactactg gggccctaag	60
aacaacaatg gtatccaagg tggcgacttc ggctacocca tcagcgagaa gcagatogac	120
acgagcatca tcacgttcac ccacccgggc ctcatcccggt acgacctcac catcccgag	180
aacctggaga ccaccttcac gacgaccag gtgctcacca acaacacgga tctccagcag	240
tcgcagacgg tgagcttcgc gaagaagacc actaccacga cctccacgag caccacgaac	300
ggctggacgg aaggaggcaa gatcagcgac accctggagg agaaggtgtc cgtgtcgatc	360
cccttcacgg gcgagggcgg cggcaagaac tccaccacca tcgaagcgaa cttcgccac	420
aactccagca ccactacctt ccagcaggcc tcgaccgaca tcgaatggaa catcagccaa	480
ccggtgctgg ttccctccctc taaacaagtt gtgcgcgacc ttgtgatcat gggaggcaac	540
tttaccatcc ctatggactt gatgaccacg attgatagta cagagcacta ctcccactac	600
tcgggttacc ctatcctcac ctggatctcg tcccagata actcttactc cggtcctttt	660
atgtcatggg actttgcaaa ctggcctaac cttccgagtg gattcggccc actgaatagt	720
gataaacagg tcacatacac tggctctgtc gtgtoccaaag tttcggccgg tgtctacgct	780
accgtccggg tcgatcagta tgacattcac aatctccgta ctatcgagaa gacttggtat	840
gctcgccatg cgacgctgca taatggcaag aagatttcta tcaacaatgt cacggaaatg	900
gtccaacat cccctatcaa gacaaattga	930

<210> 49
 <211> 930
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 49

ES 2 644 945 T3

atggccatcc tggacctgaa gagcctcgtg ctgaacgcta tcaactactg gggccctaag	60
aacaacaatg gtatccaagg tggcgacttc ggctacccca tcagcgagaa gcagatcgac	120
acgagcatca tcacgttcac ccattccgcgc ctcatcccggt acgacctcac catcccgag	180
aacctggaga ccatcttcac gacgacctag gtgctcacca acaacacgga tctccagcag	240
tgcgagaacg tgagcttcgc gaagaagacc actaccacga cctccacgag caccacgaac	300
ggctggaccc aaggaggcaa gatcagcgac accctggagg agaaggtgtc cgtgtcgatc	360
cccttcacgc gcgagggcgg cggcaagaac tccaccacca tcgaagcgaa cttcgccac	420
aactccagca ccactacctt ccagcaggcc tcgacgcaga tcgaatggaa catcagccaa	480
ccggtccttg tgctccctc taaacagggt gttgccaact tcgttatcat ggggtggcaac	540
ttcactattc ctatggatct tatgactacc attgactcta ctgagcatta ctctcactac	600
tctggctacc ccattctcac ttggatctct tctcctgaca atagctactc cgggtccattc	660
atgtcatggt acttcgctaa ctggcogaat ctccctcttg gctttgggtc tcttaactct	720
gataaactg tgacctacac tggctctgtc gtcagtcagg tctctgcggg tgtgtacgca	780
actgttcgct tcgatcagta tgacatccat aatctcagga ctattgagaa gacctggtac	840
gctcgtcatg cgacgcttca caacggcaag aagatcagca tcaataacgt gacagaaatg	900
gcccctacca gcccgatcaa gactaactga	930

<210> 50
 <211> 930
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 50

ES 2 644 945 T3

```

atggccatcc tggacctgaa gagcctcgtg ctgaacgcta tcaactactg gggccctaag      60
aacaacaatg gtatccaagg tggcgacttc ggctacccca tcagcgagaa gcagatcgac      120
acgagcatca tcacgttcac ccacccgcgc ctcatcccggt acgacctcac catcccgag      180
aacctggaga ccacgttcac gacgacctcag gtgctcacca acaacacgga tctccagcag      240
tcgcagaccg tgagcttcgc gaagaagacc actaccacga cctccacgag caccacgaac      300
ggctggaccg aaggaggcaa gatcagcgac accctggagg agaaggtgtc cgtgtcgatc      360
cccttcacgc gcgagggcgg cggcaagaac tccaccacca tcgaagcgaa cttcgccac      420
aactccagca ccactacctt ccagcaggcc tcgaccgaca tcgaatggaa catcagccaa      480
ccggtttctc tccctccctc taagcaggtc gtgcgaacct tcgtcatcat gggaggcaac      540
ttcactatcc ctatggatct catgactacc attgattcta ccgaacatta ctcacattac      600
agcggttatc ctatcctcac ctggatctca tccctgata actcatacag cggcccatc      660
atgtcatggt acttcgcaa ctggcccaac cttccatcag gatttggtcc actaaacagc      720
gataacaccg tcacttacac tggttccgtg gtctccagg tttctgctgg cgtttatgca      780
acagtgcggt tcgatcaata cgacattcat aacctcagga ccatcgagaa gacttggtac      840
gcaaggcacg ctacacttca caatggcaag aagatttcca tcaacaacgt cactgaaatg      900
gcacctacct ctccgatcaa gactaactga      930

```

<210> 51
 <211> 930
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 51

ES 2 644 945 T3

atggctatcc tagacottaa gtccctcgtg ctgaacgcca ttaactactg gggccctaag	60
aacaacaacg gcatccaggg cgggtgacttc ggctaccoca tctctgagaa gcagatcgac	120
actagcatca ttaccttcac ccaccctcgc ttgatccoct acgatcttac tatcccgag	180
aaccttgaga ccatcttcac cacaacgcag gtgctcacca ataactactga cctccagcaa	240
tcccagaccg tgagctttgc gaagaagacc actaccacga cctcaactag cagaccaac	300
ggttggacag aaggaggcaa gatcagcgac acgctggagg agaaagtctt ggttagcatt	360
ccgttcctcg gtgaggggtg cgggaagaac tcgactacca tagaggccaa ctctgcacac	420
aactctagca ccactacctt ccagcaagca agcactgaca ttgagtggaa cattagccaa	480
ccggtccttg tgcctccctc taaacagggt gttgccactc tcgttatcat ggggtggcaac	540
ttcactattc ctatggatct tatgactacc attgactcta ctgagcatta ctctcactac	600
tctggctacc ccattctcac ttggatctct tctcctgaca atagctactc cgggtccattc	660
atgtcatggt acttcgctaa ctggccgaat ctcccttctg gctttgggtcc tcttaactct	720
gataaactg tgacctacac tggctctgtc gtcagtcagg tctctgccgg tgtgtacgca	780
actgttcgct togatcagta tgacatccat aatctcagga ctattgagaa gacctggtag	840
gctcgtcatg cgacgcttca caacggcaag aagatcagca tcaataacgt gacagaaatg	900
gccctacca gcccgatcaa gactaactga	930

<210> 52
 <211> 930
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 52

ES 2 644 945 T3

atggctatcc tagaccttaa gtccctcgtg ctgaacgcc a ttaactactg gggccctaag	60
aacaacaacg gcatccaggg cggtgacttc ggctacccca tctctgagaa gcagatcgac	120
actagcatca ttaccttcac ccacctcgc ttgatccct acgatcttac tatcccgag	180
aacottgaga ccatcttcac cacaacgcag gtgctcacca ataactga cctccagcaa	240
tcccagaccg tgagctttgc gaagaagacc actaccacga cctcaactag cagaccaac	300
ggttggacag aaggaggcaa gatcagcgac acgctggagg agaaagtctt ggtagcatt	360
ccgttcacog gtgaggggtg cgggaagaac tcgactacca tagaggccaa cttcgcacac	420
aactctagca ccactacctt ccagcaagca agcactgaca ttgagtggaa cattagccaa	480
ccggtttctg tccctccctc taagcaggtc gtcgcaaccc tcgtcatcat gggaggcaac	540
ttcactatcc ctatggatct catgactacc attgattcta ccgaacatta ctacattac	600
agcggttatc ctatcctcac ctggatctca tccctgata actcatacag cggccattc	660
atgtcatggt acttcgcaa ctggccaac cttccatcag gatttggtcc actaaacagc	720
gataacaccg tcacttacac tggttccgtg gtctcccagg tttctgctgg cgtttatgca	780
acagtgcgtt togatcaata cgacattcat aacctcagga ccatogagaa gacttggtac	840
gcaaggcacg ctacacttca caatggcaag aagatttcca tcaacaacgt cactgaaatg	900
gcacctacct ctccgatcaa gactaactga	930

