



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 325 482**

51 Int. Cl.:  
**A01N 63/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01979370 .2**

96 Fecha de presentación : **02.10.2001**

97 Número de publicación de la solicitud: **1322171**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.07.2003**

54 Título: **Tratamiento de semillas transgénicas de maíz con pesticidas.**

30 Prioridad: **06.10.2000 US 238406 P**  
**01.10.2001 US 968422**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**07.09.2009**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**07.09.2009**

73 Titular/es: **Monsanto Technology L.L.C.**  
**800 North Lindbergh Boulevard**  
**St. Louis, Missouri 63167, US**

72 Inventor/es: **Asrar, Jawed;**  
**Kohn, Frank, C. y**  
**Sanders, Ernest, F.**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 325 482 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

Tratamiento de semillas transgénicas de maíz con pesticidas.

5 **Antecedentes de la invención**(1) **Campo de la invención**

10 La presente invención versa, en general, acerca del control de plagas que provocan daños a las plantas de maíz por sus actividades de alimentación, y más en particular acerca del control de dichas plagas de las plantas de maíz mediante la combinación de una semilla de maíz que tiene un evento transgénico y el tratamiento de dicha semilla con un pesticida antes de que sea plantada la semilla.

15 (2) **Descripción y técnica relacionada**

Los insectos y artrópodos relacionados destruyen anualmente un 15% estimado de cosechas agrícolas en los Estados Unidos e incluso más que eso en los países en vías de desarrollo. Además, las malas hierbas competidoras y las plantas parasitarias y saprofitas son responsables de aún más pérdidas potenciales de producción.

20 Parte de este daño ocurre en la tierra cuando los patógenos de plantas, los insectos y otras plagas endémicas de la tierra atacan a la semilla después de haber sido plantada. En la producción de maíz, la mayoría del resto del daño es causado por gusanos de las raíces - plagas de insectos que se alimentan o dañan de otra manera las raíces de las plantas; y por orugas podadoras, barrenadores europeos del maíz, y otras plagas que se alimentan o dañan las partes de la planta situadas por encima de la superficie del suelo. Las descripciones generales del tipo y los mecanismos de 25 ataque de las plagas a las cosechas agrícolas son proporcionadas, por ejemplo, por Metcalf, en *Destructive and Useful Insects*, (1962); y por Agrios en *Plant Pathology*, 3ª ed., Academic Press (1988).

El maíz es la cosecha de cereal más importante en la región medio oeste de los Estados Unidos. Entre las plagas de insectos más importantes del maíz en esta región es la forma larvaria de tres especies de escarabajos *Diabrotica*. 30 Estas incluyen el gusano de las raíces del maíz occidental, *Diabrotica vergifera vergifera* Leconte, el gusano de las raíces del maíz septentrional, *Diabrotica berberi* Smith y *Diabrotica berberi* Lawrence, y el gusano de las raíces del maíz meridional, *Diabrotica undecimpunctata howardi* Barber. De hecho, se utiliza más insecticida para el control del gusano de las raíces del maíz que para cualquier otra plaga del maíz, y la superficie total tratada es mayor que para cualquier otra plaga en los Estados Unidos.

35 Los gusanos de las raíces del maíz (CRW) sobreviven el invierno en la etapa de huevo en los campos donde se cultivó maíz la temporada anterior. Los huevos eclosionan entre finales de mayo y junio. Si no sigue una cosecha de maíz a otra del año anterior, las larvas morirán. En consecuencia, el impacto del gusano de las raíces del maíz se siente más directamente en las zonas en las que la cosecha de maíz sigue sistemáticamente a otra cosecha de maíz anterior, como es típico de muchas zonas en la región del medio oeste de los Estados Unidos.

Después de eclosionar, las larvas pasarán por tres etapas o fases larvarias, durante las que se alimentan del sistema de raíces del maíz. Se requieren aproximadamente tres semanas para que se complete la etapa larvaria. El daño causado al sistema de raíces del maíz por la alimentación de las larvas es la causa principal de pérdidas de cosechas de 45 maíz debida al gusano de las raíces del maíz. Las plantas de maíz que se caen y se implantan en el campo después del debilitamiento o destrucción de una parte considerable del sistema de raíces son la causa de una porción considerable de esta pérdida, dado que este maíz implantado no puede ser cosechado por medio de maquinaria mecanizada convencional y es dejado en el campo.

50 Después de que se haya completado el desarrollo larvario, las larvas se transforman en crisálidas inmóviles, y de ahí en los escarabajos adultos que emergen de la tierra durante el verano, dependiendo el periodo de aparición de la ubicación de crecimiento. Después de la aparición, los escarabajos adultos se alimentan durante aproximadamente dos semanas antes de que las hembras comiencen a poner huevos. La máxima actividad de los adultos se da en el Cinturón de maíz de los EE. UU. durante finales de julio y principios de agosto en los campos plantados con maíz un 55 año tras otro, pero la actividad puede culminar más tarde en los campos de maíz de primer año o de maduración tardía. Los escarabajos de los gusanos de las raíces comienzan a poner huevos en los campos de maíz aproximadamente dos semanas después de haber emergido. (Para más información, véase, por ejemplo, *Corn Rootworms*, Field Crops Pest Management Circular #16, Ohio Pest Management & Survey Program, The Ohio State University, Extension Division, Columbus, Ohio; disponible en línea en [www.ag.ohio-state.edu/~ohioline/icm-fact/fc-16.html](http://www.ag.ohio-state.edu/~ohioline/icm-fact/fc-16.html), 13 de septiembre de 2000; y McGahen *et al.*, *Corn Insect Control: Corn Rootworm*, PENpages número 08801502, hoja informativa disponible en la Universidad Estatal de Pensilvania, State College, Pensilvania, 1989).

65 En la práctica convencional agrícola actual, en los casos en los que una cosecha de maíz sigue a otra cosecha de maíz, es normal que se aplique un insecticida para proteger el sistema de raíces del maíz de una alimentación severa por las larvas de gusanos de las raíces. La práctica convencional es atacar a los escarabajos adultos o atacar a las larvas. Ejemplos de formulaciones convencionales de tratamiento para escarabajos adultos incluyen la aplicación de insecticidas de carbarilo (por ejemplo, SEVEN® 80S con 1,121 - 1,242 kg de activo/hectárea); fenvalerato o esfenvalerato (por ejemplo, PYDRIN® 2.4EC con  $1,121 \times 10^{-1}$  hasta  $2,242 \times 10^{-1}$  kg de activo/hectárea, o ASANA® 0.66EC con

3,363 × 10<sup>-2</sup> hasta 5,605 × 10<sup>-2</sup> kg de activo/hectárea); malatión (57% E con 1,009 kg de activo/hectárea); permetrina (por ejemplo, AMBUSH® 2.0EC con 1,121 × 10<sup>-1</sup> hasta 2,242 × 10<sup>-1</sup> kg de activo/hectárea o POUNCE® 3.2EC con 1,121 × 10<sup>-1</sup> hasta 2,242 × 10<sup>-1</sup> kg de ingrediente activo/hectárea); o PENNCAP-M® con 2,803 × 10<sup>-1</sup> hasta 5,605 × 10<sup>-1</sup> kg de activo/hectárea.

5

Para tratar las larvas de CRW, la práctica convencional es aplicar un insecticida para tierra bien durante la plantación o después de la misma, pero preferentemente tan cerca de la eclosión como sea posible. Los tratamientos convencionales incluyen insecticidas de carbofurano (por ejemplo, FURADAN® 15G con 0,744 kg/hilera de 1 km); cloropirifos (por ejemplo, LORSBAN® 15G con 0,744 kg/hilera de 1 km); fonofos (por ejemplo, DYFONATE® 20G con 0,418 hasta 0,558 kg/hilera de 1 km); forato (por ejemplo, THIMET® 20G con 0,558 kg/hilera de 1 km); terbufos (por ejemplo, COUNTER® 15G con 0,744 kg/hilera de 1 km); o teflutrina (por ejemplo, FORCE® 3G con 0,372 hasta 0,465 kg/hilera de 1 km).

10

Se sabe que muchos de los pesticidas químicos enumerados anteriormente son perjudiciales para los seres humanos y los animales en general. El daño medioambiental que causan estos pesticidas se ve agravado a menudo debido a la práctica de aplicar los pesticidas mediante pulverización foliar o una aplicación directa a la superficie de la tierra. La deriva del viento, la filtración y el derrame pueden causar la migración de una gran parte del pesticida fuera de la zona deseada de actividad y sobre aguas superficiales y en contacto directo con pájaros, animales y seres humanos.

15

Debido a la preocupación acerca del impacto de los pesticidas químicos sobre la salud pública y la salud del medio ambiente, se han llevado a cabo esfuerzos significativos para encontrar formas de reducir la cantidad de pesticidas químicos que se utilizan. Recientemente, mucho de este esfuerzo se ha centrado en el desarrollo de cosechas transgénicas que están diseñadas para expresar toxicantes para insectos, derivados de microorganismos. Por ejemplo, la patente U.S. n° 5.877.012 otorgada a Estruch *et al.* desvela la clonación y expresión de proteínas de dichos organismos como *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Clavibacter* y *Rhizobium* en plantas para obtener plantas transgénicas con resistencia a dichas plagas como orugas podadoras negras, gardamas, varios barrenadores y otras plagas de insectos. La publicación WO/EP97/07089 por parte de Privalle *et al.* enseña la transformación de monocotiledoneas, como el maíz, con una peroxidasa que codifica una secuencia recombinante de ADN para la protección de la planta contra la alimentación por barrenadores del maíz, gusanos de la mazorca y orugas podadoras. Jansens *et al.*, en Crop Sci., 37 (5): 1616-1624 (1997), informó de la producción de maíz transgénico que contenía un gen que codifica una proteína cristalina de *Bacillus thuringiensis* (Bt) que controlaba ambas generaciones del barrenador europeo del maíz. Las patentes U.S. n°s 5.625.136 y 5.859.336 otorgadas a Koziel *et al.* informaron de que la transformación de maíz con un gen de *B. thuringiensis* que codificaba endotoxinas-delta proporcionó al maíz transgénico una resistencia mejorada al barrenador europeo del maíz. En Crop Science, 35(2): 550 - 557 (1995), Armstrong *et al.* proporcionaron un informe exhaustivo de pruebas de campo de maíz transgénico que expresaba una proteína insecticida de *B. thuringiensis*.

