

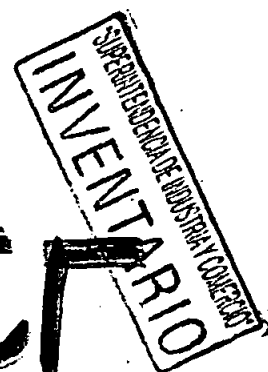
BT



08-19691



Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones



SOLICITUD DE

PCT

**PATENTE DE INVENCION
PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL**

08-19691

21. EXPEDIENTE No.

54. TITULO: COMPOSICIONES INSECTICIDAS Y METODOS PARA
CREAR PLANTAS TRANSGENICAS RESISTENTES A
INSECTOS

52. CLASIFICACION INTERNACIONAL: C12N 15/31, A01H 5/00,
C07K 14/32

71. SOLICITANTE: MONSANTO TECHNOLOGY, LLC

DOMICILIO: 800 North Lindberg Boulevard, St. Louis,
Missouri 63167, ESTADOS UNIDOS DE
AMERICA

74. APODERADO: Dra. MARGARITA CASTELLANOS A.

26 FEB. 2008

22. BOGOTA, D.C.,



No. 08-019691- -00000-0000

Fecha: 2008-02-26 14:49:19 Dep. 2020 NUECREACIONI
Tra. 11 PATENTEIYII Eve. 379 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 279

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

31 Mayo 2008

SOLICITUD DE PATENTE EN COLOMBIA

①

☒ Patente de Invención.☐ Patente de Modelo de Utilidad.☐ Capítulo I.☒ Capítulo II.

②

SOLICITANTE (71)Nombre: **MONSANTO TECHNOLOGY, LLC**Dirección: **800 North Lindbergh Boulevard,
St. Louis, Missouri 63167,
ESTADOS UNIDOS DE AMERICA**Domicilio: **St. Louis, Missouri,
ESTADOS UNIDOS DE AMERICA**Lugar de Constitución: **ESTADOS UNIDOS
DE AMERICA**

Teléfono:

Fax:

E-mail:

IDENTIFICACIÓN

C.C.



NIT



C.E.



Otro



Cual

Número

③

**REPRESENTANTE
O APODERADO (74)**Nombre: **MARGARITA CASTELLANOS A.**Dirección: **CALLE 94A No. 7A-09**Teléfono: **610 7420** Fax: **610 0706**E-mail: **info@castellanosyco.com****IDENTIFICACIÓN**

C.C.



NIT



C.E.



Otro



Cual

Número

39'779.654 TPA 70,819**INVENTOR (ES) (72)****VER ANEXO # 1**

⑤

PCT (86)

Solicitud Internacional No.

PCT/US2006/033867

Fecha

30/08/2006

Publicación Internacional No.

WO 2007/027776 A2

Fecha

08/03/2007

⑥

Título (54)**COMPOSICIONES INSECTICIDAS Y METODOS PARA CREAR PLANTAS
TRANSGENICAS RESISTENTES A INSECTOS**

⑦

Clasificación Internacional (51)**C12N 15/31, A01H 5/00, C07K 14/32**

⑧

Prioridad

(33) País de Origen

(32) Fecha

(31) Número de Solicitud

SI ☒NO ☐**US****31/08/2005****60/713,111**

⑨

Comprobante de pago No.**08-16,151****Fecha****Febrero 25 de 2008**

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.

Anexos

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Poderes, si fuere el caso, junto con la sustitución del mismo a mi favor
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones.
- ☒ Copia de la solicitud internacional (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- ☐ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☐ Arte final 12x12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☒ Otros **Tarjeta Propietario y Extracto para la Publicación**

11 FIGURA CARACTERISTICA:



12 Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO
FIRMA: *Margarita Castellanos*
C.O. No. 39'779.654 Usaquén - TPA 70.819 C.S.J.

CASTELLANOS & CO LTDA
ABOGADOS
Calle 94 A No. 7 A-09
Bogotá, D.C. - COLOMBIA

ANEXO # 1

INVENTOR(ES) (72)

- 1 HEATHER M. ANDERSON**
MONSANTO TECHNOLOGY LLC,
800 North Lindbergh Boulevard, St. Louis, MO 63167,
ESTADOS UNIDOS DE AMERICA
- 2 JAMES A. BAUM**
MONSANTO TECHNOLOGY LLC,
800 North Lindbergh Boulevard, St. Louis, MO 63167,
ESTADOS UNIDOS DE AMERICA
- 3 CATHERINE A. CHAY**
MONSANTO TECHNOLOGY LLC,
800 North Lindbergh Boulevard, St. Louis, MO 63167,
ESTADOS UNIDOS DE AMERICA
- 4 JAMES K. ROBERTS**
MONSANTO TECHNOLOGY LLC,
800 North Lindbergh Boulevard, St. Louis, MO 63167,
ESTADOS UNIDOS DE AMERICA
- 5 BEI ZHANG**
MONSANTO TECHNOLOGY LLC,
800 North Lindbergh Boulevard, St. Louis, MO 63167,
ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

11

11

11

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-019691- -00000-0000

Fecha: 2008-02-26 14:49:19 Dep. 2020 NUECREACIONI
 Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALI
 Act. 411 PRESENTACION Folios: 279

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 08 - 16,151
 FECHA : FEBRERO 25 DE 2008

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
ALVARO CASTELLANOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	280384	25/02/2008	1,653,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
		1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	501,000.00
		TOTAL :	\$ 501,000.00

SON: QUINIENTOS UN MIL PESOS

RESPONSABLE :

.....

.....

5

CASTELLANOS & CO LTDA
ABOGADOS
Calle 94 A No. 7 A-09
Bogotá, D.C. - COLOMBIA

Señor

Jefe de la División de Nuevas Creaciones

Superintendencia de Industria y Comercio

Ministerio de Comercio, Desarrollo, Industria y Turismo

E.

S.

D.

Ref.: **PODER** conferido por **MONSANTO TECHNOLOGY LLC**

Yo, **XIMENA CASTELLANOS ABONDANO**, mayor de edad, identificada y domiciliada como aparece al pie de mi firma, atentamente manifiesto a Uds. que sustituyo en la Dra. **MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO**, el poder que me confirió **MONSANTO TECHNOLOGY LLC**, con domicilio en **800 North Lindberg Boulevard, St. Louis, Missouri 63167, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA**, debidamente legalizado por Apostilla bajo el No. **142500**, el día **21 de Diciembre de 2005**, con las mismas facultades que me fueron conferidas, para tramitar la solicitud de patente PCT Entrada en Fase Nacional, para: **"COMPOSICIONES INSECTICIDAS Y METODOS PARA CREAR PLANTAS TRANSGENICAS RESISTENTES A INSECTOS".-**

Del Señor Jefe,

Acépto


Ximena Castellanos Abondano
C.C. No. **39.773.330** de Usaquén
T.P.A. No. **58.236** del C.S.J.
Calle 94 A No. 7 A-09 - Bogotá
PBX: 610 74 20


Margarita Castellanos Abondano
C.C. No. **39.779.654** de Usaquén
T.P.A. No. **70.819** del C.S.J.
Calle 94 A No. 7 A-09 - Bogotá
PBX: 610 74 20

Bogotá, D.C.
XCA/MCA/j1582

**AUTENTICACION DE FIRMA
MEDIANTE COMPARECENCIA PERSONAL**
(Art. 84 C.R.C. mod. Decr. 2282 de 1989, art. 1 mod. 36)
Ante el Notario Cuarenta y Uno (41) del círculo
de esta ciudad compareció personalmente:
Margarita Castellanos N
identificado con C.C. **39.739.654**
expedida en: **Usaquén** y tarjeta profesio-
nal de abogado(a) No. **30819** del Consejo
Superior de la Judicatura, con documento di-
fido a **SIC**
y declaró que la firma puesta en este escrito es
suya.

Margarita Castellanos
Firma del declarante

En Bogotá D.C. a **5 FEB. 2008**
AUTORIZO ESTA DILIGENCIA EL SUSCRITO NOTARIO

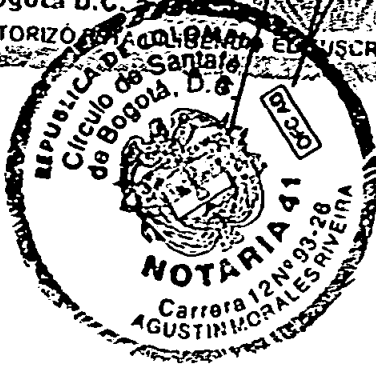


25 FEB. 2008

**AUTENTICACION DE FIRMA
MEDIANTE COMPARECENCIA PERSONAL**
(Art. 84 C.R.C. mod. Decr. 2282 de 1989, art. 1 mod. 36)
Ante el Notario Cuarenta y Uno (41) del círculo
de esta ciudad compareció personalmente:
Almendra Castellanos N
identificado con C.C. **39.733.330**
expedida en: **Usaquén** y tarjeta profesio-
nal de abogado(a) No. **58.236** del Consejo
Superior de la Judicatura, con documento di-
fido a **SIC**
y declaró que la firma puesta en este escrito es
suya.

Almendra Castellanos
Firma del declarante

En Bogotá D.C. a **5 FEB. 2008**
AUTORIZO ESTA DILIGENCIA EL SUSCRITO NOTARIO



25 FEB. 2008

PODEREl (los) **MONSANTO TECHNOLOGY LLC**Domiciliados en **800 North Lindbergh Boulevard, St. Louis, Missouri 63167, EEUU**

Nombran por el presente a **XIMENA CASTELLANOS A. y/o MARGARITA CASTELLANOS A.** abogadas con oficinas en la Calle 94 A No. 7 A-09, Bogotá-Colombia para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad Industrial y con este fin autorizamos a dichos apoderados para que nos representen ante cualesquiera autoridades o personas de los órdenes administrativo, contencioso-administrativo y judicial en todo lo relacionado con los siguientes actos y gestiones:

- Obtención de patentes de invención, modelos y dibujos industriales; registro de marcas de fábrica, de servicio, colectivas o defensivas y de denominaciones de origen, depósito de nombres y enseñas comerciales; su renovación, prórroga, inscripción de traspaso y cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria y el registro de licencias de uso de esos derechos;
- Para la obtención de registros sanitarios;
- Acciones de oposición, observación, cancelación, nulidad, medidas cautelares y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso-administrativos que promovamos o se nos promuevan.

Pudiendo en todos los actos y gestiones arriba mencionados sustituir éste mandato, transigir, desistir, recibir, cancelar, renunciar, aceptar notificaciones y nombrar apoderados judiciales y extrajudiciales.

Finalmente, este poder ratifica la validez de todos los actos y solicitudes que, a nombre de la poderdante hubieren realizado los apoderados en relación con las facultades anteriormente enumeradas, antes de la suscripción del presente poder

Dado y firmado hoy **19 de Diciembre de 2005**en **St. Louis, Missouri, USA**por **MONSANTO TECHNOLOGY LLC**

(El notario debe suscribir el documento en la pagina siguiente)

(Se requiere legalización consular o mediante apostilla)

POWER OF ATTORNEYI (we) the undersigned **MONSANTO TECHNOLOGY LLC**Of **800 North Lindbergh Boulevard, St. Louis, Missouri 63167, EEUU**

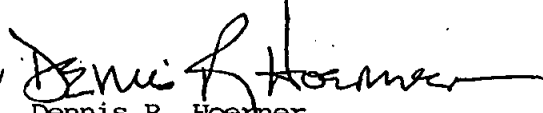
hereby grant(s) Power of Attorney to **XIMENA CASTELLANOS A. and /or MARGARITA CASTELLANOS A.** attorneys residing at Calle 94 A No. 7 A-09, Bogotá-Colombia, to obtain the protection of my (our) Industrial Property, for which purpose we authorize the said attorneys to represent us before any authorities, or persons, specially those, administrative, contentious and judicial, in all matters concerning the following:

- Obtainment of patents, models and designs, registration of trademarks, service, collective and defensive marks, and of designations of origin; the deposit of trade names and ensigns; its renewal, extension, recordal of assignments, change of name or domicile, voluntary cancellation, and the registration of licenses of use of the above rights;
- For the obtainment of Sanitary registrations;
- Actions of opposition, cancellation, nullity, infringement, granting of licenses; and in general the civil, criminal and administrative suits related to those rights; actions and suits instituted by us or against us;

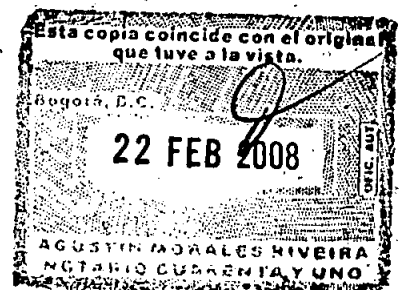
In all the above matters they may substitute this power of attorney, compromise, desist, cancel, receive, renounce, accept notifications and appoint attorneys in fact, in or out of court.

Finally, this power of attorney ratifies the validity of all acts and applications made by the representatives in the name of the signatory of this power of attorney, with regard to the faculties above given, before the execution of the present power of attorney.

Given and signed this **19th December, 2005**in **St. Louis, Missouri**

by 
Dennis R. Hoerner
 (Notary shall execute on the next page)

(Consular legalization or apostille is required)



7

COLOMBIA

Hoy 19 de Dic. del año 2005
compareció (eron) personalmente
DENNIS R. HOERNER

a quienes conozco como la(s) personas que firma(n) en
representación de la Sociedad (Compañía) denominada
MONSANTO TECHNOLOGY LLC

Certifico :

a) Que MONSANTO TECHNOLOGY LLC

es una sociedad/Compañía legalmente constituida y
existente de acuerdo con las leyes de

b) Que el domicilio de dicha Sociedad/Compañía es
St. Louis, Missouri

c) Que el objeto u objetos para los cuales se otorga el
presente poder están comprendidos dentro del objeto
social de la mencionada Sociedad /Compañía.

d) Que el Sr. DENNIS R. HOERNER
esta autorizado para otorgar el presente poder. Lo anterior
esta probado por medio de los siguientes documentos, que
certifico he visto*

(Ciudad) St. Louis

(Estado) Missouri

Hoy 19 del Diciembre de 2005

(Notario Público)

*Los documentos debe identificarse con fecha y origen.

On this 19 day of Dec. of 2005
personally appeared

Dennis R. Hoerner

whom I know to be the person(s) who signed this document as
representative(s) of the Corporation /Company named
Monsanto Technology LLC

I certify:

a) That

Monsanto Technology LLC

is a corporation (Company legally constituted and in
existence in accordance with the laws of

b) That the domicile of said Corporation/Company is
St. Louis, Missouri

c) That the purpose or purposes for which the present
Power of Attorney is granted are comprised within the
object set forth in the charter of the mentioned
Corporation/Company.

d) That Mr. Dennis R. Hoerner
is (are) authorized to grant the present Power of Attorney. The
aforementioned was duly proven through the following
documents and I duly certify having seen them*:

(City) St. Louis

(State) Missouri

this 19 day of Dec of the year 2005

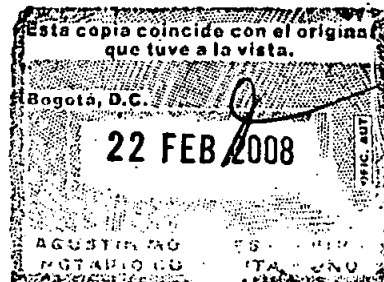
(Notary Public)

Michelle Ludwig

*Documents must be identified with date and origin



MICHELLE LUDWIG
My Commission Expires
July 13, 2009
St. Louis County
Commission #05550747



6027-FNPG

Apostille

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: United States of America

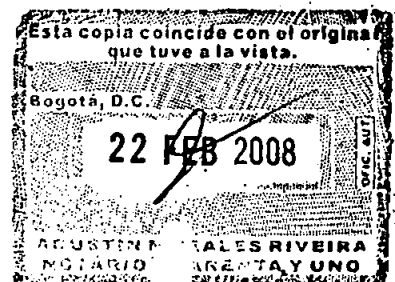
This public document
2. has been signed by MICHELLE LUDWIG
3. acting in the capacity of NOTARY PUBLIC
4. bears the seal/stamp of MICHELLE LUDWIG-NOTARY PUBLIC-STATE OF MISSOURI

Certified

5. at Jefferson City, Missouri
6. the 21ST day of DECEMBER, 2005
7. by Robin Carnahan, Secretary of State, State of Missouri
8. No. 142500
9. Seal/Stamp
10. Signature:

Robin Carnahan

Comm. 48 (01-2005)



-----TRADUCCION OFICIAL No. 06-02-04-----

de un documento escrito en INGLES, el cual para su identificación lleva el sello de la Traductora e Intérprete Oficial, Res. 2755/68 y 01144/97 de Minjusticia, al igual que la presente.-----

(Adjunto a un documento de Poder otorgado por MONSANTO TECHNOLOGY LLC)

• Sello Notarial:

MICHELLE LUDWIG

Mi comisión vence Julio 13, 2009

Condado de St. Louis – Comisión #05550747

APOSTILLA

(Convención de La Haya de octubre 5, 1961)

1. País: Estados Unidos de América

Este documento público

2. ha sido firmado por Michelle Ludwig

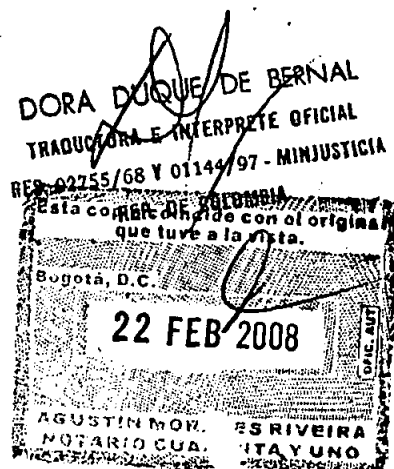
3. actuando en su carácter de Notario Público

4. Lleva el sello de Michelle Ludwig – Notario Público – Estado de Missouri

CERTIFICADO

5. En Jefferson City, Missouri

6. El día 21 de Diciembre de 2005



7. por Robin Carnahan, Secretario de Estado, Estado de Missouri

8. No. 142500

9. Sello (en dorado)

10. Firma:

(fdo) Robin Carnahan

ES TRADUCCION FIEL Y COMPLETA, a la cual me remito,

Bogotá, D. C., Febrero 9, 2006.