<210> 53
 <211> 930
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 53

ES 2 644 945 T3

atggctatcc tagaccttaa gtccctcgtg ctgaacgcca ttaactactg gggccctaag	60
aacaacaacg gcatccaggg cgggtgacttc ggctacccca tctctgagaa gcagatcgac	120
actagcatca ttaccttcac ccacctcgc ttgatccctt acgatcttac tatcccgag	180
aaccttgaga ccatcttcac cacaacgcag gtgtcacca ataactga cctccagcaa	240
tcccagaccg tgagctttgc gaagaagacc actaccacga cctcaactag cacgaccaac	300
ggttgagacg aaggaggcaa gatcagcgac acgctggagg agaaagtctt ggtagcatt	360
ccgttcacgt gtgagggtgg cgggaagaac tcgactacca tagaggccaa ctgcgcacac	420
aactctagca ccactacctt ccagcaagca agcactgaca ttgagtggaa cattagccaa	480
ccggtcctgg tcccgcctc caagcaggtg gtggcgacgc tcgtcatcat gggcggaac	540
ttcaccatcc cgatggatct tatgaccacc atcgacagca ccgagcatta ctgcgactac	600
tcgggctacc cgatcctcac ctggatctcg tccccgaca actcgtacag cggcccgctt	660
atgtcctggt acttcggaa ctggcctaac ctcccagcg ggttcggccc gctgaacagc	720
gacaacacag tgacctacac cggcagcgtg gtctcccagg tgtcggctgg ggtgtacgg	780
accgtcogct tcgatcagta cgacatccac aacctccgca ctatcgagaa gacatggtac	840
gcgaggcacg cgacctcca caacggcaag aagatcagca tcaacaacgt gaccgagatg	900
gccccgactt ctcccatcaa gaccaactga	930

<210> 54
 <211> 2101
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 54

ES 2 644 945 T3

ggtccgattg agacttttca acaaagggtg atatccggaa acctcctcgg attccattgc	60
ccagctatct gtcactttat tgtgaagata gtggaaaagg aaggtggctc ctacaaatgc	120
catcattgcg ataaaggaaa ggccatcgtt gaagatgcct ctgccgacag tggccccaaa	180
gatggacccc caccacagag gagcatcgtg gaaaaagaag acgttccaac cacgtcttca	240
aagcaagtgg attgatgtga tggccgatt gagacttttc aacaaagggt aatatccgga	300
aacctcctcg gattccattg ccagctatc tgtcacttta ttgtgaagat agtggaaaag	360
gaaggtggct cctacaaatg ccatcattgc gataaaggaa aggccatcgt tgaagatgcc	420
tctgccgaca gtggtcccaa agatggaccc ccaccacga ggagcatcgt ggaaaaagaa	480
gacgttccaa ccacgtcttc aaagcaagtg gattgatgtg atatctccac tgacgtaagg	540
gatgacgcac aatccacta tccttcgcaa gaccttctc ctatataagg aagttcattt	600
catttgagga ggacacagaa acattcgcaa aaacaaaatc ccagtatcaa aattcttctc	660
tttttttcat atttcgcaa gatttaaaaa gatctgctag aaataatttt gtttaacttt	720
aagaaggaga tatatccatg gcgcaagtta gcagaatctg caatggtgtg cagaacccat	780
ctcttatctc caatctctcg aaatccagtc aacgcaaatc tcccttatcg gtttctctga	840
agacgcagca gcattccaga gcttatccga tttcgtcgtc gtggggattg aagaagagtg	900
ggatgacgtt aattggctct gagcttcgtc ctcttaaggt catgtcttct gtttccacgg	960
cgtgcatggc tatcctagac ctttaagtcc tcgtgctgaa cgcattaac tactggggcc	1020
ctaagaacaa caacggcatc cagggcgggtg acttcggcta ccccatctct gagaagcaga	1080
tcgacactag catcattacc ttcacccacc ctgccttgat cccctacgat ctactatcc	1140
cgcagaacct tgagaccatc ttcaccacaa cgcaggtgct caccaataac actgacctcc	1200
agcaatocca gaccgtgagc tttgcgaaga agaccactac cacgacctca actagcacga	1260
ccaacgggtg gacagaagga ggcaagatca gcgacacgct ggaggagaaa gtttcggtta	1320
gcattccggt catcgggtgag ggtggcggga agaactcgac taccatagag gccaaactcg	1380
cacacaactc tagcaccact accttcagc aagcaagcac tgacattgag tggaacatta	1440
gccaacgggt gctggttctt cctctaaac aagttgtgc gaccttgtg atcatgggag	1500
gcaactttac catccctatg gacttgatga ccacgattga tagtacagag cactactccc	1560
actactccgg ttacctatc ctacctgga tctcgtcccc agataactct tactccggtc	1620
cctttatgtc atggtacttt gcaaactggc ctaaccttcc gagtggattc ggccactga	1680
atagtataa cacggtcaca tacactggct ctgctcgtgc ccaagtttcg gccggtgtct	1740
acgctaccgt ccggttcgat cagtatgaca ttcacaatct ccgtactatc gagaagactt	1800
ggtatgctcg ccatgcgacg ctgcataatg gcaagaagat ttctatcaac aatgtcacgg	1860

ES 2 644 945 T3

aaatggctcc aacatccct atcaagacaa attgaggatc caaatcacca gtctctctct	1920
acaaatctat ctctctctat tttctccag aataatgtgt gagtagttcc cagataaggg	1980
aattaggggt cttatagggt ttctctcatg tgttgagcat ataagaaacc cttagtatgt	2040
atttgtatctt gtaaaatact tctatcaata aaattttctaa ttcttaaaac caaaatccag	2100
t	2101

<210> 55
 <211> 1873
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 55

ggtccgattg agacttttca acaaagggtg atatccggaa acctcctcgg attccattgc	60
ccagctatct gtcactttat tgtgaagata gtggaaaagg aagggtggctc ctacaaatgc	120
catcattgag ataaaggaaa ggccatcggt gaagatgcct ctgccgacag tgggtcccaa	180
gatggacccc caccacgag gagcatcggt gaaaaagaag acgttccaac cacgtcttca	240
aagcaagtgg attgatgtga tgggtccgatt gagacttttc acaaagggt aatatccgga	300
aacctcctcg gattccattg ccagctatc tgtcacttta ttgtgaagat agtggaaaag	360
gaagggtggct cctacaaatg ccattcattgc gataaaggaa aggccatcgt tgaagatgcc	420
tttgccgaca gtgggtccaa agatggaccc ccaccacga ggagcatcgt ggaaaaagaa	480
gacgttccaa ccacgtcttc aaagcaagtg gattgatgtg atatctccac tgacgtaagg	540
gatgacgcac aatcccacta tccttcgcaa gacccttctt ctatataagg aagttcattt	600
catttgagaga ggacacagaa acattcgcaa aaacaaaatc ccagtatcaa aattcttctc	660
tttttttcoat atttcgcaa gatttaaaaa gatctgctag aaataatttt gtttaacttt	720
aagaaggaga tatatccatg gctatcctag accttaagtc cctcgtgctg aacgccatta	780
actactgggg ccctaagaac aacaacggca tccaggggcg tgacttcggc taccocatct	840
ctgagaagca gatcgacact agcatcatta cttcaccca cctcgtctg atcccctacg	900
atcttactat cccgcagaac cttgagacca tcttcaccac aacgcagggt ctcaccaata	960
acactgacct ccagcaatcc cagaccgtga gctttgcgaa gaagaccact accacgacct	1020
caactagcac gaccaacggt tggacagaag gaggcaagat cagcgacacg ctggaggaga	1080
aagtttcgggt tagcattccg ttcatcggtg aggggtggcg gaagaactcg actaccatag	1140
aggccaactt cgcacacaac totagacca ctacctcca gcaagcaagc actgacattg	1200
agtggaacat tagccaaccg gtgctgggtc ctccctctaa acaagttgtc gcgacccttg	1260
tgatcatggg aggcaacttt accatcccta tggacttgat gaccacgatt gatagtacag	1320

ES 2 644 945 T3

```

agcactactc ccactactcc ggttacccta tcctcacctg gatctcgtcc ccagataact 1380
cttactccgg tccctttatg tcatgggtact ttgcaaaactg gcctaacctt ccgagtggat 1440
tcggcccact gaatagtgat aacacgggtca catacactgg ctctgtcgtg tcccaagttt 1500
cggccgggtgt ctacgotacc gtccgggttcg atcagtatga cattcacaat ctccgtacta 1560
tcgagaagac ttggtatgct cgccatgcga cgctgcataa tggcaagaag atttctatca 1620
acaatgtcac ggaaatggct ccaacatccc ctatcaagac aaattgagga tocaaatacac 1680
cagtctctct ctacaaatct atctctctct atttttctcc agaataatgt gtgagtagtt 1740
cccagataag ggaattaggg ttcttatagg gtttcgctca tgtgttgagc atataagaaa 1800
cccttagtat gtatttgtat ttgtaaaata cttctatcaa taaaatttct aattcctaaa 1860
acaaaaatcc agt 1873

```

<210> 56
 <211> 2870
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 56

```

gaagttgaag acaaaagaag gtcttaaato ctggctagca aactgaact atgccagaaa 60
ccacatcaaa gatatgggca agcttcttgg occattatat ccaaagacct cagagaaagg 120
tgagcgaagg ctcaattcag aagattggaa gctgatcaat aggatcaaga caatgggtgag 180
aacgcttcca aatctcacta ttccaccaga agatgcatac attatcattg aaacagatgc 240
atgtgcaact ggatggggag cagtatgcaa gtggaagaaa aacaaggcag acccaagaaa 300
tacagagcaa atctgtaggt atgccagtgg aaaatttgat aagccaaaag gaacctgtga 360
tgagaaaaat tatgggggta tgaatggott agaaaagatg agattgttct acttggacaa 420
aagagagatc acagtcagaa ctgacagtag tgcaatcgaa aggttctaca acaagagtgc 480
tgaacacaag ctttctgaga tcagatggat caggttcatg gactacatca ctggtgcagg 540
accagagata gtcattgaac acataaaagg gaagagcaat ggtttagctg acatcttgtc 600
caggctcaaa gccaaattag ctcagaatga accaacggaa gagatgatcc tgcttacaca 660
agccataagg gaagtaattc cttatccaga tcatccatac actgagcaac tcagagaatg 720
gggaaacaaa attctggatc cattccccac attcaagaag gacatgttcg aaagaacaga 780
gcaagctttt atgctaacag aggaaccagt tctactctgt gcatgcagga agcctgcaat 840
tcagttagtg tccagaacat ctgccaaacc aggaaggaaa ttcttcaagt gcgcaatgaa 900
caaatgccat tgctgggtact gggcagatct cattgaagaa cacattcaag acagaattga 960