20

25

30

35

Se sabía que las endotoxinas-δ Bt de tipo salvaje tenían una actividad baja contra los insectos coleópteros, y Kreig *et al.*, en 1983, informó del primer aislamiento de una variedad tóxica coleóptera de *B. thuringiensis*. (Véase la patente U.S. n° 4.766.203). Las patentes U.S. n°s 4.797.279 y 4.910.016, también desvelaron variedades de tipo salvaje e híbridos de *B. thuringiensis* que produjeron proteínas que tenían algo de actividad coleóptera. Sin embargo, más recientemente, parecen prometedores procedimientos más precisos de ingeniería genética en el desarrollo de proteínas modificadas de *B. thuringiensis* que tienen niveles significativamente mayores de actividad contra los gusanos de las raíces del maíz que las producidas por sus antecesoras de tipo salvaje. (Véase, por ejemplo, el documento WO 99/31248 otorgado a Ecogen, Inc. y la empresa Monsanto).

40

45

Sin embargo, no se sabe en la actualidad si cualquier evento transgénico por sí solo será lo suficientemente efectivo para proteger al maíz de los daños causados por gusanos de las raíces del maíz en campos muy infestados que están dedicados al maíz en serie. De hecho, el control total del daño provocado por gusanos de las raíces del maíz por cualquier evento transgénico por sí solo puede no ser deseable a largo plazo, por el potencial desarrollo de variedades resistentes de la plaga objetivo.

50

Otra alternativa de las formas convencionales de la aplicación del pesticida es el tratamiento de las semillas de la planta con pesticidas. Se ha empleado durante algún tiempo el uso de fungicidas para proteger a las semillas de los ataques después de ser plantadas, y el uso de niveles bajos de insecticidas para la protección, por ejemplo, de la semilla de maíz de los elatéridos. El tratamiento de las semillas con pesticidas tiene las ventajas de proporcionar la protección de las semillas, mientras que se minimiza la cantidad de pesticida que se requería y se limita la cantidad de contacto con el pesticida y el número de distintas aplicaciones de campo que eran necesarias.

55

En la patente U.S. n° 5.696.144, por ejemplo, se proporcionan otros ejemplos del control de plagas mediante la aplicación de insecticidas directamente a la semilla de la planta, que desvela que el barrenador europeo del maíz causó menos daño de alimentación a las plantas de maíz cultivadas a partir de semillas tratadas con un compuesto de 1-arilpirazol a una tasa de 500 g por quintal de semilla que las plantas de control cultivadas a partir de semillas sin tratar. Además, la patente U.S. n° 5.876.739 otorgada a Turnblad *et al.* (y su antecesora, la patente U.S. n° 5.849.320) desvela un procedimiento para controlar los insectos endémicas de la tierra, lo que implica tratar las semillas con un revestimiento que contiene uno o más aglutinantes poliméricos y un insecticida. Esta referencia proporciona una lista de insecticidas que identifica como candidatos para su uso en este revestimiento y también nombra un número de insectos objetivo potenciales. Sin embargo, aunque la patente 5.876.739 expone que el tratamiento de la semilla de maíz con un revestimiento que contiene un insecticida en particular protege a las raíces del maíz del daño causado por

60

65

el gusano de las raíces del maíz, no indica ni sugiere de otra manera que dicho tratamiento pueda ser utilizado con semillas que tengan un evento transgénico.

El tratamiento de la semilla que tiene un evento transgénico con pesticidas de compuestos nitroimino o nitroguanidino ha sido mencionado (véase, por ejemplo, el documento WO 99/35913) y el documento WO 99/35910, sin embargo, no se han encontrado directrices acerca de la utilidad o eficacia potencial de dichos tratamientos, ni los detalles de cómo se podrían efectuar dichos tratamientos -como las cantidades de ingrediente activo que serían necesarias por unidad de cantidad de semilla- y ningún ejemplo que pudiera dar motivos para creer que los tratamientos propuestos proporcionarían en realidad una protección adecuada.

Por lo tanto, aunque los desarrollos recientes en la ingeniería genética de las plantas han mejorado la capacidad para proteger a las plantas de las plagas sin utilizar pesticidas químicos, y aunque dichas técnicas como el tratamiento de las semillas con pesticidas han reducido los efectos perjudiciales de los pesticidas en el medio ambiente, aún continúan habiendo numerosos problemas que limitan la aplicación con éxito de estos procedimientos bajo condiciones reales del campo. En consecuencia, sería útil proporcionar un procedimiento mejorado para la protección de las plantas, especialmente de plantas de maíz, contra el daño provocado por la alimentación de las plagas. Sería particularmente útil si dicho procedimiento redujese la tasa requerida de aplicación de pesticidas químicos convencionales, y también si limitase el número de las distintas operaciones de requeridas en los campos para la plantación y el cultivo de la cosecha.

### Breve resumen de la invención

La presente invención está dirigida hacia un procedimiento novedoso para proteger una planta transgénica de maíz contra el daño causado por la alimentación de un insecto, comprendiendo el procedimiento proporcionar una semilla para la planta transgénica de maíz, semilla que comprende un gen que codifica una proteína insecticida Cry3 y tratar la semilla con insecticida de imidacloprida o teflutrina en una cantidad desde 200 gramos hasta 500 gramos de ingrediente activo por 100 kilogramos de la semilla.

La presente invención también está dirigida hacia una semilla de una planta transgénica de maíz que proporciona una mayor resistencia a la planta resultante de maíz contra el daño causado por la alimentación de un insecto, que comprende un gen que codifica una proteína insecticida Cry3 y tratar la semilla con insecticida de imidacloprida o teflutrina en una cantidad desde 200 gramos hasta 500 gramos de ingrediente activo por 100 kilogramos de la semilla.

La presente invención también está dirigida hacia una semilla transgénica novedosa que ha sido tratada por medio del procedimiento de la presente invención.

Por lo tanto, entre las diversas ventajas que se descubrió que se consiguen mediante la presente invención, se puede señalar la provisión de un procedimiento mejorado para la protección de las plantas, especialmente de plantas de maíz, del daño causado por la alimentación de las plagas; la provisión de dicho procedimiento, que reduciría la tasa requerida de aplicación de pesticidas químicos convencionales; y también la provisión de dicho procedimiento, que limitaría el número de las distintas operaciones de que eran requeridas en los campos para la plantación y cultivación de la cosecha.

### Descripción detallada de la invención

Conforme a la presente invención, se ha descubierto que se puede proteger a las plantas de maíz contra el daño causado por la alimentación de una o más plagas por medio de un procedimiento como se ha descrito anteriormente. Se ha descubierto que la combinación de un evento transgénico que tiene una actividad contra los gusanos de las raíces del maíz y el tratamiento de la semilla como se ha descrito anteriormente proporciona de forma imprevista ventajas sinérgicas a las semillas que tienen dicho tratamiento, incluyendo una eficacia superior de forma imprevista para la protección contra el daño a la planta resultante de maíz por el gusano de las raíces del maíz. En particular, se descubrió que las semillas de maíz que tenían un evento transgénico que causaba la producción de la endotoxina CryBb.11231 en combinación con el tratamiento de dichas semillas con imidacloprida era superior de forma imprevista o al evento transgénico por sí solo, o al tratamiento por sí solo de dichas semillas con imidacloprida, para proteger a las plantas resultantes de maíz contra niveles más severos de daño causado por gusanos de las raíces del maíz - niveles de daño que se sabe reducen la producción de maíz.

Se sabe de plantas y de semillas de maíz que han sido diseñadas para incluir genes exógenos derivados de *Bacillus thuringiensis* que codifica la expresión de endotoxinas- $\delta$  Cry3 que tienen una actividad contra las plagas coleópteras, al igual que procedimientos para el tratamiento de las semillas (incluso algunas semillas transgénicas) con pesticidas. Sin embargo, hasta la presente invención, no se había comprendido que se podían utilizar ciertas cantidades efectivas de ciertos pesticidas para tratar las semillas de maíz que tienen dichos eventos Cry3, resultando en que la combinación sería efectiva, y preferentemente, de forma imprevista, superior, al aumentar la eficacia tanto del pesticida como del evento transgénico, y proporcionaría las ventajas adicionales de aumentar la capacidad para igualar la actividad pesticida contra la presión de la plaga, disminuir el coste del tratamiento y/o de la aplicación, aumentar la seguridad de la manipulación de las semillas, y disminuir el impacto medioambiental del evento o del pesticida, o de ambos.

En particular, se ha descubierto en las realizaciones preferidas que el tratamiento de la invención de semillas transgénicas de maíz que son capaces de expresar ciertas proteínas Cry3Bb modificadas proporcionaba de forma imprevista una protección superior contra los gusanos de las raíces del maíz. Además, se cree que dichas combinaciones también son efectivas para proteger a las plantas de maíz que están brotando contra el daño causado por las orugas podadoras negras. También se cree que las semillas de la presente invención tienen la propiedad de disminuir el coste del uso de pesticidas, porque se puede utilizar menos pesticida para obtener una cantidad requerida de protección que si no se utilizase el procedimiento innovador. Además, debido a que se utiliza menos pesticida y debido a que se aplica antes de la plantación y sin una aplicación específica en los campos, se cree que por lo tanto el procedimiento objeto es más seguro para el operario y para el medio ambiente, y es potencialmente menos caro que los procedimientos convencionales.

Cuando se dice que algunos efectos son “sinérgicos”, se quiere decir que incluyen los efectos sinérgicos de la combinación de la combinación del evento transgénico y del pesticida en la actividad pesticida (o eficacia). Sin embargo, no se pretende que dichos efectos sinérgicos estén limitados a la actividad pesticida, sino que deberían incluir también dichas ventajas imprevistas como el aumento del alcance de actividad, un perfil de actividad ventajoso en relación al tipo y la cantidad de reducción del daño, una disminución del coste del pesticida y de su aplicación, una disminución de la distribución del pesticida en el medio ambiente, una exposición disminuida al pesticida del personal que produce, manipula y planta las semillas de las plantas de maíz, y otras ventajas conocidas por los expertos en la técnica.