[Handwritten signature]

DORA DUQUE DE BERNAL
TRADUCTORA E INTERPRETE OFICIAL
RES. 02755/68 Y 01144/97 - MINJUSTICIA
REP. DE COLOMBIA

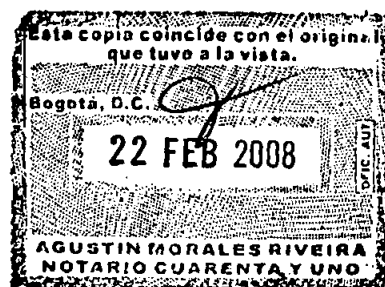
NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2006 FEB 13 A 11:55

JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

613662
Dora Duque
CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPEÑA
LAS FUNCIONES INDICADAS



(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
8 March 2007 (08.03.2007)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2007/027776 A2

(51) International Patent Classification:

C12N 15/31 (2006.01) A01N 63/02 (2006.01)
C12N 15/32 (2006.01) C07K 14/32 (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01) C07K 14/325 (2006.01)
A01H 5/00 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/US2006/033867

(22) International Filing Date: 30 August 2006 (30.08.2006)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:

60/713,111 31 August 2005 (31.08.2005) US

(71) Applicant (for all designated States except US): MONSANTO TECHNOLOGY LLC [US/US]; 800 North Lindbergh Boulevard, St. Louis, MO 63167 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): ANDERSON, Heather, M. [CA/US]; MONSANTO TECHNOLOGY LLC, 800 North Lindbergh Boulevard, St. Louis, MO 63167 (US). BAUM, James, A. [US/US]; MONSANTO TECHNOLOGY LLC, 800 North Lindbergh Boulevard, St. Louis, MO 63167 (US). CHAY, Catherine, A. [US/US]; MONSANTO TECHNOLOGY LLC, 800 North Lindbergh Boulevard, St. Louis, MO 63167 (US). ROBERTS, James, K. [US/US]; MONSANTO TECHNOLOGY LLC, 800 North Lindbergh Boulevard, St.

Louis, MO 63167 (US). ZHANG, Bei [CN/US]; MONSANTO TECHNOLOGY LLC, 800 North Lindbergh Boulevard, St. Louis, MO 63167 (US).

(74) Agent: BALL, Timothy, K.; ATTN: GAIL P. WUELLNER, MONSANTO TECHNOLOGY LLC, 800 North Lindbergh Boulevard, St. Louis, MO 63167 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— without international search report and to be republished upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: INSECTICIDAL COMPOSITIONS AND METHODS FOR MAKING INSECT-RESISTANT TRANSGENIC PLANTS

(57) Abstract: The present invention provides isolated polynucleotide sequences encoding ET37, TIC810 and TIC812 proteins from *Bacillus thuringiensis*, and nucleotide sequences for use in expressing TIC809, ET37, TIC810 and TIC812, and fusions of various insecticidally effective combinations of these proteins such as TIC 127, in plants. Methods of making and using the polynucleotide sequences and the proteins in the development of transgenic plant cells and transgenic plants exhibiting improved insect resistance against (1) Coleopteran insects including Western Corn Rootworm (*Dibrotica virgifera*), Southern Corn Rootworm (*Dibrotica undecimpunctata*), Northern Corn Rootworm (*Diabrotica barbed*), Mexican Corn Rootworm (*Diabrotica virgifera zea*), Brazilian Corn Rootworm (*Diabrotica balteata*) and Brazilian Corn Rootworm complex (*Diabrotica viridula* and *Diabrotica speciosa*), and against Hemipteran insects such as Lygus bugs, are disclosed.

WO 2007/027776 A2

In the US Patent and Trademark Office

Application for Patent for

**INSECTICIDAL COMPOSITIONS AND METHODS FOR MAKING INSECT-
RESISTANT TRANSGENIC PLANTS**

Heather M. Anderson

James A. Baum

Catherine A. Chay

James K. Roberts

Bei Zhang

BACKGROUND OF THE INVENTION

The present invention relates generally to the field of plant molecular biology, and more particularly to novel polynucleotide sequences and proteins encoded from such sequences derived from *Bacillus thuringiensis* and that encode ET29, TIC809, ET37, TIC810 and TIC812 proteins that exhibit toxicity to coleopteran species and to insects within the super-order referred to as Hemiptera. Coleopteran toxic proteins include ET29, TIC809 (an amino acid sequence variant of ET29), and ET37 (a homologue of ET29). TIC810 and TIC812 and nucleotide sequences encoding these proteins are also provided herein. When TIC810 or TIC812 are combined together with ET29, TIC809 or ET37, insecticidal compositions are provided that exhibit surprisingly greater potency against coleopteran species as compared to the presentation of only ET29, TIC809, or ET37 alone, and the combination of the two (TIC810 with either ET29, TIC809, or ET37, or TIC812 with either ET29, TIC809, or ET37) surprisingly provides a Hemiptera toxic composition, particularly when provided in the diet of species such as *Lygus hesperus* (western tarnished plant bug, WTPB). Methods of making and using polynucleotides encoding these and related proteins in the development of transgenic plants and plant cells that are resistant to Coleoptera and Hemiptera insect infestation are also disclosed.

Environmentally-sensitive methods and compositions for controlling or eradicating insect infestation are desirable in many instances because crops of commercial interest are often the targets of insect attack, particularly attack from coleopteran and lepidopteran insect pests. This is particularly true for farmers, nurserymen, growers, and commercial and residential areas which seek to control insect populations using environmentally friendly methods and compositions. Controlling or eradicating Hemiptera infestations of crops is also of commercial importance, and is increasing in importance as biotechnology approaches for coleopteran and Lepidopteran pest control methods become more widely available, particularly because fewer chemical insecticidal applications are utilized, which result in broad spectrum insecticidal activity.

The insecticidal properties of the bacterium *Bacillus thuringiensis* have been long recognized. *B. thuringiensis* is well known for producing proteinaceous parasporal crystals, or δ -endotoxins, that exhibit specific toxicity to a variety of lepidopteran, coleopteran, and dipteran larvae (English et. al., US Patent No. 6,063,597). Compositions comprising *B. thuringiensis* strains that produce insecticidal proteins have been used commercially as

environmentally acceptable insecticides because they exhibit toxicity to specific target insects, and fail to exhibit toxicity to plants, animals and other non-target organisms.

More than 250 different δ -endotoxins have been isolated and characterized. Sequences encoding some of these δ -endotoxins have been used to construct genetically engineered *B. thuringiensis* products in which one or more insecticidal proteins are expressed that exhibit specific insecticidal activity to target pests, and have been approved for agricultural use as topically applied insecticidal compositions. Transgenic plants expressing one or more Bt insecticidal delta endotoxin proteins for use in controlling one or more insects within a specific class, such as Lepidopteran or coleopteran pests, have been approved for commercialization and have been successful. However, there is a risk that populations of target pest insects that feed on these transgenic plants will develop resistance to one or more of the toxins produced by the plants, and so there remains a need for identifying new insecticidal proteins that can be used alone or together with others that manifest their toxic effects through different modes of action. New insecticidal compositions are desirable for producing transgenic plants that express one or more *B. thuringiensis* insecticidal proteins toxic to the same insect species, providing a means for managing resistance and delaying or eliminating the development of resistance of any particular susceptible insect species to any of the one or more insecticidal agents expressed within a transgenic plant.

Most Bt toxins exhibit toxicity to lepidopteran species. Few have been shown to be effective against coleopteran species, and other than cytolytic toxins which exhibit no host range specificity, no Bt toxins have been shown to exhibit insecticidal activity to lepidopteran or coleopteran species and to Hemipteran species of insect pests. Thus there is a need for identifying new coleopteran and/or Hemipteran specific insecticidal compositions, and methods for controlling infestations by members of the Coleoptera and Hemiptera insect families, particularly for Coleoptera, by members of the family Chrysomelidae, more particularly, by the genus *Diabrotica* in the family Chrysomelidae that may include those that are from the genus *Diabrotica* including *Diabrotica virgifera* (western corn rootworm, WCR), *Diabrotica undecimpunctata* (southern corn rootworm, SCR), *Diabrotica barberi* (Northern Corn Rootworm, NCR), *Diabrotica virgifera zea* (Mexican Corn Rootworm, MCR), *Diabrotica balteata* (Brazilian Corn Rootworm, BZR) and Brazilian Corn Rootworm complex (BCR) consisting of *Diabrotica viridula* and *Diabrotica speciosa*, and particularly by members of the super-order Hemiptera, which includes any insect pest within the sub-order Heteroptera, including insects commonly referred to as stink bugs, Lygus bugs

(including *Lygus hesperus*, *Lygus lineolaris*, and *Lygus elisus*), assassin bugs, bed bugs, and flower bugs, and the sub-order Homoptera, including insects commonly known as cicadas, aphids, leafhoppers, scale insects and whiteflies.

5

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention provides polypeptide compositions isolated from *B. thuringiensis* that exhibit insecticidal activity against Coleoptera and Hemiptera insect pests, and provides nucleotide sequences encoding such polypeptides. The present invention provides control of Coleoptera and Hemiptera insect infestation by co-expressing at least two
10 *B. thuringiensis* proteins in plants either as independent proteins or as a fusion protein of the two, resulting in surprisingly high levels of accumulation of the insecticidal proteins for providing effective control of target Coleoptera and Hemiptera insect pests and provides improvements in insect resistance management of Coleoptera and Hemiptera insect infestations. Additionally, a method of increasing the level of *in planta* accumulation of a *B.*
15 *thuringiensis* insecticidal protein or variant thereof is provided that also provides the additional benefit of an absence of abnormal plant morphology for transgenic plants expressing these proteins.

In accomplishing the foregoing, a polynucleotide molecule is provided as set forth in SEQ ID NO:1, isolated from *B. thuringiensis* strain EG5078. The polynucleotide molecule
20 encodes an insecticidal protein as set forth in SEQ ID NO:2, designated herein as ET37, exhibiting coleopteran insect pest inhibitory bioactivity.

A polynucleotide molecule as set forth in SEQ ID NO:3 is also provided that is isolated from *B. thuringiensis* strain EG4096 that encodes a TIC810 amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO:4.

25 Yet another polynucleotide sequence is provided as set forth in SEQ ID NO:5 that encodes a TIC812 amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO:6, which is isolated from *B. thuringiensis* strain EG5078. TIC812 is substantially identical to TIC810.

Specifically contemplated herein is an isolated polynucleotide molecule encoding an insecticidal protein or an insecticidal fragment thereof that exhibits at least from about 70%
30 to about 99% or greater sequence similarity to a polypeptide sequence as set forth in SEQ ID NO:4 and SEQ ID NO:6, or any percentage there between. The insecticidal protein or insecticidal fragment is encoded by an isolated polynucleotide molecule derived from *B. thuringiensis*, and comprises a polynucleotide sequence that exhibits at least about 70%, about 80%, about 90% or about 99% or more sequence identity or any percentage in between,

or that hybridizes under stringent conditions, to a polynucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:3 and SEQ ID NO:5 or the complement thereof.

In still another embodiment, there is provided a polynucleotide molecule for use in achieving improved expression of an insecticidal protein in a plant. The insecticidal protein preferably exhibits biological activity in controlling a Coleopteran or a Hemipteran insect pest or both, but may be active against other than a Coleopteran or Hemipteran insect pest, and may be encoded from a nucleotide sequence engineered for expression in a plant cell, such as is set forth in SEQ ID NO:15 (TIC810) or SEQ ID NO:19 (ET37).

Other polynucleotide sequences are provided for herein, for use in achieving stably transformed plant cells expressing one or more of the proteins of the present invention. Such nucleotide sequences include but are not intended to be limited to SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:43, and SEQ ID NO:46.

Oligonucleotide sequences are provided for use in identifying related nucleotide sequences in other bacteria, and in particular in other *Bacillus* bacterial strains including *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus laterosporus* and *Bacillus entomocidus*.

Insecticidal proteins are provided that are exemplified by the amino acid sequences as set forth at SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:14, and SEQ ID NO:47 (TIC127). In particular embodiments, SEQ ID NO:4 (TIC810) and SEQ ID NO:6 (TIC812) are provided as accessory proteins, chaperones, or proteins that otherwise stabilize and enhance the expression and accumulation of a second protein expressed contemporaneously along with these accessory proteins. TIC809, ET29 and ET37 are all insecticidal proteins that exhibit greater levels of stability and therefore improved levels of accumulation when each are contemporaneously expressed along with a TIC810 or a TIC812 amino acid sequence. These sequences may be expressed together in the same subcellular compartment, i.e., both in the cytoplasm or both targeted for insertion into and accumulation in the chloroplast or plastid of a plant cell, or contemporaneously expressed to accumulate in different subcellular compartments, such as a TIC810 in the cytoplasm and an ET29 or TIC809 targeted for insertion into and accumulation in the plant chloroplast or plastid. In addition, the combination of any one of the TIC809, ET29, or ET37 proteins along with either of the TIC810 or TIC812 proteins results in a composition that is surprisingly stabilized for high level expression and accumulation of both protein components in plant cells and exhibits insecticidal activity directed to controlling plant pests in the orders

Coleoptera and Hemiptera. The combination of proteins may also be expressed as a peptide fusion, for example, such as SEQ ID NO:47.

In a further embodiment, the present invention relates to a biologically pure culture of a *B. thuringiensis* wild type strain selected from the group consisting of EG5078, from which the polynucleotide sequence as set forth in SEQ ID NO:1 encoding the ET37 protein and SEQ ID NO:5 encoding the TIC812 protein are isolated, and EG4096, from which SEQ ID NO:3 encoding the TIC810 protein and SEQ ID NO:7 encoding the ET29 protein are isolated. EG4096 and EG5078 have been deposited with the Northern Regional Research Laboratory of Agricultural Research Service Center Collection (NRRL), USDA, 1815 North University Street, Peoria, IL 61604, pursuant to the Budapest Treaty on the International Recognition of the Deposit of Microorganism for the Purposes of Patent Procedure and have been assigned the accession Numbers NRRL-B-21582 and NRRL-B-30841 respectively. EG4096 was deposited on May 30, 1996 and EG5087 was deposited on May 3, 2005.

The present invention also relates to a recombinant DNA construct for expression in a plant or plant cell comprising a double gene cassette simultaneously expressing a first polynucleotide sequence and a second polynucleotide sequence wherein the first polynucleotide sequence encodes a polypeptide sequence selected from the group consisting of ET29, TIC809, and ET37 or insecticidally active fragments thereof, and wherein the second polynucleotide sequence encodes a polypeptide sequence selected from the group consisting of TIC810, and TIC812, and insecticidally active fragments thereof. The first polynucleotide sequence is selected from the group consisting of SEQ ID NO:13 and SEQ ID NO:17 and the second polynucleotide sequence is selected from the group consisting of SEQ ID NO:15 and SEQ ID NO:19, wherein the second polynucleotide sequence is co-expressed with the first polynucleotide sequence to enhance or improve expression of the first polynucleotide sequence, and to facilitate insecticidal activity directed to controlling Coleopteran and Hemipteran plant pest infestation.

The present invention also relates to a host cell transformed to contain either the expression vector or the recombinant DNA construct of the present invention, disclosed herein. The host cell may be selected from the group consisting of a bacterial cell, a fungal cell, and a plant cell. In one aspect of the embodiment, the host cell is a bacterial cell such as a *B. thuringiensis* cell that is transformed to contain the expression vector of the present invention. In another aspect of the embodiment, the host cell is a transgenic plant cell transformed to contain the recombinant DNA construct of the present invention. The recombinant DNA construct may comprise polynucleotide sequences that encode a

combination of two of the four proteins simultaneously which polypeptide sequences are set forth in SEQ ID NO:14 (TIC809), SEQ ID NO:16 (TIC810), SEQ ID NO:18 (ET37) and SEQ ID NO:20 (TIC812). Preferable combinations of the proteins may include TIC809 and TIC810, TIC809 and TIC812, ET37 and TIC810, and ET37 and TIC812 wherein co-expression of the polynucleotide sequence encoding TIC810 or TIC812 with the polynucleotide sequence encoding TIC809 (or ET29) or ET37 will result (a) in increased accumulation of TIC809 (or ET29) or ET37 protein in the plant cell, (b) in normal cell growth, (c) in a transgenic plant regenerated from the host plant cell, (d) in a normal phenotype, and (e) in increased levels of Coleopteran and Hemipteran insect resistance.