```

tgaattttctc	aagaatcttg	aagttctgaa	gaccgggtggc	gtgcaaacaa	tggaggagga	1020
acttatgaag	gaagtcacca	agctgaagat	agaagagcag	gagttcgagg	aataccaggc	1080
cacaccaagg	gctatgtcgc	cagtagccgc	agaagatgtg	ctagatctcc	aagacgtaag	1140
caatgacgat	tgaggaggca	ttgacgtcag	ggatgaccgc	agcggagagt	actgggceca	1200
ttcagtggat	gctccactga	gttgatttat	tgtgtgcttt	tgggacaagt	gtgctgtcca	1260
ctttcttttg	gcacctgtgc	cactttattc	cttgtctgcc	acgatgcctt	tgcttagctt	1320
gtaagcaagg	atgcagtgcc	gtgtgtgaca	ccacccccct	tccgacgctc	tgcctatata	1380
aggcacccgtc	tgtaagctct	tacgatcctc	ggtagttcac	caacacagaa	acattcgcaa	1440
aaacaaaatc	ccagtatcaa	aattcttctc	tttttttcat	atttcgcaaa	gaactagtga	1500
aacaatggct	caagtgtcgc	gcatctgtaa	cggagttcag	aaccctagcc	tgatctctaa	1560
cttgagcaag	tctagccagc	gtaagtcacc	attgagcgtg	agcttgaaag	ctcaacagca	1620
ccctagagcc	tacccaataa	gctctagttg	gggactcaag	aagtccggta	tgactctgat	1680
tgatctctgag	ttacgtcctc	tgaaagtgat	gagttccggt	agtacgcctt	gcatggctat	1740
cctagacctt	aagtcacctg	tgtgaaagc	cattaactac	tggggcccta	agaacaacaa	1800
cggcatccag	ggcgggtgact	tgggtacccc	catctctgag	aagcagatcg	acactagcat	1860
cattaccttc	acccaccctc	gcttgatccc	ctacgatctt	actatcccgc	agaaccttga	1920
gaccatcttc	accacaagc	aggtgctcac	caataaact	gacctccagc	aatcccagac	1980
cgtgagcttt	gcgaagaaga	ccactaccac	gacctcaact	agcacgacca	acgggttgac	2040
agaaggaggc	aagatcagcg	acacgctgga	ggagaaagtt	tgggttagca	ttccgttcat	2100
cgggtgaggg	ggcgggaaga	actcgactac	catagaggcc	aacttcgcac	acaactctag	2160
caccactacc	ttccagcaag	caagcactga	cattgagtg	aacattagcc	aaccgggtgt	2220
ggttcctccc	tctaaacaag	ttgtcgcgac	ccttgatgac	atgggaggca	actttaccat	2280
ccctatggac	ttgatgacca	cgattgatag	tacagagcac	tactcccact	actccggtta	2340
ccctatcctc	acctggatct	cgtccccaga	taactcttac	tccggtcctt	ttatgtcatg	2400
gtactttgca	aactggccta	accttcagag	tggattcggc	ccactgaata	gtgataacac	2460
ggtcacatac	actggctctg	tctgtgtcca	agtttcggcc	gggtgtctacg	ctaccgtccg	2520
gttcgatcag	tatgacattc	acaatctccg	tactatcgag	aagacttggt	atgctcgcca	2580
tgcgacgctg	cataatggca	agaagatttc	tatcaacaat	gtcacggaaa	tggctccaac	2640
atcccctatc	aagacaaatt	gagtcctagac	aatcaccag	tctctctcta	caaactctatc	2700
tctctctatt	tttctccaga	ataatgtgtg	agtagttccc	agataaggga	attagggttc	2760
ttatagggtt	tcgtctatgt	gttgagcata	taagaaaccc	ttagtatgta	tttgtatttg	2820
taaaatactt	ctatcaataa	aattttotaat	tctaaaaacc	aaaatccagt		2870

<210> 57
<211> 2642
<212> ADN
<213> Artificial

5

<220>
<223> Sintético

<400> 57

10

gaagttgaag	acaaaagaag	gtcttaaatac	ctggctagca	acactgaact	atgccagaaa	60
ccacatcaaa	gatatgggca	agcttcttgg	occattatat	ccaaagacct	cagagaaagg	120
tgagcgaagg	ctcaattcag	aagattggaa	gctgatcaat	aggatcaaga	caatggtgag	180
aacgcttcca	aatctcacta	ttccaccaga	agatgcatac	attatcattg	aaacagatgc	240
atgtgcaact	ggatggggag	cagtatgcaa	gtggaagaaa	aacaaggcag	acccaagaaa	300
tacagagcaa	atctgtaggt	atgccagtgg	aaaatttgat	aagccaaaag	gaacctgtga	360
tgcagaaatc	tatgggggta	tgaatggctt	agaaaagatg	agattgttct	acttggacaa	420
aagagagatc	acagtcagaa	ctgacagtag	tgcaatcgaa	aggttctaca	acaagagtgc	480
tgaacacaag	ccttctgaga	tcagatggat	caggttcatg	gactacatca	ctggtgcagg	540
accagagata	gtcattgaac	acataaaagg	gaagagcaat	ggttttagotg	acatcttgtc	600
caggctcaaa	gccaaattag	ctcagaatga	accaacggaa	gagatgatcc	tgcttacaca	660
agccataagg	gaagtaattc	cttatccaga	tcattccatac	actgagcaac	tcagagaatg	720
gggaaacaaa	attctggatc	cattccccac	attcaagaag	gacatgttcg	aaagaacaga	780
gcaagctttt	atgctaacag	aggaaccagt	tctactctgt	gcatgcagga	agcctgcaat	840
tcagttagtg	tccagaacat	ctgccaaacc	aggaaggaaa	ttcttcaagt	gcgcaatgaa	900
caaatgccat	tgctggtact	gggcagatct	cattgaagaa	cacattcaag	acagaattga	960
tgaattttctc	aagaatcttg	aagttctgaa	gaccgggtggc	gtgcaaacia	tgaggaggga	1020
acttatgaag	gaagtcacca	agctgaagat	agaagagcag	gagttcgagg	aataccaggc	1080
cacaccaagg	gctatgtcgc	cagtagccgc	agaagatgtg	ctagatctcc	aagacgtaag	1140
caatgacgat	tgaggaggca	ttgacgtcag	ggatgaccgc	agcggagagt	actgggocca	1200
ttcagtggtg	gtcccaactga	gttgtattat	tgtgtgcttt	tcggacaagt	gtgctgtcca	1260
ctttcttttg	gcacctgtgc	cactttattc	cttgtctgcc	acgatgcott	tgcttagctt	1320
gtaagcaagg	atcgcagtgc	gtgtgtgaca	ccacccccct	tccgacgctc	tgcttatata	1380
aggcaccgtc	tgtaagctct	tacgatcatc	ggtagttcac	caacacagaa	acattcgcaa	1440
aaacaaaatc	ccagtatcaa	aattcttctc	tttttttcat	atttcgcaaa	gaactagtga	1500
aacaatggct	atcctagacc	ttaagtccct	cgtgctgaac	gccattaact	actggggccc	1560

ES 2 644 945 T3

```

taagaacaac aacggcatcc agggcgggtga cttcggctac cccatctctg agaagcagat 1620
cgacactagc atcattacct tcaccacccc tcgcttgatc ccctacgac ttactatccc 1680
gcagaacctt gagaccatct tcaccacaac gcagggtgctc accaataaca ctgacctcca 1740
gcaatcccag accgtgagct ttgogaagaa gaccactacc acgacctcaa ctagcacgac 1800
caacgggttg acagaaggag gcaagatcag cgacacgctg gaggagaaag tttcgggttag 1860
cattcogtto atcgggtgag gtggcgggaa gaactcgact accatagagg ccaacttcgc 1920
acacaactct agcaccacta ccttcagca agcaagcact gacattgagt ggaacattag 1980
ccaaccgggtg ctggttcctc cctctaaaca agttgtcgcg accettgtga tcatgggagg 2040
caactttacc atccctatgg acttgatgac cagcattgat agtacagagc actactccca 2100
ctactcgggt taccctatcc tcacctggat ctgctccca gataactctt actcgggtcc 2160
ctttatgtca tgggtactttg caaactggcc taaccttcog agtggattcg gccactgaa 2220
tagtgataac acggtcacat acaactggctc tgtcgtgtcc caagtttcgg ccggtgtcta 2280
cgctaccgtc cggttcgatc agtatgacat tcacaatctc cgtactatcg agaagacttg 2340
gtatgctcgc catgacgacg tgcataatgg caagaagatt tctatcaaca atgtcacgga 2400
aatggctcca acatccccta tcaagacaaa ttgagtctag acaaatcacc agtctctctc 2460
tacaaatcta tctctctcta tttttctcca gaataatgtg tgagtagtto ccagataagg 2520
gaattagggg tcttataggg tttcgtcat gtgttgagca tataagaaac ccttagtatg 2580
tatttgtatt tgtaaaatac ttctatcaat aaaatttcta attcctaaaa ccaaaatcca 2640
gt 2642

```

<210> 58
 <211> 930
 <212> ADN
 <213> *Bacillus thuringiensis*

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(930)
 <223> cry51Aa1 de NCBI N.º de Acc. DQ836184.