La presente invención también proporciona una ventaja de aumentar la capacidad para igualar la actividad pesticida contra la presión de la plaga. Esto hace referencia a la capacidad para diseñar la combinación del evento transgénico y del tratamiento del pesticida de forma que la semilla o la planta resultante esté provista de una actividad pesticida efectiva durante el periodo en el que la intensidad de la alimentación de la plaga objetivo sobre la semilla o la planta alcanza su máximo. A título de ejemplo, cuando se aplica un pesticida como imidacloprida o teflutrina a una semilla de maíz que tiene un evento transgénico contra los gusanos de las raíces del maíz, se puede aplicar el pesticida en un revestimiento diseñado para proporcionar una liberación controlada del pesticida. Se puede seleccionar la tasa de liberación de forma que el pesticida proporcione protección contra dichas otras plagas como, por ejemplo, la oruga podadora negra, en la etapa posterior al brote del maíz, mientras que el evento transgénico proporciona una protección contra los gusanos de las raíces del maíz en una etapa posterior del desarrollo de la planta - cuando es necesaria dicha protección.

Según se utilizan en el presente documento, los términos “efecto pesticida” y “actividad pesticida” o “actividad” hacen referencia a un efecto tóxico contra una plaga. La expresión “actividad contra (una o más) plagas” también tiene el mismo significado. Cuando se dice que una semilla o una planta está “protegida contra el daño causado por la alimentación de una o más plagas”, se quiere decir que dicha semilla o planta posee una característica que tiene una acción directa o indirecta sobre una o más plagas que tiene como resultado un daño reducido causado por la alimentación de dicha plaga o plagas en las semillas, raíces, tallos y follaje de las plantas que tienen dicha característica en comparación con el daño causado por la alimentación bajo las mismas condiciones a plantas que no tienen dicha característica. Dichas acciones directas o indirectas incluyen inducir la muerte de la plaga, repeler la plaga de las semillas, raíces, tallos y/o follaje de la planta, inhibir la alimentación de la plaga con las semillas, las raíces, los tallos y/o el follaje de la planta, o la puesta de sus huevos en los mismos, e inhibir o prevenir la reproducción de la plaga.

La expresión “actividad insecticida” tiene el mismo significado que actividad pesticida, excepto que está limitado a aquellos casos en los que la plaga es un insecto. Salvo cuando se señala específicamente, cuando se utiliza el término “pesticida” en el presente documento, ese término hace referencia a un pesticida químico que se suministra externamente a la semilla, y no se quiere decir que incluya agentes activos producidos por la semilla en particular o por la planta que crece de la semilla en particular. Sin embargo, se pueden utilizar las expresiones “actividad pesticida” y “actividad insecticida” haciendo referencia a la actividad de cualquiera de los dos, o de ambos, de entre un pesticida suministrado externamente y/o un agente producido por la semilla o por la planta.

Una característica de la presente invención es una semilla de una planta transgénica de maíz. Según se utiliza en el presente documento, la expresión “planta transgénica de maíz” significa una planta de maíz o progenie de la misma derivada de una célula o protoplasto transformado de una planta de maíz, en la que el ADN de la planta contiene una molécula exógena de ADN introducida que no estaba presente originalmente en una planta nativa, no transgénica de la misma variedad.

La semilla transgénica de maíz es una que contiene un gen exógeno que codifica una proteína pesticida. Las proteínas pesticidas de este tipo están descritas por Schnepf *et al.*, en *Microbiology & Molecular Biology Reviews*, 62: 775 - 806 (1998), y por French-Constant y Bowen, en *CMSL Cell. Mol. Life Sci.*, 57: 828 - 833 (2000). En una aplicación de la invención, la proteína pesticida es una proteína insecticida.

Se prefiere que la semilla contenga un gen exógeno derivado a partir de una variedad de *Bacillus thuringiensis*, y en particular, se prefiere que el gen exógeno sea uno que codifique una endotoxina- $\delta$  insecticida derivada de *B. thuringiensis*. Dichas endotoxinas- $\delta$  son descritas en el documento WO 99/31248 y en la patente U.S. n° 6.063.597, e incluyen las toxinas Cry3. Los segmentos de ácido nucleico que codifican proteínas cristalinas modificadas de *B. thuringiensis*, tóxicas para los coleópteros, que son útiles en la presente invención se describen en la patente U.S. n° 6.060.594, y las plantas transgénicas resistentes a insectos, que incluyen secuencias de ácido nucleico que codifican dichas proteínas insecticidas son analizadas en la patente U.S. n° 6.023.013. Se prefiere que las endotoxinas- $\delta$  de la

presente invención incluyan las proteínas Cry3B, y aún se prefiere más que las endotoxinas- $\delta$  incluyan las proteínas Cry3Bb activas en los coleópteros. La nomenclatura de las proteínas cristalinas insecticidas de *B. thuringiensis* fue expuesta por Höfte y Whitely, Microbiol. Rev., 53: 242-255, 1989. Esta nomenclatura ha sido revisada, y se puede encontrar la nomenclatura revisada en <http://epunix.biols.susx.ac.uk/Home/Neil-Crickmore/Bt/index.html>. En el presente documento se utilizará la nomenclatura revisada para describir las características del evento transgénico y las proteínas de las endotoxinas- $\delta$  codificadas por el evento transgénico.

Cuando se utiliza en el presente documento la expresión “evento transgénico”, se quiere decir que dicha expresión hace referencia al ADN diseñado genéticamente que se ha descrito anteriormente, pero que también incluye la o las proteínas que son codificadas por el gen modificado. Por lo tanto, un evento transgénico en una semilla de maíz, o en una planta de maíz, incluye la capacidad para expresar una proteína. Cuando se dice que un “evento transgénico tiene actividad contra una plaga”, se debe comprender que es la proteína la que está codificada por el gen que tiene realmente dicha actividad cuando se expresa la proteína y se pone en contacto con la plaga.

El documento WO 99/31248 y la patente U.S. n° 6.063.597 describen procedimientos para diseñar genéticamente genes de endotoxinas- $\delta$  de *B. thuringiensis* de forma que se puedan expresar las endotoxinas- $\delta$  modificadas. Las endotoxinas- $\delta$  modificadas difieren de las proteínas de tipo salvaje al tener sustituciones, adiciones o eliminaciones específicas de aminoácidos en comparación con las proteínas producidas por el organismo de tipo salvaje. En el presente documento, dichas endotoxinas- $\delta$  modificadas son identificadas mediante el uso de un asterisco (\*), o mediante referencia a una proteína específica por su número de identificación. Por lo tanto, una endotoxina- $\delta$  Cry3 modificada genéticamente se expresaría como Cry3\*, ejemplos de lo cual incluyen la Cry3Bb.11231, y la Cry3Bb.11098.

Se descubrió que algunas de las endotoxinas- $\delta$  modificadas que fueron descritas en el documento WO 99/31248 y en la patente U.S. n° 6.063.597 tenían una actividad mejorada contra insectos coleópteros, y en particular contra *Diabrotica spp.*, incluyendo los gusanos de las raíces del maíz. Según se utiliza en el presente documento, la expresión “actividad mejorada” hace referencia a la mayor actividad insecticida de una toxina modificada en comparación con la actividad de la misma toxina sin las modificaciones de aminoácidos cuando se prueban a ambas bajo las mismas condiciones. En particular, se descubrió que las endotoxinas- $\delta$  Cry3\* tenían una actividad mejorada contra los gusanos de las raíces del maíz, y por lo tanto son preferidas para su uso en la presente invención. Más preferidas son las endotoxinas- $\delta$  Cry3B\*, y aún más preferidas las endotoxinas- $\delta$  Cry3Bb\*. Eventos transgénicos incluso aún más preferidos son los que comprenden la capacidad para expresar las endotoxinas- $\delta$  modificadas que están listadas en la siguiente tabla. También se muestran en la tabla las variedades transgénicas de *B. thuringiensis* que incluyen genes para la expresión de las endotoxinas novedosas respectivas, y la fecha y el número de acceso de su depósito en el Agricultural Research Service Collection (NRRL) en 1815 N. University Street, Peoria, Illinois, 91904.

VARIEDAD	FECHA DEL DEPÓSITO	PROTEÍNA	NÚMERO DE ACCESO (NÚMERO NRRL)
EG11231	27/5/97	Cry3Bb.11231	B-21769
EG11098	28/11/97	Cry3Bb.11098	B-21903

También se ha descubierto que un uso preferido de la presente invención es para reducir el daño causado por la alimentación de la plaga cuando se utiliza en combinación con semillas que tienen eventos transgénicos que tienen ciertos niveles de efectividad contra dicha plaga. Para ilustrar qué niveles de efectividad son los preferidos, el siguiente ejemplo utilizará el procedimiento de Iowa para la clasificación de raíces (Hills y Peters, J. Econ. Entomol., 64: 764-765, 1971), que mide el daño causado a las raíces del maíz por la alimentación de los gusanos de las raíces del maíz en una escala de 1 - 6. En la clasificación, 1 = ningún daño o únicamente unas pocas cicatrices causadas por la alimentación; 2 = cicatrices evidentes causadas por la alimentación pero no se comió ninguna raíz hasta menos de  $3,81 \times 10^{-2}$  m de la planta; 3 = se comieron varias raíces hasta menos de  $3,81 \times 10^{-2}$  m de la planta, pero nunca se destruye el equivalente de un nodo completo de raíces; 4 = un nodo de raíces destruido por completo; 5 = dos nodos de raíces destruidos por completo; y 6 = tres o más nodos de raíces destruidos. Se define una raíz destruida como una raíz que ha sido podada hasta menos de  $3,81 \times 10^{-2}$  m de la base. Las raíces podadas no tienen por qué originarse de un único nodo, pero todas las raíces podadas deben ser iguales al equivalente de un nodo completo para contar como un nodo destruido.