The transgenic plant cell of the present invention may comprise a maize plant cell, a wheat plant cell, a rye plant cell, a barley plant cell, an oat plant cell, a buckwheat plant cell, a sorghum plant cell, a rice plant cell, a sugarcane plant cell, a pigeon pea plant cell, a peanut plant cell, an onion plant cell, a garlic plant cell, a grass plant cell (including bent grass, fescue, brome, Timothy, orchard, Bermuda, zoysia, and the like), an Arabidopsis plant cell, a broccoli plant cell, a sunflower plant cell, a canola plant cell, a pea plant cell, a cowpea plant cell, a bean plant cell, a coffee plant cell, a soybean plant cell, a cotton plant cell, a linseed plant cell, a cauliflower plant cell, an asparagus plant cell, a lettuce plant cell, a cabbage plant cell, a tobacco plant cell, a spice plant cell (including curry, mustard, sage, parsley, pepper, thyme, cilantro, bay, cumin, turmeric, nutmeg, cinnamon, and the like), a sugar beet plant cell, a potato plant cell, a sweet potato plant cell, a carrot plant cell, a turnip plant cell, a celery plant cell, a tomato plant cell, an egg plant cell, a cucumber plant cell, a squash or melon plant cell and the like, a fruit tree plant cell (including apple, apricot, peach, pear, plum, orange, lemon, lime, and the like), a nut tree plant cell (including acorn, hickory, Brazil, pecan, walnut, hazelnut, and the like), a grape plant cell, a berry plant cell (including blackberry, blueberry, strawberry, cranberry, and the like), and flower plant cells.

In another embodiment, the present invention relates to a transgenic plant transformed to contain a recombinant DNA construct, disclosed herein. The transgenic plant may be regenerated from the transgenic plant cell of the present invention, or may be from a transgenic seed that is obtained from the regenerated transgenic plant or its offspring. The transgenic plant is selected from the group consisting of a monocot plant and a dicot plant that may include monocots such as maize, wheat, rye, barley, oats, buckwheat, sorghum, rice, sugarcane, onion, garlic, grass, or dicots such as sunflower, canola, peas, cowpeas, pigeon peas, beans, soybeans, coffee, broccoli, cotton, linseed, cauliflower, Arabidopsis, asparagus, lettuce, tobacco, spice plants (including curry, mustard, sage, parsley, pepper, thyme, cilantro,

bay, cumin, turmeric, nutmeg, cinnamon and the like), sugar beet, potato, sweet potato, carrot, turnip, celery, tomato, egg plant, cucumber, squash or melon, fruit tree plant (including apple, apricot, peach, pear, plum, orange, lemon, lime and the like), berry plants (including blackberry, blueberry, strawberry, cranberry and the like), nut tree plants (including acorn, hickory, Brazil, pecan, walnut, hazelnut, and the like), grape plants, and flower plants.

In another embodiment, the present invention relates to a transgenic seed from the transgenic plant transformed to contain a recombinant DNA construct. The transgenic seed may be from the transgenic plant that is regenerated from the transgenic plant cell of the present invention, or may be from offspring of the regenerated transgenic plant, or from hybrids created as a result of crossing or breeding the transgenic plant with a non-transgenic plant. In one aspect, the transgenic seed may be coated with a seed coating and wherein the seed coating comprises a herbicidal composition, a fungicide seed coating, a bactericide seed coating, an insecticide seed coating, a plant hormone seed coating, a nutrient seed coating, a microbial inoculum seed coating, a color seed coating, an avian repellent seed coating, a rodent repellent seed coating, an insecticidal protein seed coating, a bacterial seed coating containing an insecticidal protein, a single stranded RNA seed coating, a double stranded RNA seed coating, a micro RNA seed coating or a small interfering RNA seed coating. One means for enabling and stabilizing a seed coating comprising such single or dsRNA compositions is to combine such RNA molecules with complementary DNA molecules so that stabilized DNA-RNA molecular hybrids are presented in the seed coating composition, enabling the presentation of the dsRNA or single stranded RNA to a pest feeding on the seed or the microenvironment within the realm of the sprouting seed or micro roots of an emerging sprouting shoot upon germination of the coated seed.

In accordance with one embodiment of the present invention, there is provided a method for generating a plant resistant to Coleopteran and/or Hemipteran insect infestation, comprising the steps of: a) inserting into the genome of a plant cell a first nucleic acid molecule that functions in the plant to encode a first protein selected from the group consisting of SEQ ID NO:14 (TIC809) and SEQ ID NO:18 (ET37), and a second nucleic acid molecule that functions in the plant to encode a second protein selected from the group consisting of SEQ ID NO:16 (TIC810) and SEQ ID NO:20 (TIC812);

b) obtaining the plant cell containing the nucleic acid molecules of step (a); and

c) generating from the plant cell a transgenic plant that expresses both proteins, wherein the transgenic plant exhibits Coleopteran and/or Hemipteran pest resistance compared to a plant lacking said molecules.

In another embodiment, the present invention also provides a method for controlling a
5 Coleopteran and/or Hemipteran insect pest infestation of a plant, comprising providing in the diet of the insect pest a plant, plant tissue or plant cells expressing a TIC809, ET2, or ET37 protein along with a TIC810 or TIC812 protein.

The polynucleotide and polypeptide compositions and methods disclosed herein will find particular benefit when used against Coleopteran and Hemipteran insect pests selected
10 from the group of Coleopteran families consisting of Chrysomelidae, Cucujidae, Scarabaeidae, Trogositidae, Tenebrionidae, Curculionidae, Elateridae and Bruchidae, and from members of the order Hemiptera including specifically the members of the sub-orders Heteroptera and Homoptera. In one aspect of the invention, the Coleopteran insects are those from the family Chrysomelidae. The exemplary Coleopteran insects in the family
15 Chrysomelidae may include those that are from the genus *Diabrotica* including *D. virgifera* (WCR), *D. undecempunctata* (SCR), *D. barberi* (NCR), *D. virgifera zea* (MCR), *D. balteata* (BZR) and Brazilian Corn Rootworm complex (BCR) consisting of *D. viridula* and *D. speciosa*.

A nucleic acid sequence molecule may be constructed to incorporate a third structural
20 gene sequence encoding a third agent (dsRNA or protein) as a means for providing in the same plant an additional agronomic trait exhibiting activity directed to controlling more than one plant pest, such as exhibiting Coleopteran and/or Hemipteran insect control and an additional trait for a Lepidopteran insect resistance, resistance to bacterial, viral, or fungal infestation, nematode resistance, or for providing a supplemental trait such as a herbicide
25 resistance trait, a yield trait, a stress trait, a feed enhancement or trait that results in the enhancement of feed processing, and the like. The method may consist of the steps of inserting into the genome of a plant cell a first nucleic acid molecule encoding a protein that is selected from the group consisting of SEQ ID NO:14 (TIC809) and SEQ ID NO:18 (ET37). The first nucleic acid molecule is linked to a second nucleic acid molecule that
30 encodes a protein selected from the group consisting of SEQ ID NO:16 (TIC810) and SEQ ID NO:20 (TIC812). A third nucleic acid molecule that is introduced into the plant genome encodes an agent that provides for an agronomic trait that is other than that provided for by the first and second nucleic acid molecules, including but not limited to Lepidopteran insect resistance, resistance to bacterial, viral, or fungal infestation, nematode resistance, or for

providing a supplemental trait such as a herbicide resistance trait, a yield trait, a stress trait, a feed enhancement or trait that results in the enhancement of feed processing, and the like.

In addition to providing the proteins of the present invention in a composition for controlling Coleoptera or Hemiptera insect pest infestation, a polynucleotide sequence transcribing a ribonucleotide acid (RNA) molecule that functions, when ingested by an invertebrate pest, to control invertebrate pest infestation by inhibition of a biological function within the pest as a second mode of action or as an insect resistance management feature of the composition is also specifically contemplated. The RNA molecule may comprise a dsRNA molecule, a siRNA molecule, a miRNA molecule, or an ssRNA molecule, and should be specific for inhibiting an essential gene of a target pest such as a pest targeted by the compositions of the present invention.

The compositions and methods disclosed by the present invention provide many advantages over the prior art including those specifically outlined above. These advantages may include: obtaining improved control of susceptible insect pests including not only those that infest plants, obtaining a greater number of commercially viable insect resistant plant lines; achieving season long protection from insect pathogens; and increasing the incidence of morphologically-normal transformed plants.

DESCRIPTION OF THE SEQUENCES

SEQ ID NO:1 is a *B. thuringiensis* polynucleotide sequence encoding an insecticidal ET37 protein.

SEQ ID NO:2 is an ET37 amino acid sequence encoded by the polynucleotide sequence as set forth in SEQ ID NO:1.

SEQ ID NO:3 is a polynucleotide sequence encoding an insecticidal TIC810 protein.

SEQ ID NO:4 is a TIC810 amino acid sequence encoded by the polynucleotide sequence as set forth in SEQ ID NO:3.

SEQ ID NO:5 is a *B. thuringiensis* polynucleotide sequence encoding a TIC812 protein.

SEQ ID NO:6 is a TIC812 amino acid sequence encoded by the polynucleotide sequence as set forth in SEQ ID NO:5.

SEQ ID NO:7 is a *B. thuringiensis* polynucleotide sequence encoding an ET29 protein.

SEQ ID NO:8 is an ET29 amino acid sequence encoded by the polynucleotide sequence as set forth in SEQ ID NO:7.

SEQ ID NO:9 is a *B. thuringiensis* polynucleotide sequence encoding TIC810 from nucleotide position 1 to nucleotide position 657 and encoding ET29 from nucleotide position 716 to 1411.

5 SEQ ID NO:10 is a *B. thuringiensis* polynucleotide sequence encoding TIC812 from nucleotide position 1 to 657 and encoding ET37 from nucleotide position 716 to 1411.

SEQ ID NO:11 is a polynucleotide sequence encoding TIC810 from nucleotide position 1 to nucleotide position 657 and encoding ET37 from nucleotide position 716 to 1411.

10 SEQ ID NO:12 is a polynucleotide sequence encoding TIC812 from nucleotide position 1 to 657 and encoding ET29 from nucleotide position 716 to 1411.

SEQ ID NO: 13 is a polynucleotide sequence constructed for expression in a plant cell that encodes a TIC809 protein.

SEQ ID NO:14 is a TIC809 amino acid sequence encoded by the polynucleotide sequence as set forth in SEQ ID NO:13.

15 SEQ ID NO:15 is a polynucleotide sequence constructed for expression in a plant cell that encodes a TIC810 protein.

SEQ ID NO:16 is a TIC810 amino acid sequence encoded by the polynucleotide sequence as set forth in SEQ ID NO:15.

20 SEQ ID NO:17 represents a polynucleotide sequence constructed for expression in a plant cell that encodes an ET37 protein.

SEQ ID NO:18 is an ET37 amino acid sequence encoded by the polynucleotide sequence as set forth in SEQ ID NO:19.

SEQ ID NO:19 is a polynucleotide sequence constructed for expression in a plant cell that encodes a TIC812 protein.

25 SEQ ID NO:20 is a TIC812 amino acid sequence encoded by the polynucleotide sequence as set forth in SEQ ID NO:17.

SEQ ID NO:21 is a thermal amplification primer for use in amplifying a nucleotide sequence encoding a TIC810 amino acid sequence and is referred to herein as pr370.

30 SEQ ID NO:22 is a thermal amplification primer for use in amplifying a nucleotide sequence encoding a TIC810 amino acid sequence and is referred to herein as pr371.

SEQ ID NO:23 is a thermal amplification primer for use in amplifying a nucleotide sequence encoding a TIC810 amino acid sequence and is referred to herein as pr375.

SEQ ID NO:24 is a thermal amplification primer for use in amplifying a nucleotide sequence encoding a TIC810 amino acid sequence and is referred to herein as pr376.

SEQ ID NO:25 is a thermal amplification primer for use in amplifying a nucleotide sequence encoding a ET29 amino acid sequence and is referred to herein as pr365.

SEQ ID NO:26 is a thermal amplification primer for use in amplifying a nucleotide sequence encoding a ET29 amino acid sequence and is referred to herein as pr372.

5 SEQ ID NO:27 is a thermal amplification primer for use in amplifying a nucleotide sequence encoding a TIC810_ET29 or a TIC812_ET37 operon sequence and is referred to herein as pr421.

10 SEQ ID NO:28 is a synthetic nucleotide sequence present in transformation vector pMON64138 and consisting of a first plant expression cassette encoding a TIC809 protein and a second plant expression cassette encoding a TIC810 protein.

SEQ ID NO:29 is a TIC809 amino acid sequence encoded from the first plant expression cassette as set forth in SEQ ID NO:28.

SEQ ID NO:30 is a TIC810 amino acid sequence encoded from the second plant expression cassette as set forth in SEQ ID NO:28.

15 SEQ ID NO: 31 is a synthetic nucleotide sequence present in pMON64139 and consisting of a first plant expression cassette encoding a chloroplast targeted TIC809 and a second plant expression cassette encoding a chloroplast targeted TIC810.

SEQ ID NO:32 is a TIC809 amino acid sequence encoded from the first plant expression cassette as set forth in SEQ ID NO:31.

20 SEQ ID NO:33 is a TIC810 amino acid sequence encoded from the second plant expression cassette as set forth in SEQ ID NO:31.

SEQ ID NO:34 is a synthetic nucleotide sequence present in pMON70513 and consists of a plant expression cassette encoding a TIC809 amino acid sequence.

25 SEQ ID NO:35 is a TIC809 amino acid sequence encoded from the plant expression cassette as set forth in SEQ ID NO:34.

SEQ ID NO:36 is a synthetic nucleotide sequence present in pMON70514 and consists of a plant expression cassette encoding a chloroplast targeted TIC809 amino acid sequence.

30 SEQ ID NO:37 is a TIC809 amino acid sequence encoded from the plant expression cassette as set forth in SEQ ID NO:36.

SEQ ID NO:38 is a synthetic nucleotide sequence present in pMON64144 and consists of a plant expression cassette encoding a chloroplast targeted TIC809 amino acid sequence.

SEQ ID NO:39 is a TIC809 amino acid sequence encoded from the plant expression cassette as set forth in SEQ ID NO:38.

SEQ ID NO:40 is a synthetic nucleotide sequence present in pMON64150 and consists of a first plant expression cassette encoding a chloroplast targeted TIC809 amino acid sequence and a second plant expression cassette encoding a chloroplast targeted TIC810 amino acid sequence.

SEQ ID NO:41 is a TIC809 amino acid sequence encoded from the first plant expression cassette as set forth in SEQ ID NO:40.

SEQ ID NO:42 is a TIC810 amino acid sequence encoded from the second plant expression cassette as set forth in SEQ ID NO:40.

SEQ ID NO:43 is a synthetic nucleotide sequence present in pMON64151 and consists of a first plant expression cassette encoding a TIC809 amino acid sequence and a second plant expression cassette encoding a TIC810 amino acid sequence.

SEQ ID NO:44 is a TIC809 amino acid sequence encoded from the first plant expression cassette as set forth in SEQ ID NO:43.

SEQ ID NO:45 is a TIC810 amino acid sequence encoded from the second plant expression cassette as set forth in SEQ ID NO:43.

SEQ ID NO:46 is a nucleotide sequence encoding a TIC127 peptide which corresponds to a fusion between TIC809 (encoded by nucleotide position 1-696) and TIC810 (encoded by nucleotide position 754-1407), in which a short linker sequence (encoded by nucleotide position 697-753) has been introduced to allow for the two proteins to be separated by proteolysis after expression in a plant cell (or upon ingestion in the gut of a target insect pest).

SEQ ID NO:47 is a TIC127 amino acid sequence.

DETAILED DESCRIPTION OF THE PRESENT INVENTION

Polynucleotide sequences derived from *B. thuringiensis* are provided herein that encode ET29, ET37, TIC809, TIC810 and TIC812 proteins as well as a fusion between the ET29 derivative TIC809 and TIC810. Synthetic nucleotide sequences constructed for expression in plants are also provided that encode ET29, TIC809, ET37, TIC810 and TIC812 amino acid sequences as well as the TIC127 protein fusion between TIC809 and TIC810. Methods of making and using the polynucleotide sequences in the development of transgenic plants and plant cells that are resistant to Coleopteran and Hemipteran insect infestation are also disclosed. The proteins are also provided as insecticidal compositions either in

formulations for topical application in various agricultural or animal environments, or as insecticidal compositions produced by a preferred host cell such as a bacterial cell, a plant cell, or a yeast or fungal cell. With reference to the term "derived", it is intended that a sequence is directly isolatable from a particular source, or after isolation from a particular source, a sequence such as a nucleotide sequence is modified to encode a protein that is substantially the same as the sequence that was isolated from a particular source. Alternatively, an amino acid sequence can be substantially the same as an amino acid sequence isolated from a particular source, or encoded from a particular nucleotide sequence. An amino acid sequence can be a chimera of a number of different amino acid sequences that have been each individually isolated from a particular source, but various segments of such different amino acid sequences have been cobbled together to produce the chimera. In this sense, the chimera is derived from each of the various different amino acid sequences. A nucleotide sequence can be similarly derived from other nucleotide sequences. A nucleotide sequence can be derived from other nucleotide sequences as a consequence of its production or having been obtained by reference to one or more other nucleotide sequences. Similarly, amino acid sequences can be obtained or produced by reference to one or more other amino acid sequences, and thus be derived in that manner.