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(930)
 <223> cry51Aa1 de NCBI N.º de Acc. DQ836184

<220> <221> CDS
 <222> (1)..(930)

<400> 58

```

atg att ttt ttg gca att tta gat tta aaa tct tta gta ctc aat gca 48
Met Ile Phe Leu Ala Ile Leu Asp Leu Lys Ser Leu Val Leu Asn Ala
1 5 10 15

```

ES 2 644 945 T3

ata aat tat tgg ggt cct aaa aat aat aat ggc ata cag ggt ggt gat Ile Asn Tyr Trp Gly Pro Lys Asn Asn Asn Gly Ile Gln Gly Gly Asp 20 25 30	96
ttt ggt tac cct ata tca gaa aaa caa ata gat acg tct att ata act Phe Gly Tyr Pro Ile Ser Glu Lys Gln Ile Asp Thr Ser Ile Ile Thr 35 40 45	144
tct act cat cct cgt tta att cca cat gat tta aca att cct caa aat Ser Thr His Pro Arg Leu Ile Pro His Asp Leu Thr Ile Pro Gln Asn 50 55 60	192
tta gaa act att ttt act aca act caa gta tta aca aat aat aca gat Leu Glu Thr Ile Phe Thr Thr Thr Gln Val Leu Thr Asn Asn Thr Asp 65 70 75 80	240
tta caa caa agt caa act gtt tct ttt gct aaa aaa aca acg aca aca Leu Gln Gln Ser Gln Thr Val Ser Phe Ala Lys Lys Thr Thr Thr Thr 85 90 95	288
act tca act tca act aca aat ggt tgg aca gaa ggt ggg aaa att tca Thr Ser Thr Ser Thr Thr Asn Gly Trp Thr Glu Gly Gly Lys Ile Ser 100 105 110	336
gat aca tta gaa gaa aaa gta agt gta tct att cct ttt att gga gag Asp Thr Leu Glu Glu Lys Val Ser Val Ser Ile Pro Phe Ile Gly Glu 115 120 125	384
gga gga gga aaa aac agt aca act ata gaa gct aat ttt gca cat aac Gly Gly Gly Lys Asn Ser Thr Thr Ile Glu Ala Asn Phe Ala His Asn 130 135 140	432
tct agt act act act ttt caa cag gct tca act gat ata gag tgg aat Ser Ser Thr Thr Thr Phe Gln Gln Ala Ser Thr Asp Ile Glu Trp Asn 145 150 155 160	480
att tca caa cca gta ttg gtt ccc cca cgt aaa caa gtt gta gca aca Ile Ser Gln Pro Val Leu Val Pro Pro Arg Lys Gln Val Val Ala Thr 165 170 175	528
tta gtt att atg gga ggt aat ttt act att cct atg gat ttg atg act Leu Val Ile Met Gly Gly Asn Phe Thr Ile Pro Met Asp Leu Met Thr 180 185 190	576
act ata gat tct aca gaa cat tat agt ggt tat cca ata tta aca tgg Thr Ile Asp Ser Thr Glu His Tyr Ser Gly Tyr Pro Ile Leu Thr Trp 195 200 205	624
ata tcg agc ccc gat aat agt tat aat ggt cca ttt atg agt tgg tat Ile Ser Ser Pro Asp Asn Ser Tyr Asn Gly Pro Phe Met Ser Trp Tyr 210 215 220	672
ttt gca aat tgg ccc aat tta cca tcg ggg ttt ggt cct tta aat tca Phe Ala Asn Trp Pro Asn Leu Pro Ser Gly Phe Gly Pro Leu Asn Ser 225 230 235 240	720
gat aat acg gtc act tat aca ggt tct gtt gta agt caa gta tca gct Asp Asn Thr Val Thr Tyr Thr Gly Ser Val Val Ser Gln Val Ser Ala 245 250 255	768
ggt gta tat gcc act gta cga ttt gat caa tat gat ata cac aat tta Gly Val Tyr Ala Thr Val Arg Phe Asp Gln Tyr Asp Ile His Asn Leu	816

ES 2 644 945 T3

260										265					270					
agg	aca	att	gaa	aaa	act	tgg	tat	gca	cga	cat	gca	act	ctt	cat	aat		864			
Arg	Thr	Ile	Glu	Lys	Thr	Trp	Tyr	Ala	Arg	His	Ala	Thr	Leu	His	Asn					
		275					280					285								
gga	aag	aaa	ata	tct	ata	aat	aat	ggt	act	gaa	atg	gca	cca	aca	agt		912			
Gly	Lys	Lys	Ile	Ser	Ile	Asn	Asn	Val	Thr	Glu	Met	Ala	Pro	Thr	Ser					
	290					295					300									
cca	ata	aaa	aca	aat	taa												930			
Pro	Ile	Lys	Thr	Asn																
305																				

<210> 59
 <211> 309
 <212> PRT
 <213> *Bacillus thuringiensis*

<400> 59

ES 2 644 945 T3

Met	Ile	Phe	Leu	Ala	Ile	Leu	Asp	Leu	Lys	Ser	Leu	Val	Leu	Asn	Ala
1				5					10					15	
Ile	Asn	Tyr	Trp	Gly	Pro	Lys	Asn	Asn	Asn	Gly	Ile	Gln	Gly	Gly	Asp
			20					25					30		
Phe	Gly	Tyr	Pro	Ile	Ser	Glu	Lys	Gln	Ile	Asp	Thr	Ser	Ile	Ile	Thr
		35					40					45			
Ser	Thr	His	Pro	Arg	Leu	Ile	Pro	His	Asp	Leu	Thr	Ile	Pro	Gln	Asn
	50					55					60				
Leu	Glu	Thr	Ile	Phe	Thr	Thr	Thr	Gln	Val	Leu	Thr	Asn	Asn	Thr	Asp
65					70					75					80
Leu	Gln	Gln	Ser	Gln	Thr	Val	Ser	Phe	Ala	Lys	Lys	Thr	Thr	Thr	Thr
				85					90					95	
Thr	Ser	Thr	Ser	Thr	Thr	Asn	Gly	Trp	Thr	Glu	Gly	Gly	Lys	Ile	Ser
			100					105					110		
Asp	Thr	Leu	Glu	Glu	Lys	Val	Ser	Val	Ser	Ile	Pro	Phe	Ile	Gly	Glu
		115					120					125			
Gly	Gly	Gly	Lys	Asn	Ser	Thr	Thr	Ile	Glu	Ala	Asn	Phe	Ala	His	Asn
	130					135					140				
Ser	Ser	Thr	Thr	Thr	Phe	Gln	Gln	Ala	Ser	Thr	Asp	Ile	Glu	Trp	Asn
145					150					155					160
Ile	Ser	Gln	Pro	Val	Leu	Val	Pro	Pro	Arg	Lys	Gln	Val	Val	Ala	Thr

ES 2 644 945 T3

				165				170				175			
Leu	Val	Ile	Met 180	Gly	Gly	Asn	Phe	Thr 185	Ile	Pro	Met	Asp	Leu 190	Met	Thr
Thr	Ile	Asp 195	Ser	Thr	Glu	His	Tyr 200	Ser	Gly	Tyr	Pro	Ile 205	Leu	Thr	Trp
Ile	Ser 210	Ser	Pro	Asp	Asn	Ser 215	Tyr	Asn	Gly	Pro	Phe 220	Met	Ser	Trp	Tyr
Phe 225	Ala	Asn	Trp	Pro	Asn 230	Leu	Pro	Ser	Gly	Phe 235	Gly	Pro	Leu	Asn	Ser 240
Asp	Asn	Thr	Val	Thr 245	Tyr	Thr	Gly	Ser	Val 250	Val	Ser	Gln	Val	Ser 255	Ala
Gly	Val	Tyr	Ala 260	Thr	Val	Arg	Phe 265	Asp	Gln	Tyr	Asp	Ile 270	His	Asn	Leu
Arg	Thr	Ile 275	Glu	Lys	Thr	Trp	Tyr 280	Ala	Arg	His	Ala	Thr 285	Leu	His	Asn
Gly	Lys 290	Lys	Ile	Ser	Ile	Asn 295	Asn	Val	Thr	Glu	Met 300	Ala	Pro	Thr	Ser
Pro 305	Ile	Lys	Thr	Asn											