Según se utiliza en el presente documento, un evento transgénico se encuentra en el intervalo preferente del nivel de efectividad contra una plaga objetivo si ese evento reduce el daño causado por la alimentación de esa plaga una cierta cantidad en comparación con la misma cosecha sin el evento transgénico, pero no previene sustancialmente todo el daño causado por la plaga objetivo. Por ejemplo, si el 10% del maíz transgénico sufrió daño causado por los gusanos de las raíces del maíz de 4 o más en la escala Iowa de 1 - 6, mientras que el 80% del maíz no transgénico sufrió un daño de 4 o más, entonces se podría decir que el daño al maíz transgénico fue del  $(10/80) \times 100 = 12,5\%$  del daño del maíz no transgénico. Para los fines de la presente invención, se comprenderá que un evento transgénico en el maíz se encuentra en el intervalo preferente del nivel de efectividad si el maíz que tiene dicho evento sufre desde aproximadamente el 5% hasta aproximadamente el 50% del daño sufrido por el maíz no transgénico debido a

la misma plaga bajo las mismas condiciones. Es más preferente que el maíz que tiene dicho evento transgénico sufra desde aproximadamente el 10% hasta aproximadamente el 40% del daño sufrido por el maíz no transgénico causado por la misma plaga bajo las mismas condiciones, incluso más preferentemente el daño va desde aproximadamente el 15% hasta aproximadamente el 30%, y aún más preferentemente el daño va desde aproximadamente el 20% hasta aproximadamente el 30% del daño sufrido por el maíz no transgénico causado por la misma plaga bajo las mismas condiciones. Según se utiliza en el presente documento, cuando se utiliza el término “aproximadamente” para describir el grado de daño al maíz, se debe comprender que el grado de daño puede ser superior o inferior a los límites descritos hasta en un 1% o un 2% y aún considerarse que está en los intervalos descritos. A título de ejemplo, un nivel de daño del 4,5% sería considerado como de “aproximadamente el 5%”.

Sin desear estar restringidos a esta o a cualquier otra teoría, se cree que el tratamiento pesticida de la semilla puede proporcionar ventajas significativas cuando se combina con un evento transgénico que proporciona una protección que está en el intervalo de efectividad preferente contra una plaga objetivo. Además, se cree que hay situaciones bien conocidas por los expertos en la técnica, en las que es ventajoso tener dichos eventos transgénicos en el intervalo preferente de efectividad.

La presente invención también incluye semillas y plantas que tienen más de un evento transgénico. Dichas combinaciones son denominadas como eventos transgénicos “apilados”. Estos eventos transgénicos apilados pueden ser eventos que están dirigidos a la misma plaga objetivo, o pueden estar dirigidos a distintas plagas objetivo. En un procedimiento preferente, una semilla que tiene la capacidad para expresar una proteína Cry 3 también tiene la capacidad para expresar al menos otra proteína insecticida que es distinta de una proteína Cry 3.

En otro procedimiento preferente, la semilla que tiene la capacidad para expresar una proteína Cry 3 también tiene un evento transgénico que proporciona una tolerancia herbicida. Se prefiere más que el evento transgénico que proporciona la tolerancia herbicida sea un evento que proporciona resistencia al glifosato, N-(fosfometil) glicina, incluyendo la forma salina de isopropilamina de dicho herbicida; se prefiere aún más el evento transgénico que es efectivo para proporcionar resistencia de las plantas y las semillas al herbicida ROUNDUP READY® disponible en Monsanto Co., St. Louis, Misuri.

En el presente procedimiento, se trata una semilla de maíz que tiene un evento transgénico con un pesticida.

El piretroide sintético utilizado en la presente invención es teflutrina.

Preferentemente, el cloronicotinilo utilizado en la composición objeto es imidacloprida (1-[(6-cloro-3-piridinil)metil]-N-nitro-2-imidazolidinimina, CAS RN 138261-41-3).

Cuando se describe un insecticida en el presente documento, se debe comprender que se pretende que la descripción también incluya las formas salinas del insecticida al igual que cualquier forma isomérica y/o tautomérica del insecticida que exhiba la misma actividad insecticida que la forma del insecticida que se describe.

Los insecticidas que son útiles en el presente procedimiento pueden ser de cualquier grado o pureza que estén aprobados en la industria como dicho insecticida. Se pueden tolerar otros materiales que acompañan a los insecticidas en preparados comerciales como impurezas en los procedimientos y en las composiciones objeto, siempre que los otros materiales no desestabilicen la composición ni reduzcan ni destruyan significativamente la actividad de cualquiera de los componentes del insecticida o del evento transgénico contra la plagas o plagas objetivo. Una persona con un grado normal de dominio de la técnica de la producción de insecticidas puede identificar fácilmente aquellas impurezas que pueden ser toleradas y aquellas que no.

Se ha descubierto que el presente procedimiento es útil para proteger semillas y plantas contra insectos.

La plaga de insectos objetivo para la presente invención incluye insectos del orden Coleoptera, por ejemplo, *Agriotus spp.*, *Anthonomus spp.*, *Atomaria linearis*, *Chaetocnema tibialis*, *Cosmopolites spp.*, *Curculio spp.*, *Dermestes spp.*, *Diabrotica spp.*, *Epilachna spp.*, *Eremnus spp.*, *Leptinotarsa decemlineata*, *Lissorhoptrus spp.*, *Melolontha spp.*, *Oryzaephilus spp.*, *Otiorhynchus spp.*, *Phlyctinus spp.*, *Popillia spp.*, *Psylliodes spp.*, *Rhizopertha spp.*, *Scarabeidae*, *Sitophilus spp.*, *Sitotroga spp.*, *Tenebrio spp.*, *Tribolium spp.* y *Trogoderma spp.*

Se ha descubierto que la presente invención es particularmente efectiva cuando la plaga de insecto es una *Diabrotica spp.*, y especialmente cuando la plaga es *Diabrotica virgifera*, *Diabrotica barberi*, o *Diabrotica undecimpunctata*.

En el procedimiento de la presente invención, se aplica el pesticida a una semilla transgénica de maíz. Aunque se cree que se puede aplicar el presente procedimiento a una semilla transgénica de maíz en cualquier estado fisiológico, se prefiere que la semilla se encuentre en un estado lo suficientemente durable para que no sufra ningún tipo de daño durante el procedimiento del tratamiento. Típicamente, la semilla sería una semilla que ha sido cosechada del campo; extraída de la planta; y separada de cualquier mazorca, tallo, cáscara externa, y pulpa que la rodea u otro material de la planta que no sea semilla. Preferentemente, la semilla también sería biológicamente estable hasta el punto de que el tratamiento no causaría ningún daño biológico a la semilla. Por ejemplo, en una realización, se puede aplicar el tratamiento a la semilla de maíz que ha sido cosechada, limpiada y secada hasta un contenido de humedad por debajo de aproximadamente el 15% en peso. En una realización alternativa, la semilla puede ser una que ha sido secada y luego

## ES 2 325 482 T3

preparada con agua y/u otro material y luego vuelta a secar antes o durante el tratamiento con el pesticida. Dentro de las limitaciones que se acaban de describir, se cree que el tratamiento puede aplicarse a la semilla en cualquier momento entre la cosecha de la semilla y la siembra de la semilla. Según se utiliza en el presente documento, se pretende que la expresión “semilla no sembrada” incluye una semilla en cualquier periodo entre la cosecha de la semilla y la siembra de la semilla en la tierra para el propósito de la germinación y el crecimiento de la planta.

Cuando se dice que la semilla no sembrada está “tratada” con el pesticida, no se quiere decir que dicho tratamiento incluya aquellas prácticas en las que se aplica el pesticida a la tierra, en vez de a la semilla. Por ejemplo, no se considera que dichos tratamientos como la aplicación del pesticida en capas, capas “T”, o en surcos, al mismo tiempo que se siembra la semilla estén incluidos en la presente invención.

El pesticida, o la combinación de pesticidas, pueden ser aplicado “puro”, es decir, sin ninguna dilución ni componentes adicionales presentes. Sin embargo, el pesticida se aplica típicamente a las semillas en forma de una formulación de pesticida. Esta formulación puede contener uno o más componentes deseables incluyendo, sin estar limitados a ellos, diluyentes líquidos, aglutinantes para servir como una matriz para el pesticida, rellenos para proteger a las semillas durante condiciones de tensión, y plastificantes para mejorar la flexibilidad, adhesión y/o extensibilidad del revestimiento. Además, para formulaciones aceitosas de pesticida que contienen poco o ningún relleno, puede ser deseable añadir a la formulación desecantes como carbonato cálcico, caolín o arcilla bentonita, perlita, tierra diatomácea o cualquier otro material adsorbente. El uso de dichos componentes en los tratamientos de semillas es conocido en la técnica. Véase, por ejemplo, la patente U.S. n° 5.876.739. El experto en la técnica puede seleccionar fácilmente los componentes deseables para ser utilizados en la formulación del pesticida dependiendo del tipo de semilla que vaya a ser tratada y el pesticida seleccionado en particular. Además, se pueden utilizar las formulaciones comerciales que se pueden conseguir fácilmente de pesticidas conocidos, como se demuestra en los ejemplos a continuación.

Las semillas también pueden ser tratadas con uno o más de los siguientes ingredientes: otros pesticidas, incluyendo compuestos que actúan únicamente bajo tierra; fungicidas, como captán, tiram, metalaxilo, (metoxam = isómero resuelto de metalaxilo), fludioxonilo, oxadixilo, e isómeros de cada uno de esos materiales, y similares; herbicidas, incluyendo compuestos seleccionados de entre carbamatos, tiocarbamatos, acetamidas, triacinas, dinitroanilinas, éteres de glicerol, piridacinas, uracilos, fenoxis, ureas y ácidos benzoicos; acondicionadores para herbicidas como benzoazina, derivados de benzhidrilo, N,N-dialil dicloroacetamida, diversos dihaloacilos, compuestos de oxazolidinilo y de tiazolidinilo, etanona, compuestos anhídridos naftálicos, y derivados de oximas; fertilizantes; y agentes de control biológico como bacterias y hongos que se dan naturalmente o recombinantes del género *Rhizobium*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Trichoderma*, *Glomus*, *Gliocladium* y hongos micorrizales. Estos ingredientes pueden ser añadidos como una capa aparte en la semilla o, de manera alternativa, pueden ser añadidos como parte de la composición del pesticida.

Preferentemente, la cantidad de la composición novedosa o de otros ingredientes utilizada en el tratamiento de semillas no debería inhibir la generación de la semilla ni causar daño fitotóxico a la semilla.

La formulación del pesticida que se utiliza para tratar la semilla transgénica de maíz en la presente invención puede tener la forma de una suspensión; emulsión; mezcla de partículas en un medio acuoso (por ejemplo, agua); polvo humectable; gránulos humectables (fluibles en seco); y gránulos secos. Si se formula como una suspensión o mezcla, la concentración del ingrediente activo en la formulación es preferentemente desde aproximadamente el 0,5% hasta aproximadamente el 99% en peso (p/p), preferentemente entre 5-40%.