Synthetic polynucleotide sequences of the present invention are preferably designed for *in planta* expression of insecticidal proteins in plant tissues and in plant cells. In particular, the insecticidal proteins of the present invention are referred to as ET29, ET37, TIC809, TIC810, TIC812 and TIC127 proteins. An amino acid sequence of any of these proteins is intended to be within the scope of the present invention so long as it exhibits insecticidal activity at least equivalent to that of the full length protein from which it was derived.

In one embodiment, the present invention relates to a biologically pure culture of a *B. thuringiensis* bacterium containing a nucleotide sequence encoding one or more of the proteins disclosed herein. In particular, the nucleotide sequences are those set forth in SEQ ID NO:1 encoding ET37 (SEQ ID NO:2), SEQ ID NO:3 encoding TIC810 (SEQ ID NO:4), SEQ ID NO:5 encoding TIC812 (SEQ ID NO:6), and SEQ ID NO:7 encoding ET29 (SEQ ID NO:8). Also, fusions are contemplated and specifically embodied herein, such as TIC127 (SEQ ID NO:46 encoding SEQ ID NO:47). A biologically pure culture may also include those that are transformed with a polynucleotide sequence of the present invention or with two or more polynucleotide sequences, at least a first polynucleotide sequence being selected from the group consisting of an ET37 coding sequence and an ET29 coding sequence, and at

least a second polynucleotide sequence being selected from the group consisting of a TIC810 coding sequence and a TIC812 coding sequence. Exemplary bacterial strains, i.e., EG4096 and EG5078, have been deposited in the Northern Regional Research Laboratory of Agricultural Research Service Center Collection (NRRL), USDA, 1815 North University Street, Peoria, IL 61604, pursuant to the Budapest Treaty on the International Recognition of the Deposit of Microorganism for the Purposes of Patent Procedure and have been assigned the accession numbers as indicated in Table 1.

Table 1. Exemplary *B. thuringiensis* strains

Bt Strain	Nature of Strains	Toxins contained	NRRL numbers	Deposit Dates
EG4096	Wild type	ET29, TIC810	NRRL-B-21582	May 30, 1996
EG5078	Wild type	ET37, TIC812	NRRL B-30841	May 3, 2005

The naturally occurring (native) polynucleotide sequence encoding ET37 is set forth at SEQ ID NO:1. This sequence exhibits about 99% sequence identity to the polynucleotide sequence encoding an ET29 insecticidal protein, as disclosed in US Pat. No. 6,093,695, and as disclosed herein at SEQ ID NO:7. The ET37 amino acid sequence encoded from SEQ ID NO:1 is set forth at SEQ ID NO:2. Insecticidal activity of the ET37 protein is demonstrated herein in bioassays using Coleopteran insects of the genus *Diabrotica*, including WCR and SCR, and Hemipteran insects of the genus *Lygus*. In the course of conducting sequence analysis of the extra-chromosomal plasmids on which the ET37 and ET29 coding sequences are located in their respective strains, a single open reading frame was identified upstream of each of the ET37 and ET29 open reading frames, these corresponding respectively to sequences encoding the proteins TIC812 and TIC810. The native polynucleotide molecule (SEQ ID NO:3) encoding a TIC810 protein (SEQ ID NO:4) is positioned immediately upstream of the ET29 coding sequence in *B. thuringiensis* strain EG4096. The native polynucleotide molecule (SEQ ID NO:5) encoding a TIC812 protein (SEQ ID NO:6) is positioned immediately upstream of the ET37 coding sequence in *B. thuringiensis* strain EG5078.

ET29, ET37, TIC810 and TIC812 all may be distantly related to the Cyt insecticidal toxin family, however from a phylogenetic perspective, the ET29 and 37 proteins are much closer to each other than to other Cyt proteins, and the TIC810 and 812 proteins are also much closer to each other than to other Cyt proteins. The ET37 amino acid sequence shares

about 99% sequence similarity with that of ET29. TIC810 and TIC812 exhibit about 97% amino acid sequence similarity to each other. TIC810 exhibits about 33% amino acid sequence similarity with ET29 and ET37. Similarly, the TIC812 protein exhibits about 32% amino acid sequence similarity with ET29 and ET37. The similarity comparison is based upon Pairwise alignments between the proteins using the Wisconsin Package Version 10.3, Accelrys Inc., San Diego, CA.

In accordance with the present invention, certain combinations of expression of the TIC810, TIC812, ET37 and ET29 proteins in a host cell function to achieve a desirable elevated level of insecticidal protein accumulation in the host cell, resulting in improved insecticidal activity directed to certain target Coleopteran and Hemipteran insect pests. A polynucleotide sequence encoding ET29 can be co-expressed with a polynucleotide sequence encoding a TIC810 protein to achieve enhanced expression and or accumulation of the ET29 insecticidal protein in a host cell. Similarly, a polynucleotide sequence encoding ET37 can be co-expressed with a polynucleotide sequence encoding TIC812 to achieve an enhanced expression and or accumulation of the ET37 insecticidal protein in a host cell. It is envisioned that TIC812 is interchangeable with TIC810 as an insecticidal agent, and as a chaperone or accessory protein required for stabilization, accumulation, and improved host range bioactivity of either ET37 or ET29. Co-expression of TIC810 or TIC812 along with ET37 or ET29 results in improved expression and/or accumulation of ET37 or ET29. Such combinations are referred to herein as stabilized insecticidal compositions. Furthermore, the stabilized compositions exhibit a greater host range, at least with reference to its insecticidal efficacy directed to Coleopteran and Hemipteran insect pests, than any of the individual components of the compositions. A recombinant cell in which a first protein consisting of either ET37 or ET29 and a second protein consisting of either TIC810 or TIC812 exhibits increased levels of ET29/ET37 accumulation, provides levels of Coleopteran and Hemipteran insect resistance that were previously unattainable with the insecticidal proteins ET37 and ET29, and results in an absence of abnormal morphology and/or phenotype of the cell or organism consisting of such recombinant cells, all in comparison to a cell expressing either ET29 or ET37 in the absence of TIC810 or TIC812.

The above insecticidal combinations may also be expressed in a plant along with at least one additional insecticidal protein different from either protein comprising the combination, exhibiting a mode of action different from either protein comprising the combination, and toxic to the same insect species as the proteins of the combination. This second combination, which includes the additional insecticidal protein, provides a means of

Coleopteran insect resistance management. Such additional proteins include but are not limited to the Coleopteran toxins Cry3Bb and variants, Cry22A, TIC901, TIC1201, TIC407, TIC417, CryET70, the binary toxins PS149B1, ET33/34, and ET80/76, and various other proteins that have been shown to exhibit Coleopteran insecticidal activity such as patatins, Cry3Aa variants, and non-specific insecticidal compositions isolatable from bacterial species such as *Xenhorabdus* and *Photorhabdus*.

ET29 or ET37 protein each may be combined with TIC810 or TIC812 and co-expressed in a plant with an agent that exhibits insecticidal activity directed to other than a Coleopteran insect pest species, achieving desired control of more than one type of common plant pests selected from the group consisting of Lepidopteran insect pests, and Hemipteran insect pests. Furthermore, such combinations could be combined with still other agents that are effective in controlling virus pests, bacterial pests, fungal pests, and the like. The agents contemplated in such combinations can be expressed along with the ET29/ET37 and TIC810/TIC812 combination or provided through application of insecticidal or pesticidal agents in an agriculturally acceptable formulation, perhaps with a carrier such as an emollient, colloid, spray, powder, mixture, or dust. In situations in which the compositions would be useful in controlling animal pests such as fleas, ticks, lice, mites and the like, it is useful to include along with the ET29/ET37 and TIC810/TIC812 combination an agent that is effective for controlling the same or other pests to which the combination is directed, and so such applications should be provided in a pharmaceutically acceptable formulation. Particular formulations of the insecticidal combinations of the present invention are contemplated for use in topical and/or systemic application to field crops, grasses, fruits and vegetables, and ornamental plants. In one embodiment, the insecticidal composition comprises an oil flowable suspension of bacterial cells that is expressing one or more of the novel insecticidal proteins disclosed herein. Exemplary cells may be *B. thuringiensis* strains EG4096, EG5078, sIC8134 or sIC8135, however, any such bacterial host cell such as *B. megaterium*, *B. subtilis*, *E. coli*, or *Pseudomonas* spp. expressing an insecticidal composition would be useful.

The insecticidal compositions of the present invention may be combined with other biotechnology methods, such as double stranded RNA mediated gene suppression technology, to achieve desired control of one or more pests of a particular plant. Specific nucleotide sequences selected from the sequences native to the cells of a particular pest that are involved in an essential biological pathway are expressed in a plant cell in such a way as to result in the formation of a double stranded RNA, or even a stabilized double stranded

RNA. In this manner, upon ingestion by the pest of a pesticidally effective amount of the RNA, i.e., one or more plant cells expressing the double stranded RNA derived from the cells of such pest, suppression of one or more essential biological pathways is suppressed in the pest. The pest contemporaneously ingests along with the dsRNA, a pesticidally effective amount of the insecticidal compositions described herein, resulting in the provision of an effective insect or pest resistance management system which avoids the likelihood of the onset of resistance because the two pesticidal agents are functioning through different modes of action. A particular recombinant plant cell expressing a composition corresponding to the Coleopteran and Hemipteran insecticidal proteins of the present invention can also express as dsRNA molecules one or more sequences derived from the genome of a targeted Coleopteran pest and one or more sequences derived from the genome of a targeted Hemipteran pest, resulting in the provision of multiple insecticidally effective amounts of the proteins of the present invention and of the dsRNA's designed for suppression of one or more essential genes in the targeted Coleopteran and/or Hemipteran pests. Plants consisting of the gene encoding one or more the proteins of the present invention alone or in combination with additional pest controlling agents such as dsRNA agents exhibit improved yield and drought tolerance compared to plants lacking such pesticidal agents. This may be because these traits result in stabilized root masses that are more uniform, strong and healthy and provides greater nutrient and moisture gathering capacity in comparison to root masses lacking such agents.

A chimeric protein may be synthesized in which a sequence encoding ET29 or ET37 and a sequence encoding TIC810 or a TIC812 is fused together, providing for expression of the stabilized insecticidal composition as a single protein. It is contemplated that the chimeric protein may not be stabilized or exhibit insecticidal bioactivity unless the two fused peptides are unlinked. This physical separation can be accomplished by including as a spacer between the proteins a unique peptide sequence that is the target for any number of proteases known in the art. The chimeric protein can also be linked to other sequences that affect the stability of the chimera, resulting in formation of a crystalline form or inclusion body that consists substantially of the chimera-fusion peptide to the exclusion of other contaminating compositions, peptides, or molecules. Such chimeras or fusions are exemplified herein in Example 11 as TIC127 (sequential fusion of TIC809 and TIC810 linked by a short peptide) and TIC128 (sequential fusion of TIC810 and TIC809) and are shown to exhibit Coleopteran and Hemipteran insecticidal bioactivity.

Expression vectors for use in a host cell are also provided. Expression vectors comprising sequences that result in the expression of a combination of at least two of the polynucleotide sequences disclosed herein are provided in exemplary embodiments. In one embodiment, an expression vector is an isolated and purified polynucleotide molecule comprising a combination of two different polynucleotide sequences, each sequence containing a promoter functional in a desired host cell that is operatively linked to a nucleotide segment encoding a TIC809, TIC810, TIC812, ET29, or ET37. In some embodiments, a transcription termination and polyadenylation sequence may be included 3' of the nucleotide segment encoding one of these proteins.

Expression vectors for use in a bacterial host cell are provided, e.g., in an *E. coli* cell or a *Bacillus* cell including one from *B. thuringiensis*, *B. megaterium*, *B. subtilis*, or related *Bacillus* species. Bacterial host cell expression vectors can contain one nucleotide sequence expressing one or more of the proteins of the present invention in series, in much the same way that proteins can be expressed in most bacterial cells, i.e., in a polycistronic expression cassette. Alternatively, a bacterial expression vector may consist of a nucleotide sequence encoding only one of the proteins of the present invention.

Promoters that function in bacteria are well-known in the art. An exemplary promoter for the *Bacillus* crystal proteins may include any of the known crystal protein gene promoters, including the ET29 gene promoter (US Pat. No. 6,093,695), and promoters specific for *B. thuringiensis* sigma factors (Baum and Malvar, *Molec. Microbiol.*, 18(1): 1-12, 1995). Alternatively, mutagenized or recombinant crystal protein-encoding gene promoters may be engineered by those skilled in the art and used to promote expression of the novel polynucleotide sequences disclosed herein. For purpose of the present invention, the promoter used herein for expression of the polynucleotide sequences is cry1A promoter.

Recombinant DNA constructs for expression in a plant cell are provided. Such constructs typically contain two or more plant functional expression cassettes that are linked together in such a way as to enable the simultaneous introduction of the two or more expression cassettes into the same locus in a plant genome, or alternatively may contain two or more plant functional expression cassettes that are linked within the construct or vector, but are capable of being introduced independently into different loci within a plant genome. These expression cassettes may be referred to as a first and a second expression cassette expressing, respectively, a first polynucleotide sequence encoding a first protein and a second polynucleotide sequence encoding a second protein. It is intended that the first protein can be any of the proteins disclosed herein, and the second protein can be any of the other

proteins disclosed herein other than the first protein. Exemplary polynucleotide sequences are provided as set forth in SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:17 and SEQ ID NO:19.

Promoters used in the recombinant DNA construct of the present invention should exhibit the ability to drive expression of the polynucleotide sequences encoding the insecticidal agents when introduced into plant cells. Promoters that are useful in expressing the polypeptide sequences in plants can be inducible, constitutive, tissue-specific or developmentally specific promoters for use in a monocot or a dicot plant. In one embodiment, the promoter selected for use may be a constitutive promoter and, for the purpose of the present invention, the promoter may specifically comprise an enhanced cauliflower mosaic virus (CaMV 35S) promoter. In another embodiment, the promoter selected may be a tissue-specific promoter and, for the purpose of the present invention, the promoter may specifically comprise a root-specific promoter Rcc3 isolated from rice (US Patent Application Serial No. 11/075,113).

A vector or construct may also include elements that function to regulate the level and timing of expression of the gene of interest to which they are linked, in addition to one or more promoters. For example, the construct may include an intron sequence. The intron sequence employed in the present invention may include a rice actin intron (U.S. Patent No. 5,641,876). The recombinant DNA construct may also have a translation leader sequence between the promoter and the coding sequence. The vector or construct may also include, within the coding region of interest, a nucleic acid sequence that acts, in whole or in part, to terminate transcription of that region. In one embodiment, the polyadenylation sequence of the present invention may be from the 3' untranslated region of a wheat heat shock protein gene (tahsp17).

A recombinant DNA construct may include other elements as well. For example, the construct may contain DNA segments that provide replication function and one or more selectable markers for use in bacterial cells. The construct may also comprise a screenable marker, a selectable marker and other elements as appropriate for selection of plant or bacterial cells having the recombinant DNA constructs of the invention. The recombinant DNA constructs are designed with suitable selectable markers that can confer antibiotic or herbicide tolerance to the cell. The antibiotic tolerance polynucleotide sequences include, but are not limited to, polynucleotide sequences encoding for proteins involved in tolerance to kanamycin, neomycin, hygromycin, and other antibiotics known in the art. An antibiotic tolerance gene in such a vector may be replaced by a herbicide tolerance gene encoding for 5-

enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS, described in U.S. Patent Nos. 5,627,061, and 5,633,435; Padgett et al. *Herbicide Resistant Crops*, Lewis Publishers, 53-85, 1996) or other selectable marker genes and their equivalents such as basta tolerance, bar tolerance, methotrexate resistance, glyphosate oxidoreductase, glyphosate acetyl transferase, phosphonate acetylase (*phnO* and alleles derived from *Enterobacteriaceae*), and dicamba tolerance genes, and the like. Plants expressing the insect tolerance properties of the present invention that are coupled with one or more such selectable markers are particularly useful for commercial purposes.

The polynucleotide sequences of the present invention may be used to transform a plant cell that can be regenerated to produce a transgenic plant that exhibits improved insect resistance when compared to the plant or plant cell from which the transgenic plant is derived. The polynucleotide sequences of the present invention may be modified to improve their expression in the plant host cell. Expression of the polynucleotide sequences of the present invention in the plant cell may achieve accumulations of the insecticidal proteins in the cytoplasm, or can result in the insecticidal proteins being accumulated into a subcellular organelle such as a chloroplast, a plastid or a mitochondrion.