REIVINDICACIONES

1. Un polinucleótido que codifica una proteína inhibidora de insectos TIC807, en el que dicha proteína inhibidora de insectos TIC807 comprende una secuencia polipeptídica que tiene por lo menos 70 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 5.
- 5 2. El polinucleótido de la reivindicación 1, en el que dicha secuencia polipeptídica tiene por lo menos 80 % de identidad de secuencia, preferentemente por lo menos 90 % de identidad de secuencia, más preferentemente 95 % de identidad de secuencia, aun más preferentemente 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 5.
3. El polinucleótido de la reivindicación 1, en el que dicha proteína inhibidora de insectos TIC807 inhibe un insecto Hemíptero, un insecto Heteróptero, un insecto *Leptinotarsa* sp. o un insecto Homóptero, preferentemente
 - 10 (i) dicho insecto Hemíptero es *Lygus*; o
 - (ii) dicho insecto Homóptero es un áfido, un saltamontes o una mosca blanca.
4. El polinucleótido de la reivindicación 3, en el que dicha proteína inhibidora de insectos TIC807 inhibe *Lygus* a una concentración en la dieta del *Lygus* de por lo menos 5 ppm de dicha proteína TIC807 en dicha dieta, preferentemente dicha proteína inhibidora de insectos TIC807 inhibe *Lygus* a una concentración en la dieta del
 - 15 *Lygus* de por lo menos 50 ppm de dicha proteína TIC807 en dicha dieta, más preferentemente dicha proteína inhibidora de insectos TIC807 inhibe *Lygus* a una concentración en la dieta del *Lygus* de por lo menos 250 ppm de dicha proteína TIC807 en dicha dieta, más preferentemente dicha proteína inhibidora de insectos TIC807 inhibe *Lygus* a una concentración en la dieta del *Lygus* de por lo menos 500 ppm de dicha proteína TIC807 en dicha dieta.
5. El polinucleótido de la reivindicación 1, en el que
 - 20 (i) dicho polinucleótido hibrida en condiciones de alta rigurosidad con SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 6; o
 - (ii) dicha secuencia nucleotídica se selecciona de SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52 y SEQ ID NO: 53; o
 - (iii) dicha secuencia polinucleotídica se ha diseñado para la expresión en plantas.
- 25 6. Una planta transgénica, o parte de la misma, que comprende una proteína inhibidora de insectos TIC807, en la que dicha proteína inhibidora de insectos TIC807 comprende una secuencia polipeptídica que tiene por lo menos 70 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 5.
7. La planta transgénica, o parte de la misma, de la reivindicación 6, en la que
 - 30 (i) dicha planta o parte de la misma comprende dicha proteína TIC807 a una concentración de al menos 5 µg de dicha proteína TIC807 por gramo de peso fresco de tejido vegetal, preferentemente dicha planta o parte de la misma comprende dicha proteína TIC807 a una concentración de al menos 50 µg de dicha proteína TIC807 por gramo de peso fresco de tejido vegetal, más preferentemente dicha planta o parte de la misma comprende dicha proteína TIC807 a una concentración de al menos 250 µg de dicha proteína TIC807 por gramo de peso fresco de tejido vegetal; o
 - 35 (ii) dicha parte de la misma es una célula, una hoja, un tallo, una flor, un sépalo, un fruto, una raíz o una semilla.
8. Una célula huésped transformada que comprende un polinucleótido que codifica una proteína inhibidora de insectos TIC807, en la que dicha proteína inhibidora de insectos TIC807 comprende una secuencia polipeptídica que tiene por lo menos 70 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 5.
9. La célula huésped transformada de la reivindicación 8, en la que dicha célula huésped es una célula bacteriana o
 - 40 una célula vegetal, preferentemente
 - (i) dicha célula vegetal se selecciona de células vegetales de cebada, maíz, avena, arroz, centeno, sorgo, césped, caña de azúcar, trigo, alfalfa, banana, brócoli, judía, col, canola, zanahoria, mandioca, coliflor, apio, cítricos, algodón, una cucurbita, eucalipto, lino, ajo, uva, cebolla, lechuga, guisante, cacahuete, pimiento, patata, álamo blanco, pino, girasol, cártamo, soja, fresa, remolacha azucarera, batata, tabaco, tomate, planta decorativa, arbusto, nuez, garbanzo, guandul, mijos, lúpulos y pastizales, más preferentemente dicha célula vegetal es una célula vegetal de algodón; o
 - 45 (ii) dicha célula bacteriana se selecciona de una célula bacteriana de *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Pseudomonas* y *Rhizobium*, más preferentemente dicha célula bacteriana es una célula de *Bacillus thuringiensis*.
10. Un procedimiento para controlar *Lygus* que comprende las etapas de:
 - 50 (a) proporcionar una cantidad inhibidora de *Lygus* de una proteína inhibidora de insectos TIC807, en el que dicha proteína inhibidora de insectos TIC807 comprende una secuencia polipeptídica que tiene por lo menos 70 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 5; y

(b) poner en contacto dicho *Lygus* con dicha cantidad inhibidora de dicha proteína inhibidora de insectos TIC807, controlando de ese modo un insecto *Lygus*.

11. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que

- (i) dicha secuencia polipeptídica tiene por lo menos 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 5, preferentemente dicha secuencia polipeptídica tiene 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 5; o
- (ii) dicha cantidad inhibidora de *Lygus* de dicha secuencia proteína inhibidora de insectos TIC807 se proporciona en una dieta del *Lygus* en la etapa (a) y dicho *Lygus* se pone en contacto en la etapa (b) permitiendo que dicho *Lygus* se alimente de dicha dieta, preferentemente dicha dieta del *Lygus* es una planta transgénica, más preferentemente dicha cantidad inhibidora de *Lygus* de dicha proteína inhibidora de insectos TIC807 es al menos 5 microgramos por gramo de peso fresco de tejido de dicha planta transgénica, aun más preferentemente dicha cantidad inhibidora de *Lygus* de dicha proteína inhibidora de insectos TIC807 es al menos 50 µg por gramo de peso fresco de tejido de dicha planta transgénica, más preferentemente dicha cantidad inhibidora de *Lygus* de dicha proteína inhibidora de insectos TIC807 es al menos 250 µg por gramo de peso fresco de tejido de dicha planta transgénica; o
- (iii) dicha cantidad inhibidora de *Lygus* de dicha proteína inhibidora de insectos TIC807 se proporciona en la etapa (a) pulverizando una composición que comprende dicho polipéptido en una planta, preferentemente dicha composición comprende células bacterianas o esporas bacterianas que expresan dicho polipéptido, más preferentemente dichas células bacterianas o esporas bacterianas son células de *Bacillus* o esporas de *Bacillus*, aun más preferentemente dicha composición comprende un cristal paraesporal que contiene dicho polipéptido, más preferentemente dicha planta está infestada con un *Lygus*.

12. Un kit

- (I) para detección de una secuencia polinucleotídica de TIC807 en una muestra, codificando dicha secuencia polinucleotídica de TIC807 una proteína inhibidora de insectos TIC807, en el que dicha proteína inhibidora de insectos TIC807 comprende una secuencia polipeptídica que tiene por lo menos 70 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 5, comprendiendo dicho kit un oligonucleótido que hibrida específicamente con una secuencia polinucleotídica de SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53 o un complemento de la misma y un polinucleótido control que se hibrida a dicho oligonucleótido; o
- (II) para detección de una proteína TIC807 en una muestra, comprendiendo dicha proteína TIC807 que comprende una secuencia polipeptídica que tiene por lo menos 70 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 5, comprendiendo dicho kit:

- (a) un anticuerpo que se une específicamente a dicha proteína TIC807 o epítipo peptídico de la misma, comprendiendo dicha proteína o epítipo por lo menos 9 aminoácidos contiguos de SEQ ID NO: 5; y
- (b) una proteína TIC807 de control o un epítipo peptídico de la misma, comprendiendo dicha proteína o epítipo al menos 9 aminoácidos contiguos de SEQ ID NO: 5.

13. Un procedimiento para detectar o aislar un polinucleótido que codifica una proteína TIC807 en una muestra, comprendiendo dicha proteína TIC807 una secuencia polipeptídica que tiene por lo menos 70 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 5,

(I) comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:

- (a) seleccionar un par de cebadores oligonucleotídicos degenerados capaces de producir un amplicón, en el que las secuencias nucleotídicas de dichos cebadores oligonucleotídicos degenerados derivan de una secuencia polinucleotídica de TIC807 que codifica SEQ ID NO: 5;
- (b) producir un amplicón de dichas secuencias nucleotídicas en dicha muestra; y
- (c) detectar o aislar dicho amplicón, detectando o aislando de ese modo un polinucleótido que codifica dicha proteína TIC807 en dicha muestra; o

(II) comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:

- (a) seleccionar un oligonucleótido degenerado o colección de oligonucleótidos degenerados, donde la(s) secuencia(s) nucleotídica(s) de dicho(s) oligonucleótido(s) degenerado(s) derivan de una secuencia polinucleotídica de TIC807 que codifica SEQ ID NO: 5;
- (b) hibridar dichos oligonucleótidos degenerados o colección de oligonucleótidos degenerados a dicha muestra;
- (c) detectar la hibridación en dicha muestra a un polinucleótido, detectando de ese modo un polinucleótido que codifica dicha proteína TIC807 en dicha muestra; y
- (d) aislar el polinucleótido detectado mediante hibridación en la etapa (c).