Como se ha mencionado anteriormente, se pueden incorporar otros ingredientes convencionales inactivos o inertes en la formulación. Dichos ingredientes inertes incluyen, pero no están limitados a: agentes convencionales de fijación, agentes de dispersión como la metilcelulosa (Methocel A15LV o Methocel A15C, por ejemplo, hacen de agentes combinados de dispersión/fijación para su uso en tratamientos de semillas), alcohol de polivinilo (por ejemplo, Elvanol 51-05), lecitina (por ejemplo, Yelkinol P), dispersantes poliméricos (por ejemplo, polivinilpirrolidona/acetato de vinilo PVP/VA S-630), espesantes (por ejemplo, espesantes de arcilla como Van Gel B para mejorar la viscosidad y reducir el asentamiento de las suspensiones de partículas), estabilizadores de emulsiones, tensioactivos, compuestos anti-congelantes (por ejemplo, urea), tintes, colorantes, y similares. Se pueden encontrar ingredientes inertes adicionales útiles en la presente invención en McCutcheon's, vol. 1, “Emulsifiers and Detergents”, MC Publishing Company, Glen Rock, Nueva Jersey, EE. UU., 1996. Se pueden encontrar ingredientes inertes adicionales útiles en la presente invención en McCutcheon's, vol. 2, “Functional Materials”, MC Publishing Company, Glen Rock, Nueva Jersey, EE. UU., 1996.

Los pesticidas y las formulaciones de pesticidas de la presente invención pueden ser aplicados a las semillas por medio de cualquier metodología estándar de tratamiento de semillas, incluyendo su mezcla en un recipiente (por ejemplo, una botella o una bolsa), aplicación mecánica, mezcla en tambor, pulverización e inmersión. Se puede utilizar cualquier material convencional activo o inerte para poner a las semillas en contacto con los pesticidas conforme a la presente invención, tal como materiales convencionales de revestimiento con películas, incluyendo, sin estar limitados a ellos, materiales de revestimiento con películas de base acuosa como Sepiret (Seppic, Inc., Fairfield, Nueva Jersey) y Opacoat (Berwind Pharm. Services, Westpoint, Pensilvania).

Los pesticidas objeto pueden ser aplicados como un componente de un revestimiento para semillas. Los procedimientos y las composiciones de revestimiento para semillas conocidos en la técnica son útiles cuando son modificados

## ES 2 325 482 T3

por la adición de una de las realizaciones de la combinación de pesticidas de la presente invención. Dichos procedimientos y aparatos de revestimiento para su aplicación se desvelan en, por ejemplo, las patentes U.S. n<sup>os</sup> 5.918.413, 5.891.246, 5.554.445, 5.389.399, 5.107.787, 5.080.925, 4.759.945 y 4.465.017. Las composiciones de revestimiento para semillas se desvelan, por ejemplo, en las patentes U.S. n<sup>os</sup> 5.939.356, 5.882.713, 5.876.739, 5.849.320, 5.834.447, 5.791.084, 5.661.103, 5.622.003, 5.580.544, 5.328.942, 5.300.127, 4.735.015, 4.634.587, 4.383.391, 4.372.080, 4.339.456, 4.272.417 y 4.245.432, entre otras.

Los revestimientos útiles de semillas contienen uno o más aglutinantes y al menos una de las combinaciones objeto de pesticidas.

Los aglutinantes útiles en la presente invención comprenden preferentemente un polímero adhesivo que puede ser natural o sintético y que no tiene efecto fitotóxico sobre la semilla que va a ser revestida. El aglutinante puede estar seleccionado de entre acetatos de polivinilo; copolímeros de acetato de polivinilo; copolímeros de etileno vinil acetato (EVA); alcoholes de polivinilo; copolímeros de alcohol de polivinilo; celulosas, incluyendo etilcelulosas, metilcelulosas, hidroximetilcelulosas, hidroxipropilcelulosas y carboximetilcelulosa; polivinilpirolidonas; polisacáridos, incluyendo almidón, almidón modificado, dextrinas, maltodextrinas, alginato y quitosanos; grasas; aceites; proteínas, incluyendo gelatina y zeínas; gomas arábicas; lacas; cloruro de vinilideno y copolímeros de cloruro de vinilideno; lignosulfonatos de calcio; copolímeros acrílicos; polivinilacrilatos; óxido de polietileno; polímeros y copolímeros de acrilamida; acrilato de polihidroxietilo, monómeros de metilacrilamida; y policloropreno.

Se prefiere que el aglutinante esté seleccionado de forma que pueda servir como una matriz para los pesticidas objeto. Aunque todos los aglutinantes desvelados anteriormente pueden ser útiles como una matriz, el aglutinante específico dependerá de las propiedades de la combinación de los pesticidas. El término "matriz", según se utiliza en el presente documento, significa una fase sólida continua de uno o más compuestos aglutinantes en los cuales están distribuidos uno o más de los pesticidas objeto como una fase discontinua. Opcionalmente, también pueden estar presentes en la matriz un relleno y/u otros componentes. Se debe comprender que el término matriz incluye lo que puede ser visto como el sistema de matriz, un sistema de depósito o un sistema microencapsulado. En general, un sistema de matriz consiste en pesticidas de la presente invención y un relleno disperso de manera uniforme en un polímero, mientras que un sistema de depósito consiste en una fase aparte que comprende los pesticidas objeto, que está disperso físicamente en una fase polimérica circundante, limitante de la tasa. La microencapsulación incluye el revestimiento de pequeñas partículas o gotitas de líquido, pero también las dispersiones en una matriz sólida.

La cantidad de aglutinante en el revestimiento puede variar, pero estará en el intervalo de 0,01 hasta 25% del peso de la semilla, más preferentemente entre 0,05 y 15%, y aún más preferentemente entre 0,1% y 10%.

Como se ha mencionado anteriormente, la matriz puede incluir un relleno. El relleno puede ser un absorbente o un relleno inerte, como los conocidos en la técnica, y puede incluir serrines, arcillas, carbón activado, azúcares, tierra diatomácea, harinas de cereales, sólidos inorgánicos de grano fino, carbonato cálcico, y similares. Las arcillas y los sólidos inorgánicos, que pueden ser utilizados, incluyen bentonita cálcica, caolín, caolinita, talco, perlita, mica, vermiculita, sílices, polvo de cuarzo, montmorillonita y mezclas de los mismos. Los azúcares, que pueden ser útiles, incluyen dextrina y maltodextrina. Las harinas de cereales incluyen harina de trigo, harina de avena y harina de cebada.

El relleno está seleccionado de forma que proporcionará un microclima apropiado a la semilla, por ejemplo, se utiliza el relleno para aumentar la tasa de carga de los ingredientes activos y para ajustar la liberación controlada de los ingredientes activos. El relleno puede ayudar en la producción o en el procedimiento del revestimiento de la semilla. La cantidad de relleno puede variar, pero generalmente el peso de los componentes de relleno se encontrará en el intervalo de 0,05 al 75% del peso de la semilla, más preferentemente entre el 0,1 y el 50%, y aún más preferentemente entre el 0,5 y el 15%.

Los pesticidas que son útiles en el revestimiento son aquellos pesticidas que se describen en el presente documento. La cantidad de pesticida que se utiliza para el tratamiento de la semilla variará dependiendo del tipo de semilla y del tipo de ingredientes activos, pero el tratamiento comprenderá poner las semillas en contacto con una cantidad de la combinación de pesticidas que es efectiva como pesticida. Cuando la plaga objetivo son insectos, esa cantidad será una cantidad del insecticida que es efectiva como insecticida. Según se utiliza en el presente documento, una cantidad efectiva como insecticida significa aquella cantidad de insecticida que matará las plagas de insectos en un estado larvario o de crisálida de su desarrollo, o que reducirá o retrasará sistemáticamente la cantidad de daño producido por las plagas de insectos.

En general, la cantidad de teflutrina que se aplica a la semilla en el tratamiento variará desde 10 g hasta 2000 g del ingrediente activo del pesticida por 100 kg del peso de la semilla. Preferentemente, la cantidad de pesticida estará en el intervalo de 50 g hasta 1000 g de activo por 100 kg de semilla, más preferentemente entre el intervalo de 200 g hasta 500 g de activo por 100 kg de peso de semilla. De manera alternativa, se ha descubierto que es preferible que la cantidad preferente de imidacloprida sea de entre 200 y 500 g del ingrediente activo por 100 kg de la semilla.

En las realizaciones preferidas de la presente invención, el evento transgénico comprende la capacidad para expresar una proteína Cry3Bb.11231 o una proteína Cry3Bb.11098, y el pesticida está seleccionado de entre imidacloprida o teflutrina.

## ES 2 325 482 T3

Los pesticidas que se utilizan en el tratamiento no deben inhibir la germinación de la semilla y deberían ser eficaces en la protección de la semilla y/o de la planta durante ese momento del ciclo de la vida del insecto objetivo en la que causa daños a la semilla o a la planta. En general, el revestimiento será eficaz durante aproximadamente 0 a 120 días después de la siembra.

Los pesticidas de la invención objeto pueden ser aplicados a la semilla en forma de un revestimiento. El uso de un revestimiento es particularmente efectivo para acomodar cargas elevadas de pesticida, como pueden ser requeridas para tratar plagas típicamente resistentes, como los gusanos de las raíces del maíz, mientras que al mismo tiempo se previene una fitotoxicidad inaceptable debido al aumento de la carga de pesticida.

Opcionalmente, se puede utilizar un plastificante en la formulación del revestimiento. Los plastificantes se utilizan típicamente para fabricar la película que está formada por la capa del revestimiento más flexible, para mejorar la adhesión y la extendibilidad, y para mejorar la velocidad del tratamiento. Una flexibilidad mejorada de la película es importante para minimizar el picado, la rotura o el desconchado durante los procedimientos de almacenamiento, manipulación o siembra. Se pueden utilizar muchos plastificantes, sin embargo, los plastificantes útiles incluyen polietilenglicol, glicerol, butilbencilftalato, benzoatos de glicol y compuestos relacionados. El intervalo del plastificante en la capa de revestimiento estará en el intervalo desde 0,1 hasta 20% en peso.