In accomplishing the foregoing, the polynucleotide sequences encoding the proteins of the present invention as set forth in SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:18 and SEQ ID NO:20 and SEQ ID NO:47 have been improved for expression in plants. Such polynucleotide sequences exemplified herein are set forth in SEQ ID NO:13 (TIC809), SEQ ID NO:15 (TIC810), SEQ ID NO:17 (ET37), SEQ ID NO:19 (TIC812), and SEQ ID NO:46 (TIC127), and furthermore in expression cassette sequences as set forth at SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:40, and SEQ ID NO:43. Co-expression of at least one of a TIC810 or TIC812 protein along with one or more of a ET29, TIC809, or ET37 insecticidal protein improves (or assists, acts as a chaperone to, stabilizes, or may otherwise interact with the insecticidal protein as an accessory protein) with the expression and/or accumulation of the insecticidal protein. Co-expression in a transgenic plant results in the absence of low levels of expression and/or accumulation and absence of phytotoxic effects observed when only an insecticidal protein such as ET29, ET37, or TIC809 are expressed alone.

There are many methods for introducing the recombinant DNA construct comprising the combination of the polynucleotide sequences into cells and suitable methods are believed to include virtually any method by which DNA can be introduced into a plant cell, such as by *Agrobacterium* infection, direct delivery of DNA such as, for example, by PEG-mediated

transformation of protoplasts (Omirulleh et al., Plant Mol. Biol., 21:415-428, 1993), by desiccation/inhibition-mediated DNA uptake, by electroporation or by microprojectile bombardment and the like.

In consideration of insect resistance management (IRM), the compositions and methods of the present invention are useful in producing transgenic plants which express two or more *B. thuringiensis* proteins toxic to the same insect species and which confers a level of resistance management for delaying the onset of resistance of any particular susceptible insect species to one or more of the insecticidal agents expressed within the transgenic plant. Alternatively, expression of a *B. thuringiensis* insecticidal protein toxic to a particular target insect pest along with a different proteinaceous agent toxic to the same insect pest but which confers toxicity by a means different from that exhibited by the *B. thuringiensis* toxin is desirable. Such other different proteinaceous agents may comprise any of Cry insecticidal proteins, Cyt insecticidal proteins, insecticidal proteins from *Xenorhabdus* sp. or *Photorhabdus* sp., *B. thuringiensis* vegetative insecticidal proteins, and the like. One means for achieving this result would be to produce two different transgenic events, one event expressing a combination of the two insecticidal proteins of the present invention, active against Coleopteran and Hemipteran insects, and the other expressing a third insecticidal protein, and breeding the two traits together into a hybrid plant. The third insecticidal protein could be one that exhibits Coleopteran insecticidal activity, one that exhibits Hemipteran insecticidal activity, one that exhibits insecticidal activity directed to both Coleopteran and Hemipteran (and perhaps toxicity to other insect orders as well), or one that exhibits insecticidal activity directed to one or more other orders of insects other than Coleopteran and Hemipteran insect pests including but not limited to Lepidopteran, Orthoptera, Diptera and the like.

A pesticidal amount of the insecticidal proteins of the present invention may be provided in the diet of an insect pest. Typically, the diet consists of a plant part upon which the insect normally feeds, such as a plant tissue or plant cell, but may also include other compositions such as an artificial diet formulated for enhancing the development and survival of a particular insect pest. The insecticidal protein can be provided in a composition that is applied to the surface of the diet, or more preferably can be produced by the protein synthesis machinery of a cell and, as described above, accumulated within the plant cell or secreted outside of the plant cell, so long as the amount of the protein toxin provided is an insecticidal amount sufficient to inhibit the insect pest from further feeding, or to inhibit the further growth and development of the insect pest, or to cause mortality to the insect pest.

Transgenic plants can be selfed (self-pollinated) to generate seeds that exhibit a genotype that is homozygous with respect to the transgene encoding the insecticidal protein. Such seeds produce plants and seeds that are only homozygous with respect to the transgene encoding the insecticidal protein. Often, the transgenic plants that are produced are generated in varieties that fail to exhibit the most desirable agronomic qualities. Therefore, homozygous recombinant plants can be crossed with inbred lines that exhibit particular agronomically important qualities.

The present invention will find particular utility in the creation of transgenic plants of commercial interest including various turf grasses, wheat, corn, rice, barley, oats, a variety of ornamental plants and vegetables, as well as a number of nut- and fruit-bearing trees and plants. Specifically, these plants may include maize, wheat, rye, barley, oats, buckwheat, sorghum, rice, onion, grass, sunflower, canola, peas, beans, soybeans, cotton, linseed, cauliflower, asparagus, lettuce, tobacco mustard, sugar beet, potato, sweet potato, carrot, turnip, celery, tomato, egg plant, cucumber, squash, apple, apricot, peach, pear, plum, orange, blackberry, blueberry, strawberry, cranberry and lemon. In general, the invention is useful in monocotyledonous and dicotyledonous plant varieties. The transgenic plant is selected from the group consisting of a monocot plant and a dicot plant that may include monocots such as maize, wheat, rye, barley, oats, buckwheat, sorghum, rice, sugarcane, onion, garlic, grass, or dicots such as sunflower, canola, peas, cowpeas, pigeon peas, beans, soybeans, coffee, broccoli, cotton, linseed, cauliflower, Arabidopsis, asparagus, lettuce, tobacco, spice plants (including curry, mustard, sage, parsley, pepper, thyme, cilantro, bay, cumin, turmeric, nutmeg, cinnamon and the like), sugar beet, potato, sweet potato, carrot, turnip, celery, tomato, egg plant, cucumber, squash or melon, fruit tree plant (including apple, apricot, peach, pear, plum, orange, lemon, lime and the like), berry plants (including blackberry, blueberry, strawberry, cranberry and the like), nut tree plants (including acorn, hickory, Brazil, pecan, walnut, hazelnut, and the like), grape plants, and flowering plants.

DNA sequence information provided herein allows for the preparation of nucleotide sequences or probes and/or primers exhibiting the ability to specifically hybridize to nucleotide sequences disclosed herein, or to homologous sequences encoding proteins related to TIC810, TIC812, ET37 and ET29. The ability of such nucleic acid probes to specifically hybridize to a sequence encoding a related toxin or accessory/chaperonin-like protein provides particular utility in a variety of embodiments. Most importantly, the probes may be used in a variety of assays for detecting the presence of complementary sequences in a given sample. The nature of the regulatory environment under which transgenic plants containing

the genes of the present invention are commercialized provides a particular utility to being able to detect the presence of the sequences encoding the proteins as well as the proteins of the present invention in a biological sample and provides a means for detecting infringement of certain claimed embodiments during the term of any patent that is issued thereon.

5 In certain embodiments, it is advantageous to use oligonucleotide primers, either alone or in pairs or other primer sets. The sequence of such primers is designed using a polynucleotide of the present invention for use in detecting, amplifying or mutating a defined segment of a toxin or accessory/chaperonin-like protein coding sequence from *B. thuringiensis* or other sources using thermal amplification methods. Segments of related
10 toxin or accessory/chaperonin-like coding sequences from other species may also be amplified.

Kits for detecting, in a biological sample, polynucleotide or amino acid sequences of the present invention are also envisioned. Such kits contain one or more polynucleotide sequences each for use as a probe for detecting the presence of a polynucleotide sequence
15 encoding an insecticidal protein of the present invention or fragment thereof. Such kits could also or alternatively contain antibody specific for binding to one or more polypeptides of the proteins of the present invention, as well as reagents for use with the probe or antibody, and the kits would also contain control samples for use in ensuring that the nucleotides or peptides identified with the probe and or antibody and reagents were functioning according to
20 the manufacturers' instructions. All of the reagents necessary for carrying out the methods of identification of either nucleotide sequences or peptides would be packaged together in a kit along with instructions for use. An exemplary kit could contain a TIC810 or related polynucleotide sequence encoding an insecticidal protein along with a sample of the exemplary nucleotide sequence amplification primers pr375 and pr376 as set forth in SEQ ID
25 NO:23 and SEQ ID NO:24, together with the necessary reagents necessary for carrying out an amplification reaction, all packaged together in the kit.

The antibodies that bind specifically to epitopes presented only by any one of ET37, TIC810 and TIC812 proteins or their homologs may also be used for identifying the presence of any one of ET37, TIC810 and TIC812 proteins or its homologs, for purifying the proteins
30 or homologs, for identifying a nucleotide sequence from which an ET37, TIC810 or TIC812 protein or a homolog is being expressed, and for use in the kits designed to allow the detection an ET37, TIC810 or TIC812 protein or a homolog or the detection of a nucleotide sequence expressing the protein or its homolog. The skilled artisan will readily appreciate

that such antibodies also provide for the identification of fusions of such proteins, such as TIC127 and the like.

Agronomically and commercially important products and/or compositions of matter including but not limited to animal feed, commodities, and cotton or soybean or corn products and by-products that are intended for use as animal feeds or for use as food for human consumption or for use in compositions that are intended for human consumption including but not limited to cotton seed, cotton seed oil, cotton seed solids, and the like, soy meal, soy oil, soy flour, and the like, corn flour, corn meal, corn syrup, corn oil, corn starch, popcorn, corn cakes, cereals containing corn or soy, and corn by-products, and the like are intended to be within the scope of the present invention if these products and compositions of matter contain detectable amounts of the nucleotide sequences set forth herein as being diagnostic for the presence of a sequence encoding an ET29, an ET37, a TIC809, a TIC810, a TIC812, a TIC127, or combinations thereof and the like. Distillers dry goods solids are also contemplated as an agronomically and commercially important product, especially if it contains detectable amounts of a nucleotide sequence encoding one or more of the proteins of the present invention, or detectable amounts of one or more of the proteins of the present invention.

Seed comprising detectable amounts of nucleotide sequences encoding these proteins, or seed or plant parts that can be processed into products that contain detectable amounts of such nucleotide sequences or proteins are within the scope of the present invention.

Those of skill in the art, in light of these examples, should appreciate that many changes can be made to the foregoing disclosure without departing from the spirit and scope of the inventions disclosed.

Having illustrated and described the principles of the present invention, it should be apparent to persons skilled in the art that the invention can be modified in arrangement and detail without departing from such principles. We claim all modifications that are within the spirit and scope of the appended claims.

All publications and published patent documents cited in this specification are incorporated herein by reference to the same extent as if each individual publication or patent application was specifically and individually indicated to be incorporated by reference.

EXAMPLES

Example 1

This example illustrates the construction of a nucleotide sequence that functions to achieve expression of an ET29 protein in maize plant cells.

5 ET29 is a protein derived from *B. thuringiensis* and has been previously shown to exhibit corn rootworm insecticidal biological activity when provided in the diet to corn rootworm larvae (U. S. Patent No.'s 6,093,695; 6,537,756; 6,686,452). Native Bt coding sequences have been shown to exhibit unacceptable levels of protein synthesis when expressed in plant cells (US Patent No. 5,500,365). Expression of ET29 protein in corn
10 plant cells, and specifically in cells of corn roots, could provide corn plants with protection from corn rootworm feeding damage. Accordingly, a nucleotide sequence encoding a *B. thuringiensis* ET29 insecticidal protein was constructed that was anticipated to be more highly expressed in plants, avoiding certain inimical nucleotide sequences that have been previously shown to be problematic, while maintaining a nucleotide sequence that encodes
15 the native insecticidal protein with one exception; a supplemental Alanine codon at position two (2) of the coding sequence (SEQ ID NO:13) was included in the synthetic sequence to facilitate ease of cloning. The ALA2 variant ET29 amino acid sequence as set forth at SEQ ID NO:14 has been designated as TIC809 and in bioassays exhibits no less biological activity than the native ET29.

20 The TIC809 coding region as set forth in SEQ ID NO:13 was subcloned into a binary plant transformation vector. Elements upstream of the TIC809 coding region included a enhanced CaMV 35S promoter, a wheat major chlorophyll a/b-binding protein 5' untranslated leader sequence, a rice actin 1 gene first intron and flanking untranslated leader region (UTL) exon sequence, and, optionally, a maize ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase
25 small subunit chloroplast transit peptide coding sequence. *In planta* expression of a fusion protein consisting of the chloroplast transit peptide (ctp) linked to the N-terminus of the TIC809 protein enables targeting of the TIC809 protein into plastids. A wheat hsp17 3' untranslated region (UTR) was incorporated downstream of the TIC809 to achieve transcription termination and polyadenylation of mRNA transcripts.

30 Plant transformation vectors contain a glyphosate tolerance selectable marker. The plant transformation vector pMON70513 provides for expression of a cytoplasm soluble TIC809 protein while pMON70514 provides for expression of a plastid targeted TIC809 protein.

Example 2

This example illustrates the comparison of plastid targeted versus non-targeted expression of TIC809 in transient corn protoplast assays, and the subsequent analysis of transgenic plants transformed to express the TIC809 protein targeted to maize plastids.

5 Transient expression assays using corn protoplasts transformed with either pMON70513 or pMON70514 were compared to each other and to an empty vector control. The results indicated low levels of expression of the untargeted TIC809 protein compared to the targeted TIC809 protein. Accordingly, only pMON70514 was analyzed further. Transgenic corn events were produced after *Agrobacterium*-mediated transformation of corn
10 protoplasts. Regenerated corn plants ("R0 plants") were screened for glyphosate tolerance and the copy number of the wheat hsp17 (tahsp17) 3' UTR. Six-leaf stage (V6) root and leaf samples from each transgenic corn event were screened for the presence and amount of ET29 protein using an ELISA method.

Nineteen (19) out of eighty-seven (87) transgenic events analyzed by ELISA
15 displayed a distinctive abnormal phenotype characterized by a chlorotic stalk, and eight (8) of these exhibited tassel or ear abnormalities. The average TIC809 expression level in leaf and root tissue from plants exhibiting an abnormal phenotype was 2.2 and 2.0 parts per million, respectively. The average TIC809 levels in leaf and root from phenotypically normal plants was 1.4 and 1.1 ppm, respectively. These results suggested that higher levels of TIC809
20 protein may be correlated with the observed abnormal phenotypes.

Example 3

This example illustrates cloning of a gene encoding TIC810, a protein expressed from within an operon in *Bacillus thuringiensis* in which the ET29 (*tic809*) gene also resides, and
25 the identification that expression of TIC810 exhibits no corn rootworm insecticidal bioactivity.

et29 was originally cloned on a 7.1 kb *EcoRI* fragment from DNA obtained from *B. thuringiensis* strain EG4096 (U. S. Patent No. 6,686,452), and was retained in plasmid pEG1303, a shuttle vector capable of replication in *B. thuringiensis* and in *E. coli*.
30 Recombinant *B. thuringiensis* strain EG11502 containing pEG1303 produces low levels of ET29 crystal protein when grown in C2 medium (Donovan et al, *Mol. Gen. Genet.* 214: 365-372, 1988).

The ET29 coding sequence was subcloned from the large 7.1 *EcoRI* fragment in pEG1303 as a ~1.5 kb *KpnI*-*ClaI* fragment into the high copy-number shuttle vector

pEG854.9 (Baum et al, (1996) Appl. Env. Microbiol. 62:4367-4373) with the expectation that an increase in the level of ET29 expression would be observed from the smaller fragment. The resulting plasmid, pMON78402, was believed to contain sufficient native DNA 5' and 3' of the ET29 coding region to incorporate any necessary expression elements such as a sporulation dependent promoter. Surprisingly, no protein crystal formation was detected when pMON78402 was introduced into the acrystalliferous *B. thuringiensis* host strain EG10650, suggesting that the 5' region present on pMON78402 may not contain the native ET29 promoter and that ET29 transcription from the clone in pEG1303 was driven from a fortuitous vector-borne promoter. Furthermore, sequencing of the entire 7.1 kb *EcoRI* fragment in pEG1303 revealed the presence of an interrupted open reading frame immediately upstream of the ET29 coding region. The interrupted coding region contained one of the terminal *EcoRI* sites used to clone the 7.1 kb *EcoRI* fragment in pEG1303. A FASTX search of the existing non-redundant protein databases as well as a database of *B. thuringiensis* crystal protein sequences suggested that this partial coding region encodes an amino acid sequence exhibiting approximately 36% sequence identity to that of the ET29 protein. This related protein was designated TIC810. This suggested that the ET29 gene resided within an uncharacterized operon that included at least the upstream TIC810 gene, and that since TIC810 was probably co-expressed with ET29, it too might also exhibit corn rootworm insecticidal activity.

The native ET29 coding sequence is set forth at SEQ ID NO:9 from position 716 through 1408. A single *NheI* site was present within this coding sequence (nucleotides 820-825 as set forth at SEQ ID NO:9). The partial TIC810 coding sequence in pEG1303 is shown as set forth at SEQ ID NO:9 from nucleotide position 369 to 654. The *EcoRI* site that bisected the TIC810 coding sequence is set forth at SEQ ID NO:9 at nucleotides 369 – 374. *NheI* digestion of EG4096 DNA or digestion with *NheI* and compatible restriction enzymes coupled with ligation and inverse PCR allowed for the identification of the nucleotide sequence of the 5' end of the TIC810 coding region.

EG4096 genomic DNA (5 µg) was digested in 50 µL volumes with compatible restriction enzymes in various combinations that include *NheI*, *NheI* + *BlnI*, *NheI* + *SpeI*, and *NheI* + *XbaI*. Ten microliters of the complete digests were mixed with 80 µL sterile water, 10 µL 10X ligase buffer (New England BioLabs, Beverly, MA) and 2 µL T4 ligase and incubated overnight at 4C. The ligation products were used as thermal amplification templates using an Elongase® kit from Invitrogen (Carlsbad, CA) and the divergent primers pr370 and pr371 (as set forth at SEQ ID NO:21 and SEQ ID NO. 22 respectively). SEQ

ID NO:21 corresponds to the reverse complement of nucleotides 650-671 as set forth in SEQ ID NO:9, and SEQ ID NO:22 corresponds to nucleotides 744-764 as set forth in SEQ ID NO:9.