14. Un procedimiento para expresar una proteína TIC807 en una planta, comprendiendo dicha proteína TIC807 una secuencia polipeptídica que tiene por lo menos 70 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 5, que comprende las etapas de:

(a) insertar en un genoma de célula vegetal una secuencia de ácidos nucleicos que comprende en la dirección 5' a 3' una molécula de ADN bicatenario, recombinante, ligada operativamente, en la que la molécula de ADN bicatenario, recombinante, comprende:

- (i) un promotor que funciona en la célula de la planta;
- (ii) una secuencia polinucleotídica que codifica una proteína inhibidora de insectos TIC807, en la que dicha proteína inhibidora de insectos TIC807 comprende una secuencia polipeptídica que tiene por lo menos 70 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 5;
- (iii) una secuencia nucleotídica no traducida en 3' que funciona en las células de la planta para causar la terminación de la transcripción y la poliadenilación, en la que dicho promotor, dicha secuencia polinucleotídica, y dicha secuencia nucleotídica no traducida en 3' están ligadas operativamente;

(b) obtener una célula de planta transformada que contiene la secuencia de ácidos nucleicos de la etapa (a); y
(c) regenerar a partir de dicha célula de planta transformada una planta transgénica que expresa dicha proteína TIC807, expresando de ese modo una proteína TIC807 en una planta.

15. El procedimiento de la reivindicación 14, en el que dicha secuencia peptídica tiene por lo menos 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 5, preferentemente dicha secuencia peptídica es SEQ ID NO: 5, más preferentemente dicha secuencia polinucleotídica está ligada operativamente a una secuencia polinucleotídica que codifica un polipéptido dirigido al plastidio, más preferentemente dicha secuencia de ácido nucleico codifica el polipéptido de SEQ ID NO: 8.

16. Un vector de ADN recombinante para expresar una proteína TIC807 en una planta, comprendiendo dicha proteína TIC807 una secuencia polipeptídica que tiene por lo menos 70 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 5; comprendiendo dicho vector en la dirección 5' a 3':

- (i) un promotor que funciona en la célula de la planta;
- (ii) una secuencia polinucleotídica que codifica dicha proteína TIC807; y
- (iii) una secuencia nucleotídica no traducida en 3' que funciona en las células de la planta para causar la poliadenilación, en la que dicho promotor, dicha secuencia polinucleotídica, y dicha secuencia nucleotídica no traducida en 3' están ligadas operativamente.

17. El vector de ADN recombinante de la reivindicación 16, en el que

- (i) dicha secuencia polipeptídica tiene por lo menos 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 5, preferentemente dicha secuencia polipeptídica es SEQ ID NO: 5, más preferentemente dicha secuencia polinucleotídica comprende SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52 o SEQ ID NO: 53; o
- (ii) dicha secuencia polinucleotídica está ligada operativamente a una secuencia polinucleotídica que codifica un polipéptido de dirección a plastidio, preferentemente dicha secuencia polinucleotídica es SEQ ID NO: 7 y dichas dos secuencias polinucleotídicas ligadas operativamente codifican el polipéptido de SEQ ID NO: 8, o dicho vector que comprende además un polinucleótido que codifica un gen marcador seleccionable, más preferentemente dicho gen marcador seleccionable confiere resistencia a AMPA, atrazina, bromoxinil, dalapon, dicamba, glifosato, higromicina, metotrexato, neomicina, fosfotricina, una sulfonilurea o 2,4-D, y sus combinaciones.

18. Un producto de base producido de una planta o semilla, en el que dicho producto contiene una cantidad detectable de una proteína TIC807 o un polinucleótido que codifica una proteína TIC807, comprendiendo dicha proteína TIC807 una secuencia polipeptídica que tiene por lo menos 70 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 5.

19. El producto de base de acuerdo con la reivindicación 18, en el que dicha planta o semilla es una planta de algodón o semilla de una planta de algodón, preferentemente el producto de base es hila, aceite, harina o vainas.

20. Un procedimiento para controlar por lo menos una plaga de insectos, no siendo dicho procedimiento un procedimiento para el tratamiento del cuerpo humano o animal por terapia y que comprende las etapas de:

(a) proporcionar por lo menos dos agentes inhibidores de plagas de insectos diferentes en una composición, comprendiendo dicha composición:

- (i) una cantidad inhibidora de insectos de una proteína TIC807, comprendiendo dicha proteína TIC807 una secuencia polipeptídica que tiene por lo menos 70 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 5, y
- (ii) una cantidad inhibidora de insectos de por lo menos una secuencia de ribonucleótidos que funciona en la ingestión por dicha plaga de insecto para inhibir una función biológica dentro de dicha plaga de insectos, y/o
- (iii) una cantidad inhibidora de insectos de por lo menos una proteína inhibidora de insectos que no es dicha proteína TIC807; y

(b) poner en contacto dicha por lo menos una plaga de insectos con una cantidad inhibidora de dicha composición, controlando de ese modo dicha por lo menos una plaga de insectos.

21. El procedimiento de la reivindicación 20, en el que

(i) dicha al menos una plaga de insecto es un insecto Hemíptero, un insecto Heteróptero, un insecto *Leptinotarsa* sp. o un insecto Homóptero, preferentemente el insecto Hemíptero es un insecto *Lygus*, o dicho insecto Homóptero es un áfido, un saltamontes o una mosca blanca; o

(ii) dicha función biológica es una función biológica esencial, preferentemente dicha función biológica esencial es proporcionada por una proteína esencial o ácido ribonucleico de dicha plaga de insecto, cuya función predicha se selecciona de formación de músculos, formación de la hormona juvenil, regulación de la hormona juvenil, regulación y transporte de iones, síntesis de enzimas digestivas, mantenimiento del potencial de la membrana celular, biosíntesis de aminoácidos, degradación de aminoácidos, formación de espermatozoides, síntesis de feromonas, detección de feromonas, formación de antenas, formación de alas, formación de patas, desarrollo y diferenciación, formación de huevos, maduración de larvas, formación de enzimas digestivas, síntesis de hemolinfas, mantenimiento de hemolinfas, neurotransmisión, división celular, metabolismo energético, respiración y apoptosis, o dicha función biológica esencial se inhibe en *Lygus* mediante una secuencia de ribonucleótidos que comprende entre 21 y 5000 nucleótidos contiguos que exhiben entre 80 y 100 % de identidad de secuencia con una secuencia codificadora de nucleótidos seleccionada de SEQ ID NO: 24 a SEQ ID NO: 39; o

(iii) dicha una proteína inhibidora de insectos que no es dicha proteína TIC807 se obtiene de *Bacillus thuringiensis*, preferentemente dicha proteína inhibidora de insectos se selecciona de AXMI-027, AXMI-036, AXMI-038, AXMI-018, AXMI-020, AXMI-021, AXMI-010, AXMI-003, AXMI-008, AXMI-006, AXMI-007, AXMI-009, AXMI-014, ET29, ET37, AXMI-004, AXMI-028, AXMI-029, AXMI-007, AXMI-008, AXMI-0080rf2, AXMI-009, AXMI-014, TIC809, TIC810, TIC812, TIC127 y TIC128; o

(iv) dicha composición comprende dos proteínas inhibidoras de insectos que no son dicha proteína TIC807 y en la que dichas dos proteínas inhibidoras de insectos son TIC809 y TIC810; o

(v) una segunda plaga de insectos se controla mediante dicha composición, preferentemente dicha segunda plaga de insectos se inhibe mediante dicha secuencia de ribonucleótidos de (ii) o mediante dicha proteína de (iii), o dicha segunda plaga de insectos es una plaga de insectos lepidópteros, más preferentemente dicha segunda plaga de insectos se inhibe mediante una proteína seleccionada del grupo que consiste en una proteína Cry1A, una proteína Cry1B, una Cry1C, una proteína quimérica Cry1A/Cry1F y una proteína Cry2Ab; o

(vi) dicha composición proporciona un efecto inhibidor de insectos sinérgico; o

(vii) dicha composición proporciona un efecto inhibidor de insectos aditivo; o

(viii) dicha composición es una planta transgénica.

22. El procedimiento de la reivindicación 20 que es un procedimiento para proteger una planta de la infestación por *Lygus* que comprende la etapa de: expresar una cantidad inhibidora de *Lygus* de por lo menos dos agentes inhibidores de *Lygus* diferentes en dicha planta, en el que dichos agentes inhibidores de *Lygus* comprenden:

(i) una cantidad inhibidora de *Lygus* de dicha proteína TIC807;

(ii) una cantidad inhibidora de *Lygus* de por lo menos una proteína inhibidora de *Lygus* que no es dicha proteína TIC807; y/o

(iii) una cantidad inhibidora de *Lygus* de por lo menos una secuencia de ribonucleótidos que funciona tras la ingestión por dicho *Lygus* para inhibir una función biológica dentro de dicho *Lygus*, protegiendo de ese modo a dicha planta de la infestación por *Lygus*.