Cuando el pesticida utilizado en el revestimiento es una formulación de tipo aceitosa y hay presente poco o nada de relleno, puede ser útil acelerar el procedimiento de secado al secar la formulación. Este paso opcional puede llevarse a cabo por medios bien conocidos en la técnica y pueden incluir la adición de carbonato cálcico, caolín o arcilla bentonita, perlita, tierra diatomácea, o cualquier material absorbente que sea añadido preferentemente al mismo tiempo con la capa pesticida de revestimiento para absorber el aceite o el exceso de humedad. La cantidad de carbonato cálcico o de los compuestos afines necesaria para proporcionar de manera efectiva un revestimiento seco estará en el intervalo de 0,5 al 10% del peso de la semilla.

Los revestimientos formados con el pesticida son preferentemente del tipo que son capaces de efectuar una tasa lenta de liberación del pesticida mediante difusión o movimiento a través de la matriz al medio circundante.

Además de la capa de revestimiento, la semilla puede ser tratada con uno o más de los siguientes ingredientes: otros pesticidas incluyendo fungicidas y herbicidas; acondicionadores para los herbicidas; fertilizantes y/o agentes de control biológico. Estos ingredientes se pueden añadir como una capa aparte o, de manera alternativa, se pueden añadir en la capa pesticida de revestimiento.

La formulación pesticida puede ser aplicada a las semillas utilizando técnicas y máquinas convencionales de revestimiento, como técnicas de lecho fluidizado, el procedimiento que emplea molinos de muelas horizontales, recipientes rotostáticos para el tratamiento de semillas, y revestidoras de tambor. También pueden ser útiles otros procedimientos, como lechos efervescentes. Se pueden clasificar previamente las semillas por tamaño antes de su revestimiento. Después del revestimiento, normalmente se secan las semillas y luego son transferidas a una calibradora para ser clasificadas por tamaño. Dichos procedimientos son conocidos en la técnica.

Las semillas tratadas con pesticida también pueden estar envueltas con una película de sobrerrecubrimiento para proteger el revestimiento pesticida. Dichos sobrerrecubrimientos son conocidos en la técnica y pueden ser aplicados utilizando técnicas convencionales de revestimiento de lecho fluidizado y de película en tambor.

En otra realización de la presente invención, se puede poner un pesticida en una semilla, o sobre la misma, mediante el uso de imprimación de matriz sólida. Por ejemplo, se puede mezclar una cantidad del pesticida con un material de matriz sólida y luego se puede colocar en contacto con el material de matriz sólida durante un periodo para permitir que se introduzca el pesticida en la semilla. Entonces, se puede separar la semilla opcionalmente del material de matriz sólida y ser almacenada o usada, o se puede almacenar o plantar directamente la mezcla del material de matriz sólida. Los materiales de matriz sólida que son útiles en la presente invención incluyen poliacrilamida, almidón, arcilla, sílice, alúmina, tierra, arena, poliurea, poliacrilato, o cualquier otro material capaz de absorber o adsorber el pesticida durante un tiempo y liberar ese pesticida en o sobre la semilla. Es útil asegurarse de que el pesticida y el material de matriz sólida son compatibles entre sí. Por ejemplo, el material de matriz sólida debería ser escogido de forma que pueda liberar el pesticida a una tasa razonable, por ejemplo durante un periodo de minutos, horas o días.

Adicionalmente, la presente invención plasma la inhibición como otro procedimiento de tratamiento de la semilla con el pesticida. Por ejemplo, se puede combinar una semilla de planta durante un periodo de tiempo con una disolución que comprende desde el 1% en peso hasta el 75% en peso del pesticida en un disolvente como el agua. Preferentemente, la concentración de la disolución es desde el 5% en peso hasta el 50% en peso, más preferentemente desde el 10% en peso hasta el 25% en peso. Durante el periodo en el que se combina la semilla con la disolución, la semilla absorbe (embebe) una porción del pesticida. Opcionalmente, se puede agitar la mezcla de la semilla de planta y la disolución, por ejemplo mediante agitación, volteado, mezcla en tambor u otros medios. Después del imbibición, se puede separar la semilla de la disolución y ser secada opcionalmente, por ejemplo mediante golpecitos o secada al aire.

En aún otra realización, se puede mezclar un pesticida en polvo directamente con la semilla. Opcionalmente, se puede utilizar un agente de fijación para adherir el polvo a la superficie de la semilla. Por ejemplo, se puede mezclar

## ES 2 325 482 T3

una cantidad de semillas con un agente de fijación y agitarlas opcionalmente para promover un revestimiento uniforme de la semilla con el agente de fijación. Entonces, la semilla revestida con el agente de fijación puede ser mezclada con el pesticida en polvo. Se puede agitar la mezcla, por ejemplo mediante tambor, para fomentar el contacto del agente de fijación con el pesticida en polvo, provocando de ese modo que el pesticida en polvo se pegue a la semilla.

5

La presente invención también proporciona una semilla transgénica de maíz que ha sido tratada con un pesticida por medio del procedimiento descrito anteriormente.

10 Las semillas tratadas de la presente invención pueden ser utilizadas para la propagación de las plantas de maíz de la misma forma que las semillas de maíz tratadas de forma convencional. Las semillas tratadas pueden ser almacenadas, manipuladas, sembradas y cultivadas de la misma forma que cualquier otra semilla tratada con pesticida. Se deberían tomar medidas apropiadas de seguridad para limitar el contacto de la semilla tratada con seres humanos, materiales de alimentos o de piensos, agua y aves y animales salvajes o domésticos.

15 Las realizaciones preferidas de la invención se describen en los siguientes ejemplos. En el presente documento serán evidentes otras realizaciones dentro del alcance de las reivindicaciones para un experto en la técnica a partir de la consideración de la especificación o la práctica de la invención como se revela en el presente documento.

20 Los siguientes ejemplos describen realizaciones preferidas de la invención. Serán evidentes otras realizaciones dentro del alcance de las reivindicaciones del presente documento para un experto en la técnica a partir de la consideración de la especificación o la práctica de la invención como se revela en el presente documento. Se pretende que la especificación, junto con los ejemplos, sea considerada únicamente ejemplar, estando el ámbito y el espíritu de la invención indicados por las reivindicaciones que siguen a los ejemplos. En los ejemplos, todos los porcentajes son dados con respecto al peso, a no ser que se indique lo contrario.

25

### Ejemplo 1

30 Producción de semillas de maíz que tienen un evento transgénico efectivo contra los gusanos de las raíces del maíz y el tratamiento de dicha semilla con imidacloprida (Gaucho<sup>®</sup>) y teflutrina (Raze<sup>®</sup>).

Se prepararon semillas de maíz para expresar la endotoxina Cry3Bb.11231 o Cry3Bb.11098 de *Bacillus thuringiensis* mediante los procedimientos descritos para estos eventos respectivos en el documento WO 99/31248.

35 Se trataron las semillas de maíz de la misma especie híbrida, con o sin los eventos transgénicos respectivos, bien con imidacloprida (disponible como GAUCHO<sup>®</sup> en Bayer Corp.) o con teflutrina (disponible como RAZE<sup>®</sup> en Wilbur-Ellis Co., Great Falls, Montana, Walla Walla, Washington) como sigue. Se preparó una formulación para el tratamiento de semillas del pesticida deseado al mezclar una cantidad medida con agua como vehículo y al aplicar la formulación durante un minuto a temperatura ambiente a un peso medido de semillas de maíz en un recipiente rotostático para el  
40 tratamiento de semillas. Se calcularon los pesos respectivos de la preparación del pesticida y de las semillas de maíz para proporcionar la tasa deseada de tratamiento del pesticida en la semilla. Se mezcló el pesticida en una cantidad de agua suficiente como para permitir una distribución eficiente de la formulación a todas las semillas en el lote mientras que se minimizó la pérdida de la formulación del tratamiento gracias a la falta de absorción de la formulación por las semillas. Se permitió que las semillas tratadas reposasen sin estar tapadas durante al menos cuatro horas antes de ser  
45 plantadas.

Cuando se trataron las semillas con imidacloprida, se mezcló perfectamente una cantidad suficiente de Gaucho<sup>®</sup> 600 FS (que contiene un 48,7% en peso de imidacloprida; disponible en Gustafson LLC) en agua para formar una formulación de tratamiento de semillas, y se aplicó la formulación a un peso de semillas de maíz para proporcionar  
50 niveles de tratamiento de 300 gramos de imidacloprida por 100 kg de semilla (0,75 mg de imidacloprida/grano), o de 400 gramos de imidacloprida por 100 kg de semilla (1,0 mg de imidacloprida/grano).

Cuando se trataron las semillas con teflutrina, se mezcló perfectamente una cantidad suficiente de Raze<sup>®</sup> 2.5 FS (que contiene un 26,8% en peso de teflutrina; disponible en Wilbur-Ellis Co.) en agua para formar una formulación  
55 de tratamiento de semillas, y se aplicó la formulación a un peso de semillas de maíz para proporcionar niveles de tratamiento de 300 gramos de teflutrina activa por 100 kg de semilla (0,75 mg de teflutrina/grano).

### Ejemplo 2

60

Pruebas de campo para la determinación de la eficacia del evento transgénico Cry3Bb.11231 en semillas de maíz en combinación con los tratamientos de pesticida contra los gusanos de las raíces del maíz para semillas contra los gusanos de las raíces del maíz occidentales y septentrionales.

65 Se llevaron a cabo pruebas de campo conforme a los protocolos pertinentes y en conformidad con los requerimientos de notificación del USDA. El propósito de las pruebas era determinar la eficacia del evento transgénico Cry3Bb.11231 en semillas de maíz en combinación con tratamientos contra los gusanos de las raíces del maíz para semillas contra los gusanos de las raíces del maíz occidentales y septentrionales.