Restriction enzymes used for each reaction produced compatible ends. *B. thuringiensis* DNA is AT-rich, and so it was anticipated that the restriction enzymes *SpeI* and *XbaI* would yield smaller PCR products than the *BlnI* and *NheI* restriction enzymes. Only the *SpeI-NheI* and *XbaI-NheI* combinations yielded amplified DNA fragments. The amplified DNA fragments were cloned and sequenced and assembled with the *EcoRI-NheI* segment consisting of nucleotides 369 – 825 as set forth at SEQ ID NO:9. An assembled sequence predicted to encode TIC810 was identified as set forth at SEQ ID NO:3. The TIC810 gene was subsequently amplified directly from EG4096 genomic DNA using a high-fidelity thermostable polymerase. Multiple clones were used to confirm the sequence. The TIC810 gene is predicted to encode a ~25,000 Dalton protein as set forth in SEQ ID NO:4. The deduced TIC810 amino acid sequence exhibits about 33% amino acid sequence identity to the ET29 amino acid sequence, suggesting that TIC810 may also exhibit insecticidal bioactivity.

The expression of TIC810 in an acrySTALLIFEROUS strain of *B. thuringiensis* was examined. The TIC810 gene was amplified using primers pr375 and pr376 (as set forth in SEQ ID NO:23 and SEQ ID NO:24, respectively), producing an amplicon encoding a TIC810 amino acid sequence variant that contains an ATG translation initiation codon substituted for the native GTG codon. Primer pr375 also incorporates a *SpeI* site 5' to the TIC810 coding region while primer pr376 incorporates an *XhoI* site 3' to the TIC810 coding region amplicon, permitting subcloning of the amplicon into the *B. thuringiensis-E. coli* shuttle vector pMON47407. The amplicon encoding TIC810 was inserted into this vector just down stream of a vector-endogenous *cryIA* promoter. Sequences positioned downstream of the *cryIA* promoter exhibit sporulation-dependent expression in *B. thuringiensis*. The resulting recombinant plasmid pMON78409 containing the sequence encoding the TIC810 protein was introduced into the acrySTALLIFEROUS *B. thuringiensis* host strain EG10650 by electroporation to generate the recombinant *B. thuringiensis* strain SIC8116. Strain SIC8116 produced parasporal inclusion bodies containing TIC810 protein when grown in C2 sporulation medium. No insecticidal bioactivity was observed when corn rootworm larvae were exposed to artificial media overlaid with sporulated cultures of SIC8116, suggesting that the TIC810 protein did not exhibit insecticidal bioactivity directed to CRW.

Example 4

This example illustrates that ET29 expression under the control of a *cry1A* sporulation dependent promoter results in poor expression levels and aberrant physiological host cell behavior.

The recombinant *B. thuringiensis* strain EG11502, containing the plasmid pEG1303, produced small amounts of the ET29 crystal protein. In an attempt to increase the expression of ET29 in *B. thuringiensis*, the ET29 coding sequence was inserted into the *B. thuringiensis*-*E. coli* shuttle vector pMON47407. The ET29 coding sequence was amplified from pEG1303 DNA using primers pr365 and pr372 (SEQ ID NO:25 and SEQ ID NO:26, respectively). Following sequence confirmation, the amplified ET29 gene fragment was inserted into the pMON47407 vector backbone in an orientation effective for expression of ET29 from the vector-endogenous *cry1A* promoter. To assess ET29 protein production, the resulting recombinant plasmid, pIC17507, was introduced into *B. thuringiensis* strain EG10650, to produce the recombinant strain SIC8114. Strain SIC8114 produced a lower amount of ET29 protein than did the original ET29 recombinant strain EG11502 and exhibited poor sporulation in C2 sporulation medium. This result suggested that overexpression of ET29 may be detrimental to the host cell, or that some other factor present in the native strain EG4096 and not in the recombinant strain was required for efficient expression and/or accumulation of ET29.

Example 5

This example illustrates the identification of an operon exhibiting homology to the TIC810/ET29 operon.

Other strains of *Bt* were examined by Southern blot analysis for the presence of sequences related to the TIC810/ET29 operon in EG4096. A 5.4 kb *ClaI* restriction fragment from *Bt* strain EG5078 total DNA was found to hybridize to an ET29-specific hybridization probe. This 5.4 kb *ClaI* fragment was cloned into the *B. thuringiensis*-*E. coli* shuttle vector pEG854 (Baum et al., (1990) Appl. Env. Microbiol. 56:3420-3428) and also into the *E. coli* vector pBluescript IISK to generate the recombinant plasmids pEG1325 and pEG1323, respectively. Sequence analysis of the 5.4 kb insert revealed two tightly linked genes similar to the ET29 and TIC810 genes in *B. thuringiensis* strain EG4096. The 5' proximal coding sequence was designated as *tic812* (as set forth in SEQ ID NO:5) and was predicted to encode a TIC812 polypeptide (as set forth in SEQ ID NO:6). TIC812 exhibits

about 97% amino acid sequence identity to the TIC810 protein. The 3' proximal coding sequence was designated as *et37* (SEQ ID NO:1) and was predicted to encode the ET37 amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO:2. ET37 exhibits greater than about 99% amino acid sequence identity to the ET29 protein, differing only at one amino acid position.

5 The shuttle vector pEG1325, containing both the TIC812 and ET37 genes, was introduced into the acrySTALLIFEROUS *B. thuringiensis* host strain EG10650 using an electroporation procedure. The resulting recombinant strain, EG11541, produced a high level of the ET37 protein when grown in C2 sporulation medium. However, the amount of TIC812 protein present in the spores was approximately only 25% of the amount of ET37
10 protein. The ET37/TIC812 protein mixture produced by strain EG5078 was found to be toxic to corn rootworm larvae when tested in bioassay.

 Because of the similarity between the TIC810/ET29 and the TIC812/ET37 operons, and because ET37 and ET29 differ at only one amino acid position, it is unlikely that the two proteins exhibit significantly different insecticidal or cytotoxic properties. The low level of
15 ET29 when expressed alone compared to the greater level of ET37 protein when expressed from its native operon, coupled with the substantial identity between the TIC810 and TIC812 proteins, suggests that the TIC810 and TIC812 proteins may be playing a role in increasing the levels of, or providing some stabilization to, their respective ET29 or ET37 proteins. Therefore, co-expression of TIC812 along with the ET37 protein may be the cause of the
20 observed overproduction of ET37 in strain EG11541. Also, co-expression of TIC810 and ET29 may likewise result in overproduction of ET29.

 To test this hypothesis, the individual ET29, ET37, TIC810 and TIC812 coding sequences were amplified and cloned into the *B. thuringiensis* expression vector pMON47407 described above, so that expression of each was under the control of the vector-
25 endogenous *cry1A* promoter. The naturally occurring GTG codon at position 1 of the TIC812 coding sequence was modified to an ATG codon. The TIC810-ET29 tandem coding sequences (SEQ ID NO:9) and the TIC812-ET37 tandem coding sequences (SEQ ID NO:10) were each amplified from genomic DNA and cloned into the TOPO cloning vector pCR2.1-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA) and their sequences confirmed. The amplified DNA
30 fragments were then cloned into the vector pMON47407 so that the tandem coding sequences were under the control of the vector-endogenous *cry1A* promoter. Thus, each insert was cloned into pMON47407 in the same orientation and employed the same promoter. The acrySTALLIFEROUS *B. thuringiensis* strain EG10650 was used as the host strain for all expression

studies. The plasmid constructs and recombinant *B. thuringiensis* strains containing these plasmids are listed in Table 2.

Table 2. Plasmids Constructed for Expression Analysis of TIC810/ET29 and TIC812/ET37

Strain	Coding Sequence(s)	Plasmid	Primer pair ¹
EG10650	-	-	-
SIC8114	ET29	pIC17057	pr372-pr365
SIC8116	TIC810	pMON78409	pr375-pr376
SIC8130	ET37	pMON78404	pr372-pr365
SIC8131	TIC812	pMON78405	pr375-pr376
SIC8134	TIC810_ET29	pMON78406	pr421-pr365
SIC8135	TIC812_ET37	pMON78407	pr421-pr365

1 – primer pair used for amplification of the coding sequence inserted into pMON47407

The recombinant strains and EG10650 were each grown in 30 milliliters of C2 medium in a 250 milliliter baffled flask for 3 days at 28C with vigorous agitation. Spores and crystals were collected by low-speed centrifugation, washed once with 30 milliliters of wash buffer (10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, 0.005% Triton X-100, pH 6.8), and resuspended in wash buffer at a final volume of 3 milliliters. These 10X C2 concentrates were then analyzed by SDS-PAGE. Protein concentrations were determined by densitometry using BSA as a standard.

SDS-PAGE analysis indicated that 1) both ET29 and ET37 exhibited poor production when expressed alone; 2) both TIC810 and TIC812 accumulated to high levels when expressed alone; and 3) ET29 and ET37 exhibited dramatically elevated levels of expression when co-expressed along with TIC810 or TIC812, respectively. ET29 protein production was about 4.6 fold higher in the presence of TIC810 than in its absence, and ET37 production was about 6.6 fold higher in the presence of TIC812 than in its absence. Furthermore, strains SIC8134 containing the TIC810_ET29 tandem coding sequence and SIC8135 containing TIC812_ET37 tandem coding sequence exhibited normal sporulation and lysis. These results indicated that TIC810 and TIC812 were required for the high-level production

of ET29 and ET37 in *B. thuringiensis*, respectively, and may be acting as accessory or chaperone proteins.

The 10X TIC812/ET37 spore-crystal suspension was used directly in a bioassay against WCR. Crystal proteins in the suspensions were quantified by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and densitometry using bovine serum albumin as a standard. 200 mL of WCR diet was prepared in a manner similar to that described by Pleau *et al.* (*Entomol. Exp. Appl.* 105:1-11, 2002). Twenty μ L of test sample were applied per well and allowed to dry before applying a single neonate insect larvae per well with a fine bristle paintbrush. Plates were sealed with mylar and ventilated using an insect pin. Twenty-four larvae were tested per sample concentration. The bioassay plates were incubated at 27C, 60% RH, in complete darkness for 5 – 7 days. The number of surviving larvae per treatment was recorded at the end of 5-7 days, depending on the experiment. Surviving larvae were weighed on a microbalance (Cahn C-33). Data were analyzed using JMP[®] 4 statistical software (SAS Institute, Cary, N. C. , USA). The bioassay data are listed in Table 3.

The results suggest that sporulated cultures of wild type *B. thuringiensis* strain EG5078 containing a mixture of ET37 and TIC812 were found to be toxic to Western corn rootworm larvae, causing significant larval mass reduction when compared to the control. A comparable 10X spore suspension from the *cry-* *B. thuringiensis* host strain EG10650 exhibited no activity against WCR larvae in bioassay. A sample containing 500 mg Cry3Bb rootworm insecticidal protein was included as a positive control.

Table 3. Western Corn Rootworm Bioassay vs ET37/TIC812

Sample	Concentration ¹	N	Mean	SD ²	SEM	LO 95%	UP 95%	P> t
UTC ³	0.250	6	0.36	0.05	0.02	0.31	0.41	
Cry3Bb	0.500	3	0.20	0.03	0.02	0.13	0.26	0.0003
TIC812-ET37	1.000	3	0.16	0.04	0.03	0.05	0.27	<0.0001
TIC812-ET37	0.500	3	0.19	0.08	0.05	-0.01	0.39	0.0002
TIC812-ET37	0.250	3	0.25	0.01	0.01	0.22	0.29	0.0084
TIC812-ET37	0.125	3	0.25	0.08	0.04	0.06	0.44	0.0073

1 – mg/ml; 2 – Standard Deviation; 3 - untreated check;
Variances not equal, Levene's method, P>F 0.0053;
There is an effect due to treatment, SLS, P>F 0.0002; and
Means with a P value <0.05 are significantly different from UTC, Planned Contrasts.

Example 6

This example illustrates the co-expression of TIC810 and TIC809 proteins in corn protoplasts.

Synthetic nucleotide sequences encoding the *B. thuringiensis* TIC810 and ET29 (TIC809) proteins were constructed for expression in plants. The synthetic sequence encoding TIC809 is set forth at SEQ ID NO:13 and the amino acid sequence translation is set forth at SEQ ID NO:14. The synthetic sequence encoding TIC810 is set forth at SEQ ID NO:15, and the amino acid sequence translation is set forth at SEQ ID NO:16. The synthetic coding sequences for TIC809 and TIC810 were cloned into expression vectors for transient expression studies with corn protoplasts. Genetic elements around the coding region(s) of the TIC809 and TIC810 coding sequences were identical, except for the addition of the chloroplast transit peptide (ctp), as described in Example 1. The plasmid constructs are described in part in Table 4 below.

Table 4. Plasmid Constructs for Transient Assay of TIC810/TIC809 Expression

Plasmid	Encoded Cry Protein (s)	Protein Localization
pMON84202	TIC809	Untargeted
pMON84203	ctp-TIC809	Targeted to chloroplasts
pMON64134	TIC809, TIC810	Untargeted
pMON64135	ctp-TIC809, ctp-TIC810	Targeted to chloroplasts
pMON64136	TIC809, ctp-TIC810	TIC809 untargeted; TIC810 targeted to chloroplasts
pMON64137	ctp-TIC809, TIC810	TIC809 targeted to chloroplasts; TIC810 untargeted

Protoplasts were prepared by digesting 12-day corn leaf tissue in 0.6 M mannitol, 10 mM MES pH 5.7, 2% cellulase RS, and 0.3% macerozyme R10 for 2 hours. All transformations were performed using 50 µg DNA and 1.3 x 10⁶ cells.

TIC809 expression in protoplasts was measured using an ELISA with polyclonal antibodies raised against the ET29 protein. Results are shown in Table 5 and represent the average of three duplicate samples.

Table 5. Transient expression of TIC809 in corn protoplasts

Plasmid	Cry Proteins	Mean ²	Standard Error	Comparisons ¹
pMON84202	TIC809	5.1	0.6	c
pMON64134	TIC809, TIC810	120.3	24.9	a
pMON64136	TIC809, ctpTIC810	29.2	3.0	bc
pMON84203	ctpTIC809	111.4	3.2	a
pMON64137	ctpTIC809, TIC810	90.2	18.0	ab
pMON64135	ctpTIC809, ctpTIC810	148.9	15.2	a

1 - Comparisons for all pairs using Tukey-Kramer HSD, alpha = 0.05. Treatments with the same letter are not significantly different from each other.

2 - (ng ET29/mg total protein)

The results indicate that the chloroplast targeted TIC809 protein resulted in an increase in TIC809 expression in the transient system compared to the non-targeted TIC809 expression. By comparing expression from pMON84203 with expression from pMON84202, targeted TIC809 protein expression is observed to be approximately 20-fold higher than that of the untargeted TIC809 protein. However, co-expression of the untargeted TIC810 protein with the untargeted TIC809 also results in a significant increase in the expression of TIC809 protein (compare pMON64134 with pMON84202). In five out six experiments, targeting both TIC810 and TIC809 to the plastid resulted in equivalent or greater levels of expression and accumulation of TIC809 compared to that amount accumulated when TIC809 is targeted to the plastid alone. In any event, co-expression of TIC809 and TIC810 together in any common cellular location results in increased levels of accumulation of TIC809 compared to levels of TIC809 accumulation when expressed in that compartment in the absence of TIC810.

pMON64136 and pMON64137 were constructed to test the effect of expression of TIC809 when localized to a different subcellular compartment from TIC810. Targeting TIC810 to the plastid had no significant impact on the expression of the non-targeted TIC809 (compare pMON64136 with pMON84202). Similarly, the non-targeted TIC810 had no significant impact on the accumulation of the targeted TIC809 (compare pMON64137 with pMON84203). However, the non-targeted TIC810 increased or stabilized the accumulation

of the non-targeted TIC809. These results suggest that localization of the two proteins to the same space within the cell results in a greater accumulation of the rootworm insecticidal protein TIC809, perhaps as a result of some interaction between the proteins, stabilizing the accumulation of the TIC809 protein. These results are consistent with the observation that co-expression of TIC810 and ET29, or co-expression of TIC812 and ET37, results in high-level expression of ET29 or ET37 respectively in *B. thuringiensis*.

A plasmid containing a luciferase (LUX) gene was included as a control in the transient protoplast expression assays. Although luciferase is generally included in transient assays as an indicator of transformation efficiency, it was observed that luciferase expression levels varied widely depending on the plasmid construct tested, presumably due to phytotoxic effects of the accumulated Bt proteins. Low accumulation of TIC809 was correlated with low luciferase levels. In each case, other than when TIC809 is localized to the chloroplast, co-expression of the untargeted TIC810 in the same compartment with TIC809 resulted in a dramatic increase in both luciferase and TIC809 expression levels (compare pMON64134 with pMON84202). The luciferase data is shown in Table 6.