23. El procedimiento de la reivindicación 22, en el que

(i) dicha función biológica es una función biológica esencial, preferentemente dicha función biológica esencial es proporcionada por una proteína o ácido ribonucleico esencial de dicho *Lygus*, cuya función predicha se selecciona de formación de músculos, formación de la hormona juvenil, regulación de la hormona juvenil, regulación y transporte de iones, síntesis de enzimas digestivas, mantenimiento del potencial de la membrana celular, biosíntesis de aminoácidos, degradación de aminoácidos, formación de espermatozoides, síntesis de feromonas, detección de feromonas, formación de antenas, formación de alas, formación de patas, desarrollo y diferenciación, formación de huevos, maduración de larvas, formación de enzimas digestivas, síntesis de hemolinfas, mantenimiento de hemolinfas, neurotransmisión, división celular, metabolismo energético, respiración, y apoptosis, más preferentemente dicha función biológica esencial se inhibe mediante una secuencia de ribonucleótidos que comprende entre 21 y 5000 nucleótidos contiguos que exhiben entre 80 y 100 % de identidad de secuencia con una secuencia codificadora de nucleótidos seleccionada de SEQ ID NO: 24 a SEQ ID NO: 39; o

(ii) dicha proteína inhibidora de *Lygus* que no es dicha proteína TIC807 se obtiene de *Bacillus thuringiensis*, preferentemente dicha proteína inhibidora de *Lygus* se selecciona de AXMI-027, AXMI-036, AXMI-038, AXMI-018, AXMI-020, AXMI-021, AXMI-010, AXMI-003, AXMI-008, AXMI-006, AXMI-007, AXMI-009, AXMI-014, ET29, ET37, AXMI-004, AXMI-028, AXMI-029, AXMI-007, AXMI-008, AXMI-0080rf2, AXMI-009, AXMI-014, TIC809, TIC810, TIC812, TIC127 y TIC128; o

(iii) dos proteínas inhibidoras de *Lygus* que no son dicha proteína TIC807 se expresan en dicha planta, comprendiendo dichas dos proteínas inhibidoras de *Lygus* TIC809 y TIC810; o

(iv) dicha expresión de agentes inhibidores de *Lygus* proporciona un efecto inhibidor de *Lygus* sinérgico; o

- (v) dicha expresión de agentes inhibidores de *Lygus* proporciona un efecto inhibidor de *Lygus* aditivo; o
- (vi) dicho *Lygus* es *Lygus hesperus* o *Lygus lineolaris*.

24. Una proteína inhibidora de insectos, en la que dicha proteína inhibidora de insectos comprende una secuencia polipeptídica que tiene por lo menos 70 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 5.

5 25. La proteína de la reivindicación 24, en la que

(i) dicha secuencia polipeptídica tiene por lo menos 80 % de identidad de secuencia o al menos 90 % de identidad de secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 5, más preferentemente dicha proteína es SEQ ID NO: 5; o

10 (ii) dicha proteína comprende además una proteína vehículo, preferentemente dicha proteína vehículo es una albúmina o una proteína KLH; o

(iii) dicha proteína comprende además una modificación covalente seleccionada de un reactivo indicador, un espaciador de aminoácidos, un enlazador de aminoácidos, una secuencia señal, una secuencia de péptidos de tránsito al cloroplasto, una secuencia de direccionamiento vacuolar, una secuencia de detención de transferencia, un dominio de transmembrana, un ligando de purificación proteica, o una combinación de los mismos.

15 26. Un anticuerpo que se une específicamente a una proteína TIC807, comprendiendo dicha proteína TIC807 una secuencia polipeptídica que tiene por lo menos 70 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 5.

Figura 1

Matriz : EBLOSUM62

Penalización para Gap: 10.0

Penalización para Extensión: 0.5

Identidad : 96/376 (25.5%)

Cry15Aa1	1	MAIMN--DIAQDAARAWDIIAGPFIRPGTTPTNRQLFNYQIGNIEVEPGN	48
TIC807	1	MAILDLKSLVLNAINYW---GPKNNNGIQGGD---FGYPISEKQIDTSI	43
Cry15Aa1	49	LNFS---VVP-----ELDFSVSQDLFNNTSVQQSQTASFNESRTET	86
TIC807	44	ITFTHPRLIPYDLTIPQNLETIFTTQVLTNNTDLQSQTVSFAKKTTTT	93
Cry15Aa1	87	TSTAVTHGVKSGVTVSASAKFNAKILVKSI-----EQTITTTVSTEYNFS	131
TIC807	94	TSTSTTNGWTEGGKISDTLEEKVSVSIPFIGEGGKKNSTTIEANFAHNSS	143
Cry15Aa1	132	STTTRTNTVTRGWSIAQPVLVPPHSRVATLQIYKGDFTVPVLL-----S	176
TIC807	144	TTTFQQASTDIEWNISQPVLVPPSKQVVATLVIMGGNFTIPMDLMTIDS	193
Cry15Aa1	177	LRVYGQTG-----TLAGNPS-----FPSLYAATYENTLLGRIREHIAPP	215
TIC807	194	TEHYSHYSGYPILTWISSPDNSYSGPFMSWYFANWPNL-----P	232
Cry15Aa1	216	ALFRASNAYISNGVQAIWRGTATTRVSQGLYSVVRIDERPLAGYSGETRT	265
TIC807	233	SGFGPLNS--DNTV--TYTGSVVSQVSAGVYATVRFDQYDIHNLRTIEKT	278
Cry15Aa1	266	YYL-PVTLSSNSQILTPGSLGSEIPIINPVPNASCKKENSPIIIHHDREK	314
TIC807	279	WYARHATLHN-----GKKISINNVTEMA----PTSPIKTN	309
Cry15Aa1	315	HRERDYDKEHICHDAQAEKYERDYDKE	340
TIC807	310		309