## ES 2 325 482 T3

Para cada ubicación de cultivo seleccionada, el diseño del terreno incluía lo siguiente:

5	Separación entre hileras:	7,62 × 10 <sup>-1</sup> metros
	Tamaño del terreno:	4 hileras × 20
	Densidad de plantas:	6,56 semillas/m
	Híbrido utilizado:	LH198 × LH185 o RX670
10	Réplicas:	4
	Diseño:	Bloque completo aleatorizado
15	Ubicaciones:	4
	Fuente de larvas:	infestaciones naturales suplementadas mediante infestación artificial de huevos de gusano de las raíces del maíz con 1312 huevos/m (etapa de crecimiento V2)
20		

25 Se utilizaron las siguientes combinaciones de tratamiento para semillas para cada área de cultivo:

30	Nº	Tipo de semilla de maíz	Pesticida y cantidad (gramos de IA/100 kg de semilla o mg de ia/grano)
	1	Isohíbrido	Ninguno, aparte de niveles bajos para la protección contra elatéridos
35	2	Cry3Bb.11231	Ninguno, aparte de niveles bajos para la protección contra elatéridos
40	3	Cry3Bb.11231	Gaucho® 600 FS con 300 g de IA/100 kg o 0,75 mg de IA/grano
	4	Cry3Bb.11231	Gaucho® 600 FS con 400 g de IA/100 kg o 1,0 mg de IA/grano
45	5	Cry3Bb.11231	Raze® 2.5 FS con 300 g de IA/100 kg o 0,75 mg de IA/grano
50	6	Isohíbrido	Force® 3G con 0,014 g de IA/m, aplicado como una capa de 1,27 × 10 <sup>-1</sup> m en la superficie de la tierra en el momento de la plantación.
55	7	Isohíbrido	Lorsban® 15G (clorpirifos; disponible en DowElanco) con 0,11 g de IA/m, aplicado como una capa de 1,27 × 10 <sup>-1</sup> m en la superficie de la tierra en el momento de la plantación.
60			

65 Se llevaron a cabo todos los tratamientos de las semillas como se describe en el Ejemplo 1. En el tratamiento de semillas números 1 y 2, se utilizó Gaucho® para una protección contra elatéridos, pero a niveles lo suficientemente bajos como para que no se espere tener ningún efecto sobre los gusanos de las raíces del maíz (es decir, a un nivel de tratamiento de aproximadamente 60 g de activo/100 kg de semilla o 0,16 mg de activo/grano), de lo contrario, la semilla

## ES 2 325 482 T3

que recibió el tratamiento número 2 únicamente tenía un evento transgénico Cry3Bb.11231 y ningún tratamiento de pesticida que podría esperarse que fuera efectivo contra los gusanos de las raíces del maíz.

Para las semillas que tenían tratamientos numerados 3 a 5, se aplicaron los pesticidas por medio de los procedimientos descritos en el Ejemplo 1. Para las semillas que tenían tratamientos numerados 6 y 7, se aplicó Force® 3G y Lorsban® 15G disponibles comercialmente a la tierra en una capa de  $1,27 \times 10^{-1}$  m en el momento de la siembra. Se muestran los niveles de aplicación y están en los intervalos recomendados para una práctica estándar comercial.

Las semillas de maíz que iban a ser probadas fueron plantadas y cultivadas en cuatro ubicaciones distintas en cuatro Estados del medio oeste en el cinturón del maíz de los Estados Unidos conforme al protocolo descrito anteriormente.

La determinación del daño causado por los gusanos de las raíces del maíz se llevó a cabo conforme al siguiente protocolo. En las etapas V4 - V6, se llevó a cabo una evaluación de primera toma al contar el número de plantas por hectárea. En la etapa VT-R1, se llevó a cabo una evaluación del daño causado por los gusanos de las raíces del maíz mediante procedimientos bien conocidos en la industria, y se informó del daño causado por los gusanos de las raíces del maíz conforme al sistema de clasificación Iowa 1 - 6. En este sistema, se recuperaron y se puntuaron los sistemas de raíces de 10 plantas de maíz por terreno utilizando la escala de clasificación 1 - 6, en la que: 1 = ningún daño o únicamente unas pocas cicatrices causadas por la alimentación, 2 = cicatrices evidentes causadas por la alimentación pero no se comió ninguna raíz hasta menos de  $3,81 \times 10^{-2}$  m de la planta, 3 = se comió al menos una raíz hasta menos de  $3,81 \times 10^{-2}$  m de la planta, pero nunca se destruye un nodo completo de raíces, 4 = un nodo de raíces comido hasta menos de  $3,81 \times 10^{-2}$  m de la planta, 5 = dos nodos (círculos) de raíces comidos hasta menos de  $3,81 \times 10^{-2}$  m de la planta, 6 = tres nodos (círculos) de raíces comidos hasta menos de  $3,81 \times 10^{-2}$  m de la planta.

TABLA 1(A)

*Daño causado por gusanos de las raíces del maíz a las plantas isohíbridas de maíz que tienen tratamientos convencionales en capas, y a las plantas de maíz que tienen un evento transgénico Cry3Bb.11231 solo o en combinación con el tratamiento para semillas con pesticidas seleccionados en cuatro ubicaciones de cultivo*

SEMILLA Nº	UBICACIÓN A	UBICACIÓN B	UBICACIÓN C	UBICACIÓN D	MEDIAS DE LAS UBICACIONES
1	4,3	4,0	4,0	4,2	4,1
2	2,5	2,4	2,2	2,0	2,3
3	2,1	2,3	2,5	1,9	2,2
4	1,8	2,3	2,2	1,8	2,0
5	2,3	2,3	2,6	1,8	2,2
6	2,7	2,1	2,6	1,9	2,3
7	3,3	2,4	2,5	1,8	2,5

De los datos de la Tabla 1(A), se puede ver que las semillas transgénicas que fueron tratadas bien con imidacloprida o con teflutrina a cualquier nivel fueron más resistentes al daño causado por los gusanos de las raíces del maíz que las semillas transgénicas sin dicho tratamiento de pesticida. Además, todos los tratamientos combinados (de evento transgénico además del tratamiento de pesticida) fueron más eficaces que el tratamiento convencional en capas superficiales bien con FORCE® o con LORSBAN®.

Por lo tanto, se puede concluir que el tratamiento de una semilla de maíz que tiene un evento transgénico bien con imidacloprida o bien con teflutrina proporciona una resistencia mejorada con respecto a la proporcionada bien por el evento transgénico por sí solo, o la semilla isohíbrida que también ha recibido un tratamiento estándar de pesticida de capas superficiales en el momento de la plantación.

### Ejemplo 3

Pruebas de campo para la determinación de la eficacia del evento transgénico Cry3Bb.11231 en semillas de maíz en combinación con los tratamientos de imidacloprida para semillas contra los gusanos de las raíces del maíz occidentales y septentrionales.

## ES 2 325 482 T3

Se llevó a cabo una prueba de campo conforme a los protocolos pertinentes y en conformidad con los requerimientos de notificación del USDA. El propósito de la prueba era determinar la eficacia del evento transgénico Cry3Bb.11231 en semillas de maíz en combinación con tratamientos contra los gusanos de las raíces del maíz para semillas utilizando imidacloprida.

5

Para cada ubicación de cultivo seleccionada, el diseño del terreno incluía lo siguiente:

Separación entre hileras:	7,62 × 10 <sup>-1</sup> metros
Tamaño del terreno:	4 hileras × 20
Densidad de plantas:	6,56 semillas/m
Híbrido utilizado:	LH198 × LH185 o RX670
Réplicas:	4
Diseño:	Bloque completo aleatorizado
Ubicaciones:	4
Fuente de larvas:	infestaciones naturales suplementadas mediante infestación artificial de huevos de gusanos de las raíces del maíz con 1312 huevos/m (etapa de crecimiento V2)

25

30

Se utilizaron las siguientes combinaciones de tratamiento para semillas para cada área de cultivo:

35

Nº	Tipo de semilla de maíz	Pesticida y cantidad (gramos de IA/100 kg de semilla o mg de ia/grano)
1	Isohíbrido	Ninguno, aparte de niveles bajos para la protección contra elatéridos
2	Cry3Bb.11231	Ninguno, aparte de niveles bajos para la protección contra elatéridos
3	Cry3Bb.11231	Gaucho® 600 FS con 300 g de IA/100 kg o 0,75 mg de IA/grano
4	Cry3Bb.11231	Gaucho® 600 FS con 400 g de IA/100 kg o 1,0 mg de IA/grano
5	Cry3Bb.11231	Raze® 2.5 FS con 300 g de IA/100 kg o 0,75 mg de IA/grano
6	Isohíbrido	Force® 3G con 0,014 g de IA/m, aplicado como una capa de 1,27 × 10 <sup>-1</sup> m en la superficie de la tierra en el momento de la plantación.
7	Isohíbrido	Lorsban® 15G (clorpirifos; disponible en DowElanco) con 0,11 g de IA/m, aplicado como una capa de 1,27 × 10 <sup>-1</sup> m en la superficie de la tierra en el momento de la plantación.

65

## ES 2 325 482 T3

Se llevaron a cabo todos los tratamientos de las semillas como se describe en el Ejemplo 1. En el tratamiento de semillas número 1 y 2, se utilizó Gaucho® para una protección contra elatéridos, pero a niveles lo suficientemente bajos para que no se espere que haya ningún efecto sobre los gusanos de las raíces del maíz (es decir, a un nivel de tratamiento de aproximadamente 60 g de activo/100 kg de semilla o 0,16 mg de activo/grano), de lo contrario, la semilla que recibió el tratamiento número 2 únicamente tenía un evento transgénico Cry3Bb.11231 y ningún tratamiento de pesticida que podría esperarse que fuera efectivo contra los gusanos de las raíces del maíz.

Para las semillas que tenían tratamientos numerados 3 a 5, se aplicaron los pesticidas por medio de los procedimientos descritos en el Ejemplo 1. Para las semillas que tenían tratamientos numerados 6 y 7, se aplicó Force® 3G y Lorsban® 15G disponibles comercialmente a la tierra en una capa de  $1,27 \times 10^{-1}$  m en el momento de la siembra. Se muestran los niveles de aplicación y están en los intervalos recomendados para una práctica estándar comercial.

Las semillas de maíz que iban a ser probadas fueron plantadas y cultivadas en cuatro ubicaciones distintas en cuatro estados del medio oeste en el cinturón del maíz de los Estados Unidos conforme al protocolo descrito anteriormente.

La determinación del daño causado por los gusanos de las raíces del maíz se llevó a cabo conforme al protocolo descrito en el Ejemplo 2.