Table 6. Luciferase levels in transient assay experiment

Plasmid	Encoded Cry protein(s)	Counts per second	Standard error of the mean	Comparisons ¹
pMON84202	TIC809	67.4	1.7	b
pMON64134	TIC809, TIC810	518.6	135.7	a
pMON64136	TIC809, ctpTIC810	70.8	2.3	b
pMON84203	ctpTIC809	408.0	84.7	a
pMON64137	ctpTIC809, TIC810	277.2	2.6	ab
pMON64135	ctpTIC809, ctpTIC810	284.9	32.8	ab

¹ Comparisons for all pairs using Tukey-Kramer HSD, alpha = 0.05. Treatments with the same letter are not significantly different from each other.

Example 7

This example illustrates the results of co-expression of TIC810 and TIC809 in transgenic corn.

TIC809, ctp-TIC809, TIC809-TIC810, and ctpTIC809-ctpTIC810 expression cassettes were introduced into binary plant transformation vectors suitable for use in corn transformation. Other than the sequences encoding the Bt proteins, constructs differ from

each other only with respect to the presence or absence of a chloroplast-targeting peptide coding sequence. A gene conferring glyphosate tolerance was used as a selectable marker for *Agrobacterium*-mediated transformation.

pMON64138 contains a cassette for *in planta* expression of TIC809 and TIC810.

5 pMON64139 contains a cassette for *in planta* expression of chloroplast targeted TIC809 and chloroplast targeted TIC810. pMON70513 contains a cassette for *in planta* expression of TIC809. pMON70514 contains a cassette for *in planta* expression of a chloroplast targeted TIC809. Regenerated transgenic corn plants obtained after transformation using these four plasmids and glyphosate selection were screened using a TaqMan® assay for the presence of
10 the glyphosate selectable marker gene and the presence of the tahsp17 3' sequence(s). An endpoint PCR assay was used to confirm the presence of the TIC809 and/or TIC810 coding sequences, where relevant, in each event. Events transformed with constructs containing both TIC809 and TIC810 were expected to exhibit two copies of the tahsp17 3' sequence because each coding sequence is bordered on its 3' end by the tahsp17 3' element.
15 Transgenic and control plants containing six leaves (V6 stage) and roots were assayed using an ET29 ELISA to determine the level of accumulation of TIC809.

Plants regenerated after transformation with pMON70513 containing only the cytoplasm targeted TIC809 coding sequence behaved as indicated above in examples 1 and 2. Plants exhibited substantially abnormal phenotypes and characteristics, typically
20 characterized visually by a chlorotic stalk, among other abnormalities. The TIC809 expression and/or accumulation levels averaged no more than about 2.0 ppm in root tissue.

Fifteen R0 plants transformed with pMON64138 were assayed for the presence of the glyphosate marker and the presence and copy number of the tahsp17 3' elements, as well as for the presence of the OriV for detection of any vector backbone, and for the presence and
25 intactness of the genes encoding the cytoplasm targeted TIC809 and TIC810 proteins. One event did not contain the full length TIC809 coding sequence and was also determined to exhibit undetectable levels of TIC809 protein. The remaining 14 events displayed an average of about 12 ppm TIC809 (fresh weight) in leaf tissue or root tissue. The levels of TIC809 in root tissue ranged from about 0.2 ppm in one plant to about 45 ppm in the plant
30 exhibiting the greatest level of expression and/or accumulation. This result suggested that the co-expression of TIC810 along with TIC809 in the plant tissues provides for improved levels of expression and/or accumulation of the TIC809 protein. More significantly, abnormal phenotypes were not observed in the plants expressing both TIC809 and TIC810 in the cytoplasm. The expression level of TIC809 was more uniform in root tissue, than in leaf

tissue, and more plants exhibited higher levels of TIC809 expression in the roots than in the leaves.

Fifteen R0 plants were regenerated from transformed plant cells using pMON64139 containing the chloroplast targeted TIC809 and TIC810 coding sequences. One event was identified in the screening analysis that did not contain the full length TIC809 expression cassette, and also did not exhibit detectable levels of TIC809 protein. The remaining 14 events averaged about 4.4 ppm and about 8.6 ppm TIC809 protein in root and leaf tissue respectively. The levels of TIC809 in roots ranged from about 0.2 ppm to about 45 ppm. Corn plants transformed with pMON70514, containing the ctpTIC809 gene, averaged only about 1.7 ppm TIC809 protein in leaf tissue and about 6.3 ppm TIC809 protein in root tissue. Thus, co-expression of the non-targeted TIC810 along with the -targeted TIC809 resulted in higher levels of TIC809 expression and/or accumulation than was achieved with the chloroplast-targeted TIC809 protein. Furthermore, the R0 plants producing elevated levels of TIC809 protein did not exhibit stalk chlorosis or other manifestations of phytotoxicity associated with *in planta* expression of the TIC809 protein alone. Co-expression of chloroplast targeted TIC810 along with chloroplast targeted TIC809 also resulted in increased levels of TIC809 accumulation when compared to levels of chloroplast targeted TIC809 protein expressed in the absence of TIC810.

Eighteen R0 plants transformed to co-express the targeted TIC809 and targeted TIC810 proteins were assayed for the glyphosate tolerance selectable marker gene, the *tahsp17* 3' copy number, presence of OriV (backbone), and for intact TIC809 and TIC810 coding sequences. One event did not contain an intact TIC809 coding sequence and failed to exhibit detectable levels of TIC809 protein. The remaining 17 plants averaged 8.6 and 4.4 ppm TIC809 protein in leaf and in root, respectively. Root expression of TIC809 protein ranged from about 1 ppm to about 9 ppm. Events exhibiting chloroplast targeted TIC809 and TIC810 protein expression failed to exhibit stalk chlorosis or other manifestations of phytotoxicity associated with *in planta* expression of the TIC809 protein alone.

Example 8

This example illustrates maize root enhanced expression of plastid targeted TIC809.

pMON64144 was constructed to contain a chloroplast targeted TIC809 under the operable control of a RCc3 root promoter (US Pat Application Serial No. 11/075,113) and flanked 5' of a CTP coding sequence by a maize heat shock protein HSP70 intron and 3' of

the TIC809 coding sequence by a wheat hsp17 3' transcription termination and polyadenylation sequence. The sequence of the expression cassette is set forth at SEQ ID NO:38.

Corn plants were regenerated after *Agrobacterium* mediated transformation of corn tissue with the vector pMON64144. Regenerated corn plants were screened using a TaqMan® assay for the presence of the glyphosate selectable marker and the wheat 3' flanking sequence. The presence of intact TIC809 coding sequence was confirmed using endpoint PCR assay. Root and leaf samples from 23 R0 corn plants at the six-leaf stage were screened using an ET29 ELISA.

The average level of TIC809 accumulated in root tissue was 0.4 ppm. No TIC809 protein was detected in leaves, suggesting that RCc3 promoter activity is enhanced in root cells. 8 of the 23 R0 plants exhibited a TIC809 protein concentration below the level of detection in root. None of the plants tested exhibited levels greater than about 1ppm TIC809. In contrast, a similar construct under the control of a e35S promoter exhibited on average about 1.4 ppm TIC809 protein in root tissue and about 1.7 ppm in leaves (n=87).

Example 9

This example illustrates *in planta* co-expression of TIC809 and TIC810, each under the control of different promoters.

In Example 7 the TIC809 and TIC810 genes were each expressed *in planta* from separate expression cassettes, expression of each coding sequence being driven from separate but identical e35S promoters. In this example expression cassettes were designed so that expression of TIC809 was substantially localized to the root tissue using a RCc3 promoter, while expression of TIC810 was under the control of an e35S promoter.

pMON64150 contains two expression cassettes. One cassette (SEQ ID NO:40) contained a chloroplast targeted TIC809 coding sequence operably linked at its 5' end to a rice RCc3 promoter and a maize heat shock protein HSP70 intron, and at its 3' end to a wheat hsp17 3' transcription termination and polyadenylation sequence. The other cassette (SEQ ID NO:40) contained a chloroplast targeted TIC810 coding sequence operably linked at its 5' end to an e35S promoter and a rice actin intron sequence, and at its 3' end to a wheat hsp17 3' transcription termination and polyadenylation sequence.

pMON64151 is identical to pMON64150 except that the coding sequences in the two expression cassettes lack the chloroplast targeting peptide coding sequence (SEQ ID NO:43 and SEQ ID NO:40, respectively).

Plants regenerated from corn tissue transformed with either pMON64150 or pMON64151 were tested to confirm the presence and intactness of the TIC809 and TIC810 coding sequences. Leaves and roots from these events were tested at the 6 leaf stage using an ET29 ELISA to determine the levels of TIC809 protein accumulation. Plants transformed with pMON64150 exhibited on average about 1.5 ppm TIC809 per plant, while plants transformed with pMON64151 exhibited on average about 0.4 pm TIC809 per plant. pMON64150 plants exhibited TIC809 root accumulation levels from about 0.4 to about 6 ppm, with more than two thirds of the events exhibiting TIC809 levels at least about 1 ppm. Leaf tissue consistently exhibited levels of TIC809 accumulation below the limits of detection for the assay.

Average root accumulation of TIC809 was greater in pMON64151 events than in events generated using the chloroplast targeted pMON64150 expression cassettes (pMON64151, 6.6ppm vs pMON64150, 1.4ppm). These results are consistent with the results obtained using constructs in which TIC809 was expressed from the e35S promoter (pMON64138 and pMON64139). The greatest difference between plants expressing TIC809 from the RCc3 versus the e35S promoter was the lack of accumulation of TIC809 in leaves when expression was controlled by the RCc3 promoter. Both pMON64150 and pMON64151 events exhibited normal phenotypes.

Example 10

This example illustrates Hemipteran species insecticidal bioactivity of compositions comprising TIC 809 and TIC 810, and homologs thereof as disclosed herein.

Compositions comprising ET29 and/or TIC809 or ET37 have been disclosed herein to be insecticidal to Coleopteran species of insect pests. TIC810 and TIC812 have not demonstrated insecticidal bioactivity to Coleopteran insect species, but as disclosed herein, are useful for facilitating the high level expression and stability of ET29 and or TIC809 and ET37. ET29 had also previously demonstrated insecticidal bioactivity directed to *Ctenocephalides* species, and it is anticipated that ET37 would also demonstrate activity to this species. It was speculated that TIC810 and/or TIC812 also exhibit insecticidal bioactivity and so these proteins were tested in bioassay against other plant pests, for example against Hemipteran insect pest species such as *Lygus hesperus* (Western Tarnished Plant Bug; WTPB).

The WTPB, is a phytophagous, piercing-sucking insect that attacks numerous weeds and crops. The WTPB damages agricultural crops, including cotton, by direct feeding

damage. An assay for testing insecticidal compositions using this class of insects must allow for the insect's natural feeding behavior. The feeding assay employed is based on a 96 well micro-titer plate format using a sachet system as described by Habibi et al., (*Archives of Insect Biochem. and Phys.* 50: 62-74 (2002)). The WTPB artificial diet is supplied by Bio-Serv[®] (Bio-Serv[®] Diet F9644B, Frenchtown, NJ).

Five hundred and eighteen milliliters of autoclaved, boiling water are combined with 156.3 grams of Bio-Serv[®] Diet F9644B in a surface sterilized blender. The contents of four surface sterilized chicken eggs are added and the mixture is blended until smooth, then adjusted to one liter total volume and allowed to cool. Toxin samples are prepared by mixing twenty microliters of sample in the desired concentration with two hundred microliters of blended diet (1:10). Depending upon the number of individual samples desired for testing this amount can be scaled up or down.

A sheet of Parafilm[®] (Pechiney Plastic Packing, Chicago, IL) is placed over a vacuum manifold designed for 96-well format (Analytical Research Systems, Gainesville, FL) and a vacuum of approximately -20 millimeters mercury is applied, which is sufficient to cause extrusion of the Parafilm[®] into the wells. Forty microliters of test sample are added to the Parafilm[®] wells. A sheet of Mylar film (Clear Lam Packaging, Inc., Elk Grove Village, IL) is then placed over the Parafilm[®] and sealed gently with a tacking iron (Bienfang Sealector II, Hunt Corporation, Philadelphia, PA). The Parafilm[®] sachets are then placed over a flat-bottom 96-well plate containing WTPB eggs suspended in agarose. Upon hatching, WTPB nymphs will feed by piercing the sachet that is presented above them. Extraoral digestion as a result of extrusion of WTPB oral secretions into the sachet may lead to proteolysis and degradation of diet contents prior to ingestion by the insect. To assure intact protein was being presented to the insect in its diet, the diet sachets are replaced every two days. This enhancement allows for longer presentation of the intact diet contents over the course of the feeding assay. Insect diet sachets are replaced on days two, four and six. Stunting and mortality scores are determined on day 8 and compared to the untreated check (UTC).

The proteins ET29 (or TIC809), TIC810, ET37 and TIC812 (US Patent Application number 60\713,111), were tested individually and in combinations such as, for example, TIC809 plus TIC810, for their toxicity to the WTPB. Crystal proteins were expressed in the acrySTALLIFEROUS *Bacillus thuringiensis* strain EG10650 and purified over sucrose step gradients to eliminate spores and cell debris. Sucrose step gradients (10 mL each of 55-, 70- and 79-% sucrose in 10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, 0.005% Triton X-100, pH 7.5) were

prepared in 25- by 89- mm Ultra-Clear centrifuge tubes (Beckman Instruments, Inc., Palo Alto, CA). Spore-crystal suspensions were layered on top of the gradients and centrifuged at 18,000 rpm (4°C) for 4-18 hr in an ultracentrifuge equipped with a SW28 rotor. Protein crystals were recovered from either the 55-70% or the 70-79% sucrose interface and
5 suspended in 25 mM Tris-HCl pH 7.5. Initial bioassays contained the purified Bt insecticidal proteins at a final concentration of 200 parts per million (ppm). The Coleopteran specific toxin, Cry3Bb1 (Donovan et al., Appl. Environ. Microbiol. 58: 3921-3927 (1992)), the Lepidopteran specific toxin Cry1Ac (Baum et al., Appl. Environ. Microbiol. 56:3420-3428 (1990), and the Lepidopteran specific toxin Cry1Bb1 (U.S Patent No. 5,322,687) were
10 each included as negative controls in the feeding assay. Surprisingly, WTPB nymphs exhibited stunting and mortality when exposed to the combination of the TIC810 plus ET29 proteins and as expected, no stunting and mortality were detected when exposed only to ET29, or to any of the other BT proteins Cry3Bb1, Cry1Ac, or Cry1Bb1, all of which exhibited no significant difference when compared to the untreated control.

15 The *Lygus* bioassays were expanded to include individual crystal preparations of TIC810, TIC812, and a mixture of TIC812 and ET37. Similar to the results described above, only the combination of the two proteins exhibited significant insecticidal activity. TIC810 plus ET29 and TIC812 plus ET37 exhibited significant mortality and mass reduction when compared to untreated controls or to the bioassays using only the individual proteins.
20 However, combinations of TIC810 plus ET29 (or TIC809) exhibited greater mortality and mass reduction than the TIC812 plus ET37 combination.

The results of these bioassays indicated that neither TIC810 nor TIC812 alone are toxic to WTPB, and that a mixture of either TIC810 and ET29 or of TIC812 and ET37 is toxic to WTPB, similar to the results observed when tested against corn rootworm larvae.

25 Example 11

This example illustrates construction of cassettes for expressing TIC809 and/or TIC810, and homologs thereof.

30 Plant transformation vectors are constructed to achieve high-level expression of rootworm-toxic TIC809 and/or ET37 proteins in plants. Vectors containing TIC812 and ET37 coding sequences may be used to co-express TIC812 and ET37 protein, thereby achieving insect protected plants exhibiting high levels of *in planta* ET37 protein production. Co-expression of TIC810 along with ET37 is sufficient for achieving stable high levels of accumulation of ET37 in a host cell. Similarly, co-expression of TIC812 along with ET29 or

even TIC809 is sufficient to achieve stable high levels of accumulation of ET29 or TIC809 in a host cell. As indicated hereinabove,

It is anticipated that proteins of the Cyt1 and Cyt2 class that exhibits from about
5 15 to about 100 per cent amino acid sequence similarity to ET29 and/or ET37 will exhibit improved expression and/or accumulation when expressed in a host cell along with TIC810, TIC812, or an orthologous or homologous protein exhibiting an amino acid sequence that exhibits from about 50 to about 100% amino acid sequence similarity to TIC810 or TIC812, and that any negative phenotypic effects caused by such Cyt protein expression will be
10 ameliorated by co-expression of such Cyt protein with TIC810, TIC812, or variants thereof.

The above specification describes preferred embodiments of the present invention. It will be understood by those skilled in the art that, without departing from the scope and spirit of the present invention and without undue experimentation, the present invention can be
15 performed within a wide range of equivalent parameters. While the present invention has been described in connection with specific embodiments thereof, it will be understood that it is capable of further modifications. The present invention is intended to cover any uses, variations, or adaptations of the invention following the principles of the invention in general. Various permutations and combination of the elements provided in all the claims that follow
20 are possible and fall within the scope of this invention.

All publications, patents and published patent applications referred to in this specification are herein incorporated by reference as if each individual publication or patent was specially and individually stated to be incorporated by reference.