Figura 2

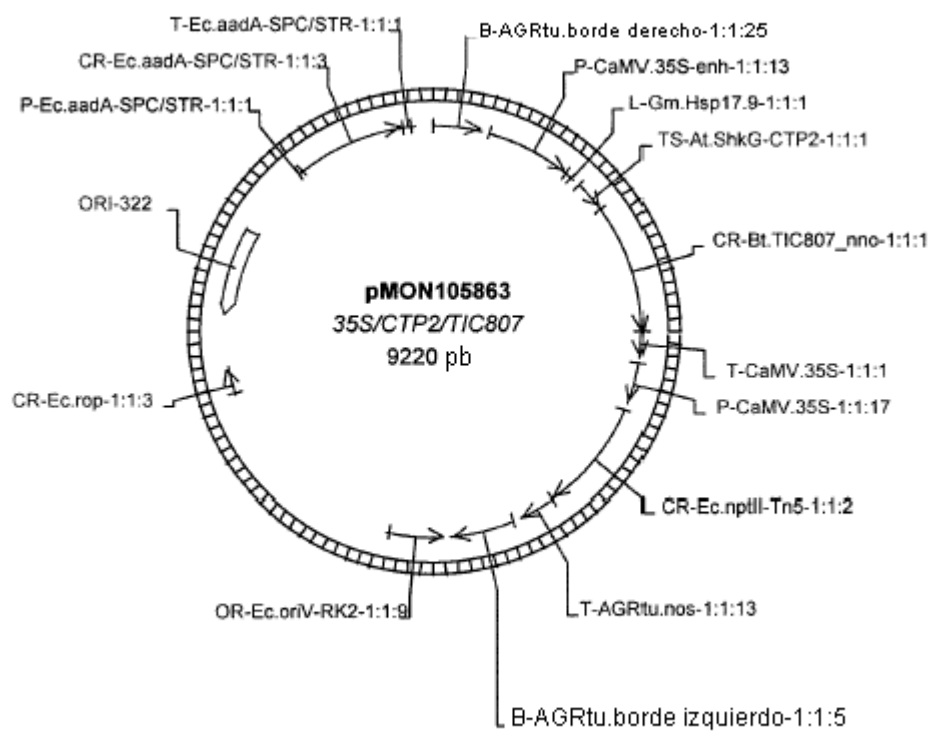


Figura 3

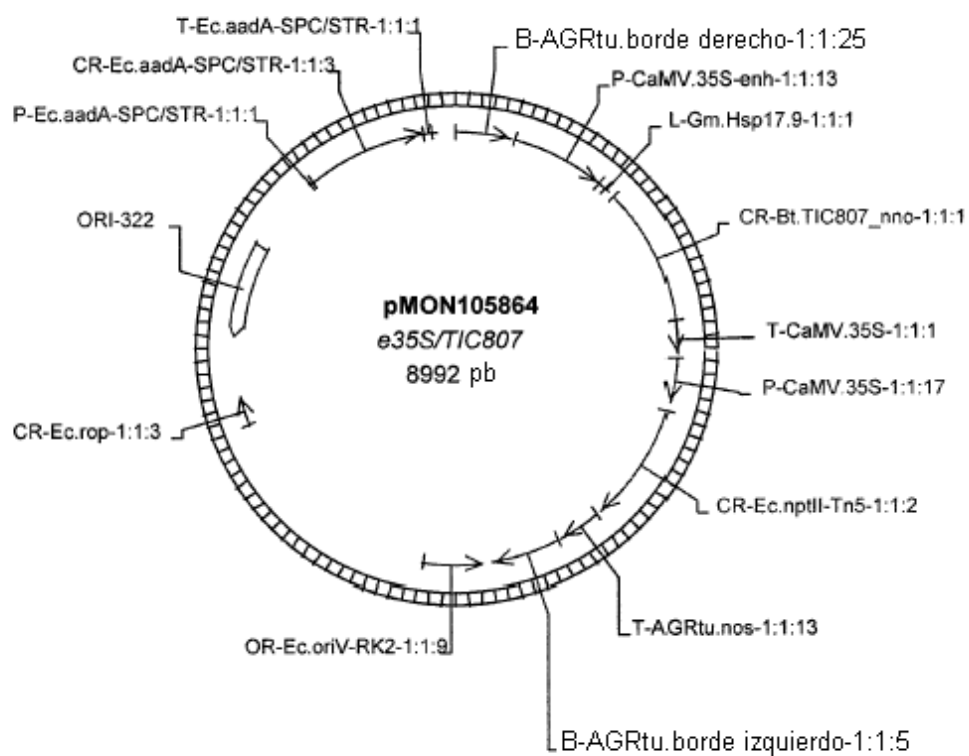


Figura 4

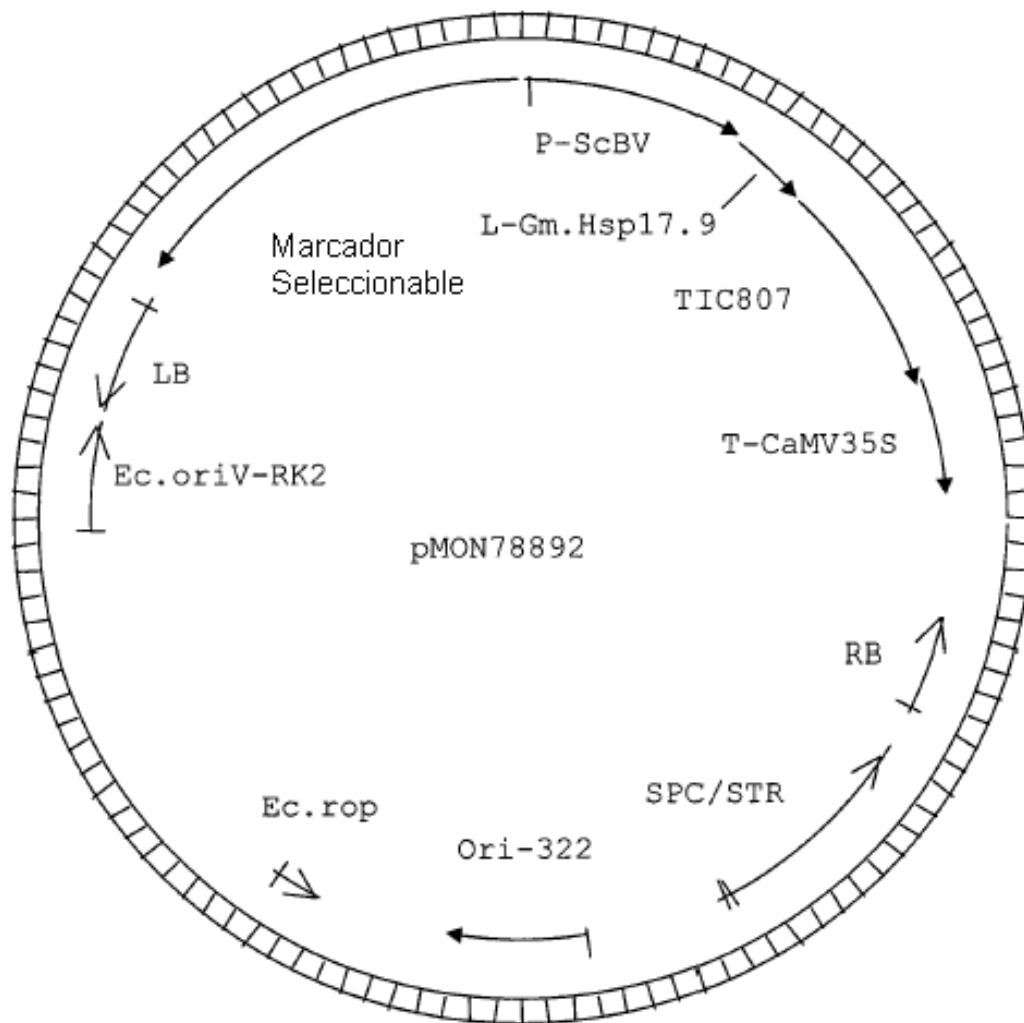


Figura 5

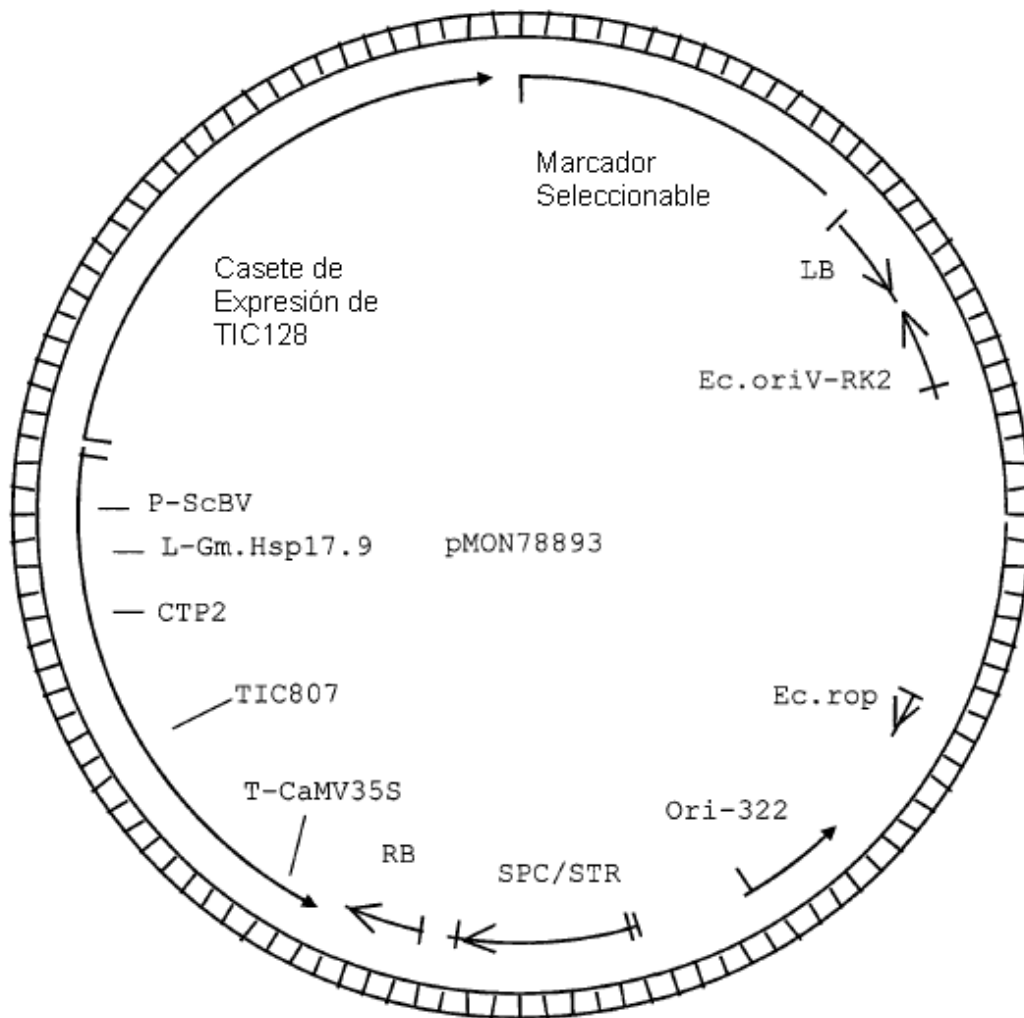


Figura 6

TIC807	---MAILDLKSLVLNAINYWGPKNNGIQGGDFGYPISEKQIDTSIITFTHPRLIPYDLT
Cry51Aa1	MIFLAILDLKSLVLNAINYWGPKNNGIQGGDFGYPISEKQIDTSIITSTHPRLIPHDLT :*****:***
TIC807	IPQNLETIFTTQVLNNTDLQQSQTVSFAKTTTTSTSTNGWTEGGKISDTLEEKVS
Cry51Aa1	IPQNLETIFTTQVLNNTDLQQSQTVSFAKTTTTSTSTNGWTEGGKISDTLEEKVS *****
TIC807	VSIPFIGEGGKNSTTIEANFAHNSSTTTFQQASTDIEWNISQPVLPVPPSKQVVATLVIM
Cry51Aa1	VSIPFIGEGGKNSTTIEANFAHNSSTTTFQQASTDIEWNISQPVLPVPPRKQVVATLVIM *****
TIC807	GGNFTIPMDLMTTIDSTEHSYSGYPILTWISSPDNSYSGPFMSWYFANWPNLPSGFGP
Cry51Aa1	GGNFTIPMDLMTTIDSTEHS---GYPILTWISSPDNSYNGPFMSWYFANWPNLPSGFGP *****
TIC807	LNSDNTVITYTGSVVSQVSAGVYATVRFDQYDIHNLRTIEKTWYARHATLHNGKKISINNV
Cry51Aa1	LNSDNTVITYTGSVVSQVSAGVYATVRFDQYDIHNLRTIEKTWYARHATLHNGKKISINNV *****
TIC807	TEMAPTSPIKTN (SEQ ID NO:5)
Cry51Aa1	TEMAPTSPIKTN (SEQ ID NO:59) *****