TABLA 2(A)

*Daño causado por gusanos de las raíces del maíz a plantas isohíbridas de maíz y a plantas de maíz que tienen eventos transgénicos Cry3Bb.11231 solos y en combinación con el tratamiento de semillas con pesticida de imidacloprida en distintas ubicaciones de cultivo*

TRATAMIENTO	DAÑO CAUSADO POR GUSANOS DE LAS RAÍCES DEL MAÍZ EN CADA CLASE IOWA						TOTAL GLOBAL	PORCENTAJE DEL CONTROL
	(ESCALA DE IOWA 1 – 6)							
	1	2	3	4	5	6		
Isohíbrido	0	3	16	36	21	4	80	100
Cry3Bb.11231	5	51	23	1	0	0	80	31,2
Imidacloprida con 400 g/100 kg de semilla	3	15	36	21	5	0	80	80,5
CryBb.11231 con imidacloprida con 400 g/100 kg de semilla	13	53	14	0	0	0	80	18,2
Capa superficial con FORCE® 3G al plantar	3	58	34	3	0	0	98	39,2
Capa superficial con LORSBAN® 15G al plantar	6	39	38	16	1	0	100	57,1

Notas: a. Los datos para el control isohíbrido fueron tomados como los mismos según se determinaron para un protocolo relacionado que fue llevado a cabo en un terreno colindante.

Los datos mostraron que tanto el evento transgénico por sí solo como el tratamiento de semillas únicamente con imidacloprida proporcionó algo de nivel de protección contra el daño causado por los gusanos de las raíces del maíz por encima del control isohíbrido sin tratar. A mayores niveles de daño (es decir, niveles de daño 4 - 6), el maíz que tenía el evento transgénico sufrió 4,7% del daño que el del control no transgénico. Dado que el 4,7% podría ser considerado ser aproximadamente el 5%, se consideró que el evento Cry3Bb.11231 estaba en un intervalo preferido de efectividad de aproximadamente el 5% hasta aproximadamente el 50% del daño del control no transgénico.

## ES 2 325 482 T3

El tratamiento de las semillas con imidacloprida únicamente con 400 g/100 kg fue efectivo contra el daño causado por los gusanos de las raíces del maíz, pero la efectividad de la imidacloprida fue menor que la efectividad del evento transgénico por sí solo. La combinación del tratamiento con imidacloprida de la semilla transgénica fue más efectivo contra el daño causado por los gusanos de las raíces que el tratamiento de pesticida por sí solo o que el evento transgénico por sí solo. Además, la combinación de Cry3Bb.11231 con imidacloprida con 400 g/100 kg de semilla proporcionó una mejor protección que el tratamiento comercial estándar bien de FORCE® o bien de LORSBAN® aplicado como una capa superficial en el momento de la plantación.

Las ventajas del presente tratamiento de la semilla transgénica con imidacloprida incluyen la simplificación de la plantación, al eliminar el requerimiento de una aplicación separada del pesticida. Además, la plantación es más fácil y segura, dado que el plantador no tiene que manipular un pesticida concentrado.

La combinación del tratamiento de semilla con imidacloprida con las semillas de maíz que tienen un evento transgénico Cry3Bb.11231 fue probada para una sinergia posible a un nivel de daño causado por los gusanos de las raíces de 3 - 6. En la primera prueba, mostrada en la Tabla 2(A), se determinó el porcentaje de las plantas probadas que tenían niveles de daño de 3 a 6, en la escala de Iowa de 1 - 6, para el control y para las semillas tratadas con el pesticida en dos niveles, y para las semillas que tenían el evento transgénico, solo en combinación. Entonces, se utilizó la siguiente fórmula para calcular un "umbral de sinergia":

$$(\% \text{ de Cry3Bb.11231 de control}) * (\% \text{ de tratamiento con imidacloprida de control})/100.$$

Se comparó este umbral con el porcentaje de control para la combinación del tratamiento (es decir, Cry3Bb.11231 con imidacloprida con 400 g/100 kg). Si el porcentaje de la combinación del tratamiento era inferior al umbral, entonces se concluía que había sinergia. Si el porcentaje de la combinación del tratamiento era superior al umbral, entonces se concluía que no se demostraba la sinergia para esa combinación.

Se creyó que la medición del daño causado por los gusanos de las raíces a niveles de daño elevados (es decir, niveles 3 - 6) es un indicador útil que correlatos con una pérdida de producción subsiguiente debido a dicho daño. La razón para esto es que el daño causado por los gusanos de las raíces a niveles 1 y 2 rara vez causa que las plantas de maíz se caigan y se implanten, y no se cree que tal pérdida mínima de raíz reduzca el número ni el peso de granos por espiga. Sin embargo, el daño a las raíces a niveles de 3 y superiores causa cada vez más implantación y pérdida de producción. Por lo tanto, se cree que el daño total de los niveles 3 - 6 (y en algunos casos, 4 - 6 y 5 y 6), proporciona una indicación útil del efecto del daño causado por los gusanos de las raíces del maíz sobre la producción subsiguiente de maíz.

TABLA 2(B)

*Eficacia del tratamiento de semillas únicamente con imidacloprida y en combinación con un evento transgénico Cry3Bb.11231 del maíz contra el daño causado por gusanos de las raíces del maíz a niveles 3-6 en la escala de Iowa 1-6*

TRATAMIENTO	NÚMERO DE PLANTAS QUE TIENEN UN NIVEL DE DAÑO 3 - 6	PORCENTAJE DEL CONTROL	UMBRAL DE SINERGIA
Control sin tratar	96,1	100	-
Cry3Bb.11231	40	31,2	-
Imidacloprida con 400 g/100 kg	71,7	80,5	-
Cry3Bb.11231 con imidacloprida con 400 g/100 kg	24	18,2	25,1
FORCE 3G como capa superficial	40,7	39,2	-
LORSBAN 15G como capa superficial	60,8	57,1	-

## ES 2 325 482 T3

Este análisis indicó que la combinación del evento transgénico CryBb.11231 del maíz con el tratamiento de la semilla con imidacloprida con 400 g/100 kg fue sinérgica y eficaz de forma imprevista contra el daño causado por los gusanos de las raíces del maíz a un nivel 3 - 6. En consecuencia, se concluyó que la combinación del evento transgénico con el tratamiento de las semillas con imidacloprida proporcionó ventajas significativas con respecto al uso de cualquiera de los procedimientos por sí solos, y que dicha protección fue superior de forma imprevista en términos de eficacia contra el daño severo causado por los gusanos de las raíces del maíz.

También se creyó que era digno de mención que la combinación de imidacloprida y del evento proporcionó una protección contra un daño severo causado por los gusanos de las raíces del maíz a niveles que eran mucho mejores que los proporcionados por ya sea por FORCE® o por LORSBAN® aplicados en capas superficiales.

### Ejemplo 4

Pruebas de campo para la determinación de la eficacia del evento transgénico Cry3Bb.11231 en semillas de maíz en combinación con tratamientos de semilla con pesticida de teflutrina contra gusanos de las raíces del maíz occidentales y septentrionales.

Se podría llevar a cabo una prueba de campo para la determinación de la eficacia de la combinación del evento transgénico Cry3Bb.11231 en semillas de maíz con teflutrina (disponible como RAZE® en Wilbur-Ellis Company) conforme al mismo protocolo que se describe en el Ejemplo 3, salvo que se sustituiría teflutrina por imidacloprida en cada caso en el que se utilizase a niveles que se esperaba que fuesen efectivos contra los gusanos de las raíces del maíz (por ejemplo, a niveles de más de 60 g/100 kg de semilla). Si se desea, sería permisible continuar el uso de imidacloprida a niveles de 60 g/100 kg, o menos, para la protección contra elatéridos.

Sería de esperar que la combinación del tratamiento de semillas con teflutrina junto con un evento transgénico en semillas de maíz que tienen efectividad contra los gusanos de las raíces del maíz proporcionaría una protección sinérgica similar a la mostrada en el Ejemplo 3 para la combinación de imidacloprida y Cry3Bb.11231.

Se pretende que la presentación de las referencias en el presente documento sea simplemente para resumir las afirmaciones hechas por sus autores y no se admite que ninguna referencia constituya una técnica anterior. Los solicitantes se reservan el derecho a impugnar la exactitud y la pertinencia de las referencias citadas.

En vista de lo anterior, se podrá observar que se logran las diversas ventajas de la invención y se consiguen otros resultados ventajosos.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento para proteger una planta transgénica de maíz contra el daño causado por la alimentación de un insecto, comprendiendo el procedimiento
- 10 proporcionar una semilla para la planta transgénica de maíz, semilla que comprende un gen que codifica una proteína insecticida Cry3;
- 10 y
- 10 tratar la semilla con insecticida de imidacloprida o de teflutrina en una cantidad desde 200 gramos hasta 500 gramos de ingrediente activo por 100 kilogramos de semilla.
- 15 2. El procedimiento conforme a la reivindicación 1, en el que la proteína insecticida es una proteína Cry3\*.
3. El procedimiento conforme a la reivindicación 2, en el que la proteína Cry3\* es una proteína Cry3B\*.
- 20 4. El procedimiento conforme a la reivindicación 4, en el que la proteína Cry3B\* está seleccionada del grupo constituido por Cry3Bb.11231 y Cry3Bb.11098.
- 25 5. El procedimiento conforme a la reivindicación 1, en el que la semilla que tiene la capacidad para expresar una proteína Cry 3 también tiene la capacidad para expresar al menos otra proteína insecticida que es distinta de una proteína Cry 3.
- 25 6. El procedimiento conforme a la reivindicación 1, en el que la semilla que tiene la capacidad para expresar una proteína insecticida Cry 3 también tiene un evento transgénico que proporciona tolerancia a los herbicidas.
- 30 7. El procedimiento conforme a la reivindicación 6, en el que el evento transgénico que proporciona una tolerancia a los herbicidas proporciona tolerancia contra el glifosato.
- 35 8. Una semilla de una planta transgénica de maíz que ha sido tratada por medio del procedimiento de la reivindicación 1 que proporciona una resistencia mejorada a la planta resultante de maíz contra el daño causado por la alimentación de un insecto, en la que la semilla contiene un gen que codifica una proteína insecticida Cry3 y en la que la semilla ha sido tratada con insecticida de imidacloprida o teflutrina en una cantidad desde 200 gramos hasta 500 gramos de ingrediente activo por 100 kilogramos de semilla.
- 40 9. La semilla de la reivindicación 22, en la que el evento transgénico es una proteína Cry3Bb.11231 o Cry3Bb.11098 derivada de *Bacillus thuringiensis*.

40

45

50

55

60

65