Claims

What is claimed is:

1. An isolated and purified nucleotide sequence encoding an insecticidal protein, said protein being selected from the group consisting of SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, and SEQ ID NO:47.
2. The isolated and purified nucleotide sequence of claim 1 selected from the group consisting of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:11, and SEQ ID NO:46.
3. An isolated and purified insecticidal protein selected from the group consisting of an ET29, an ET37, a TIC810, a TIC812, a TIC809, and a TIC127.
4. A plant or plant cell transformed with a nucleotide sequence encoding an insecticidal protein, said insecticidal protein being selected from the group consisting of an ET29, an ET37, a TIC810, a TIC812, a TIC809, and a TIC127.
5. Progeny or seed from the plant of claim 4, wherein said progeny or seed comprises said nucleotide sequence.
6. A vector comprising a nucleotide sequence encoding a protein selected from the group consisting of an ET29, ET37, TIC810, TIC812, TIC809, and TIC127.
7. A method for enhancing the accumulation of a first insecticidal protein in a host cell, said method comprising contemporaneously expressing said first protein selected from the group consisting of ET29, TIC809, and ET37 with a second insecticidal protein selected from the group consisting of TIC810 and TIC812, wherein said contemporaneous expression enhances the accumulation of the first protein compared to the accumulation of said first protein expressed in the absence of said second protein.
8. A composition exhibiting insecticidal activity comprising a first protein selected from the group consisting of ET29, ET37, and TIC809, and a second protein selected from the group consisting of TIC810 and TIC812.

9. The composition of Claim 8 wherein said first protein is TIC809 and said second protein is TIC810.
10. The composition of claim 8 wherein the ratio of said first protein to said second protein is from about 1:1 to about 2:1.
11. The composition of claim 8 provided in the diet of a Coleopteran or a Hemipteran plant pest in an agriculturally acceptable formulation.
12. The composition of Claim 11 wherein said formulation consists of both proteins expressed in a plant cell.
13. The composition of claim 11 wherein said Coleopteran pest is a corn rootworm and said Hemipteran pest is a Lygus bug.
14. A commodity product comprising a detectable amount of a first protein selected from the group consisting of ET29, ET37 and TIC809 and a detectable amount of a second protein selected from the group consisting of TIC810 and TIC812.
15. A commodity product comprising a detectable amount of (1) a first nucleotide sequence encoding a first protein selected from the group consisting of ET29, ET37 and TIC809 and second nucleotide sequence encoding a second protein selected from the group consisting of TIC810 and TIC812; (2) a first protein selected from the group consisting of ET29, ET37, and TIC809 and a second protein selected from the group consisting of TIC810 and TIC812; (3) both (1) and (2); or (4) any combination of (1) and (2).
16. The commodity product of any of claims 14-15 selected from the group consisting of cotton seed, cotton seed oil, cotton seed meal, soybean seed, soybean oil, soybean meal, soybean flour, distillers' dry goods solids, corn seed, corn flour, corn meal, corn syrup, corn oil, corn starch, animal feed, and cereals manufactured in whole or in part to contain soybean and/or corn by-products.

17. A method for making a plant cell resistant to an insect pest comprising transforming said plant cell to express an insecticidally effective amount of a toxin composition, said toxin composition comprising a first protein selected from the group consisting of ET29, ET37 and TIC809 and a second protein selected from the group consisting of TIC810 and TIC812.

18. The method of claim 17 wherein said plant cell is regenerated into a fertile transgenic plant.

19. The method of claim 17 wherein said plant cell is selected from the group consisting of a monocot plant cell and a dicot plant cell.

20. The method of claim 19, wherein (1) said monocot plant cell is selected from the group consisting of corn, wheat, oat, rice, sorghum, milo, buckwheat, rye, grass (fescue, timothy, brome, orchard, St. Augustine, Bermuda, bentgrass), and barley plant cell, and (2) said dicot plant cell is selected from the group consisting of alfalfa, apple, apricot, asparagus, bean, berry, blackberry, blueberry, canola, carrot, cauliflower, celery, cherry, chickpea, citrus tree, cotton, cowpea, cranberry, cucumber, cucurbit, egg plant, fruit tree, grape, lemon, lettuce, linseed, melon, mustard, nut bearing tree, okra, orange, pea, peach, peanut, pear, plum, potato, soybeans, squash, strawberry, sugar beet, sunflower, sweet potato, tobacco, tomato, turnip, and vegetable plant cells.

21. The method of claim 18, wherein progeny plants and seeds are produced from said transgenic plant, and wherein said progeny plants and seed comprise said first and second protein.

22. A host cell comprising a nucleotide sequence encoding a cyt protein, said protein being selected from the group consisting of a TIC809, a ET37, a TIC810, a TIC812, and a TIC127.

23. The host cell of claim 22 selected from the group consisting of a plant cell, a fungal cell and a bacterial cell.

24. The host cell of claim 23 wherein said plant cell is selected from the group consisting of a monocot plant cell and a dicot plant cell.

25. The host cell of claim 24 wherein (1) said monocot plant cell is selected from the group consisting of corn, wheat, oat, rice, sorghum, milo, buckwheat, rye, grass (fescue, timothy, brome, orchard, St. Augustine, Bermuda, bentgrass), and barley plant cell, and (2) said dicot plant cell is selected from the group consisting of alfalfa, apple, apricot, asparagus, bean, berry, blackberry, blueberry, canola, carrot, cauliflower, celery, cherry, chickpea, citrus tree, cotton, cowpea, cranberry, cucumber, cucurbit, egg plant, fruit tree, grape, lemon, lettuce, linseed, melon, mustard, nut bearing tree, okra, orange, pea, peach, peanut, pear, plum, potato, soybeans, squash, strawberry, sugar beet, sunflower, sweet potato, tobacco, tomato, turnip, and vegetable plant cells.

26. An expression cassette for use in expressing an insecticidal protein in a host cell, wherein said expression cassette comprises in operable linkage a promoter sequence functional in said host cell and a nucleotide sequence encoding said protein, said protein being selected from the group consisting of TIC809, TIC810, TIC812, ET37, and TIC127.

27. The expression cassette of Claim 26 wherein said host cell is selected from the group consisting of a bacterial cell, a fungal cell, a mammalian cell, and a plant cell.

28. The expression cassette of Claim 27 wherein

- (a) said bacterial cell is selected from the group consisting of a *Bacillus* species cell, a *Enterobacteriaceae* species cell, a *Pseudomonas* species cell, a *Clostridium* species cell, and a *Rhizobium* species cell, and a *Agrobacterium* species cell; and
- (b) said plant cell is selected from the group of plants consisting of a dicotyledonous plant and a monocotyledonous plant, said dicotyledonous plant being further selected from the group consisting of alfalfa, apple, apricot, asparagus, bean, berry, blackberry, blueberry, canola, carrot, cauliflower, celery, cherry, chickpea, citrus tree, cotton,

cowpea, cranberry, cucumber, cucurbit, egg plant, fruit tree, grape, lemon, lettuce, linseed, melon, mustard, nut bearing tree, okra, orange, pea, peach, peanut, pear, plum, potato, soybeans, squash, strawberry, sugar beet, sunflower, sweet potato, tobacco, tomato, turnip, and vegetable, and said monocotyledonous plant being further selected from the group consisting of corn, wheat, oat, rice, sorghum, milo, buckwheat, rye, grass (fescue, timothy, brome, orchard, St. Augustine, Bermuda, bentgrass), and barley.

29. The expression cassette of Claim 26 wherein said host cell is a plant cell and said expression cassette further comprises in operable linkage a sequence selected from the group consisting of an expression enhancer sequence, an untranslated leader sequence, an intron sequence, a chloroplast targeting peptide encoding sequence, and a transcription termination and polyadenylation sequence.
30. A vector comprising the expression cassette of any of Claims 26 through Claim 29.
31. A transgenic plant or plant cell resistant to insect infestation comprising a nucleotide sequence encoding a first cyt toxin selected from the group consisting of ET29, TIC809, and ET37 and a second cyt toxin selected from the group consisting of TIC810 and TIC812.
32. The transgenic plant or plant cell of claim 31 wherein said transgenic plant is selected from the group consisting of a dicot plant or dicot plant cell and a monocot plant or monocot plant cell, said dicot plant or dicot plant cell being further selected from the group consisting of alfalfa, apple, apricot, asparagus, bean, berry, blackberry, blueberry, canola, carrot, cauliflower, celery, cherry, chickpea, citrus tree, cotton, cowpea, cranberry, cucumber, cucurbit, egg plant, fruit tree, grape, lemon, lettuce, linseed, melon, mustard, nut bearing tree, okra, orange, pea, peach, peanut, pear, plum, potato, soybeans, squash, strawberry, sugar beet, sunflower, sweet potato, tobacco, tomato, turnip, and vegetable, and said monocot plant being further selected from the group

consisting of corn, wheat, oat, rice, sorghum, milo, buckwheat, rye, grass (fescue, timothy, brome, orchard, St. Augustine, Bermuda, bentgrass), and barley.

33. The transgenic plant or plant cell of claim 32 resistant to (1) coleopteran insect infestation, wherein said coleopteran insect is selected from the group consisting of a Chrysomelidae, Cucujidae, Scarabaeidae, Trogositidae, Tenebrionidae, Curculionidae, Elateridae and Bruchidae, and (2) hemiptera insect infestation, wherein said hemiptera are selected from the sub-orders Heteroptera and Homoptera.
34. The transgenic plant or plant cell of claim 33, wherein said Chrysomelidea is a Diabrotica species selected from the group consisting of *D. virgifera* (western corn rootworm), *D. undecempunctata* (southern corn rootworm), *D. barberi* (northern corn rootworm), *D. virgifera zea* (Mexican corn rootworm), *D. balteata* (brazilian corn rootworm) and Brazilian Corn Rootworm complex (BCR) further comprising *D. viridula* and *D. speciosa*.
35. Progeny or seed of the transgenic plant or plant cell of claim 33, wherein said progeny or seed comprise said nucleotide sequence.
36. A method for controlling coleopteran or hemipteran insect infestation of a plant by providing in the diet of the insect one or more plant cells transformed with a nucleic acid sequence comprising in operable linkage a plant functional promoter and a nucleotide sequence encoding a fusion protein, wherein said fusion protein comprises a first amino acid sequence selected from the group consisting of a SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:8, and SEQ ID NO:14, and a second amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:4 and SEQ ID NO:6.
37. A method for protecting a crop in a field from insect infestation comprising growing a transgenic crop plant comprising an insecticidally effective amount of a first protein and a second protein, said first protein being selected from the group consisting of an ET37, an ET29, and a TIC809 and said second protein being selected from the group consisting of TIC810 and TIC812, and providing the proteins together in the diet of the insect to inhibit the insect from surviving on said transgenic crop plant.

38. The method of claim 37 wherein said insect is selected from the group consisting of a coleopteran insect and a Hemipteran insect.
39. The method of claim 37, wherein said transgenic crop plant further comprises an additional insecticidal agent toxic to the same insect as the first and second proteins, wherein said additional insecticidal agent is selected from the group consisting of a *Bacillus* toxin, a *Xenorhabdus* toxin, a *Photorhabdus* toxin, and a dsRNA specific for suppression of one or more essential genes in said insect.
40. The method of claim 37-39 wherein the yield of said crop is improved compared to the yield of an isogenic crop lacking said insecticidal proteins.

38-21 (53327) B SEQ LISTING.ST25.txt
SEQUENCE LISTING

<110> Monsanto Technology LLC
Anderson, Heather M
Baum, James A
Chay, Catherine A
Roberts, James K
Zhang, Bei

<120> Insecticidal Compositions and Methods For Making Insect-Resistant Transgenic Plants

<130> 38-21 (53327) B

<150> 60/713,111
<151> 2005-08-31

<160> 47

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
<211> 696
<212> DNA
<213> Bacillus thuringiensis

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(696)
<223> ET37

<400> 1
atg ttc ttt aat cgc gtt att aca tta aca gta cca tct tca gat gtg 48
Met Phe Phe Asn Arg Val Ile Thr Leu Thr Val Pro Ser Ser Asp Val
1 5 10 15
gtt aat tat agt gaa att tat cag gta gct cca caa tat gtg aat caa 96
Val Asn Tyr Ser Glu Ile Tyr Gln Val Ala Pro Gln Tyr Val Asn Gln
20 25 30
gct ctt acg cta gct aaa tat ttc caa gga gca att gat ggt tca aca 144
Ala Leu Thr Leu Ala Lys Tyr Phe Gln Gly Ala Ile Asp Gly Ser Thr
35 40 45
tta cgt ttt gat ttt gaa aaa gcc tta caa att gca aat gat att cca 192
Leu Arg Phe Asp Phe Glu Lys Ala Leu Gln Ile Ala Asn Asp Ile Pro
50 55 60
cag gca gca gtg gta aac act tta aat caa act gtg cag caa ggt aca 240
Gln Ala Ala Val Val Asn Thr Leu Asn Gln Thr Val Gln Gln Gly Thr
65 70 75 80
gtc caa gta tca gtg atg ata gac aag att gta gac att atg aag aat 288
Val Gln Val Ser Val Met Ile Asp Lys Ile Val Asp Ile Met Lys Asn
85 90 95
gta tta tct att gta att gat aac aaa aag ttt tgg gat cag gta aca 336
Val Leu Ser Ile Val Ile Asp Asn Lys Lys Phe Trp Asp Gln Val Thr
100 105 110
gct gct att aca aat aca ttc aca aat cta aat tcg caa gaa agc gaa 384
Ala Ala Ile Thr Asn Thr Phe Thr Asn Leu Asn Ser Gln Glu Ser Glu
115 120 125
gca tgg att ttt tat tac aaa gaa gat gca cat aaa act agt tac tat 432
Ala Trp Ile Phe Tyr Tyr Lys Glu Asp Ala His Lys Thr Ser Tyr Tyr
130 135 140
tat aat atc tta ttt gct ata cag gat gag gaa aca ggt ggg gta atg 480
Tyr Asn Ile Leu Phe Ala Ile Gln Asp Glu Glu Thr Gly Gly Val Met
145 150 155 160
gcg aca tta ccg att gca ttt gat att agt gta gat att gaa aaa gaa 528
Ala Thr Leu Pro Ile Ala Phe Asp Ile Ser Val Asp Ile Glu Lys Glu
165 170 175
aag gtt cta ttt gtt act atc aag gat act gaa aat tat gct gtt aca 576
Lys Val Leu Phe Val Thr Ile Lys Asp Thr Glu Asn Tyr Ala Val Thr

38-21 (53327) .B SEQ LISTING.ST25.txt
185 190

180
gta aaa gct att aat gta gta caa gca ctt caa tct tcc cga gat tca 624
Val Lys Ala Ile Asn Val Val Gln Ala Leu Gln Ser Ser Arg Asp Ser
195 200 205
aaa gtt gta gat gct ttt aaa tcg cca cgt cac tta cct aga aaa aga 672
Lys Val Val Asp Ala Phe Lys Ser Pro Arg His Leu Pro Arg Lys Arg
210 215 220
cat aca att tgt agt aac tct taa 696
His Thr Ile Cys Ser Asn Ser
225 230

<210> 2
<211> 231
<212> PRT
<213> Bacillus thuringiensis

<400> 2

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

65

38-21 (53327) B SEQ LISTING.ST25.txt

225

230

<210> 3
<211> 657
<212> DNA
<213> Bacillus thuringiensis

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(657)
<223> TIC810

<400> 3
gtg agt aaa gaa att cgt tta aat ttg agt aga gaa tca ggg gca gat 48
Val Ser Lys Glu Ile Arg Leu Asn Leu Ser Arg Glu Ser Gly Ala Asp
1 5 10 15
tta tat tta aaa ata ctt gct ttt gta aaa cct gag cat ttt ttt caa 96
Leu Tyr Leu Lys Ile Leu Ala Phe Val Lys Pro Glu His Phe Phe Gln
20 25 30
gca tat tta tta tgt aga gaa ttt gag tct atc gta gat cct aca aca 144
Ala Tyr Leu Leu Cys Arg Glu Phe Glu Ser Ile Val Asp Pro Thr Thr
35 40 45
aga gaa tcg gat ttt gac aaa aca ctt acc att gta aag agt gat tca 192
Arg Glu Ser Asp Phe Asp Lys Thr Leu Thr Ile Val Lys Ser Asp Ser
50 55 60
act tta gtt acg gtt ggt aca atg aat act aaa ctt gtg aat agt caa 240
Thr Leu Val Thr Val Gly Thr Met Asn Thr Lys Leu Val Asn Ser Gln
65 70 75 80
gaa att cta gtt agt gat ttg att acg caa gtt gga agt cag ata gct 288
Glu Ile Leu Val Ser Asp Leu Ile Thr Gln Val Gly Ser Gln Ile Ala
85 90 95
gat acc tta ggt att aca gac att gat gca aat aca cag caa caa tta 336
Asp Thr Leu Gly Ile Thr Asp Ile Asp Ala Asn Thr Gln Gln Gln Leu
100 105 110
aca gaa tta att gga aat tta ttt gtg aat ctg aat tct caa gtt caa 384
Thr Glu Leu Ile Gly Asn Leu Phe Val Asn Leu Asn Ser Gln Val Gln
115 120 125
gaa tat att tat ttt tat gag gaa aaa gaa aag caa aca agt tat cgc 432
Glu Tyr Ile Tyr Phe Tyr Glu Glu Lys Glu Lys Gln Thr Ser Tyr Arg
130 135 140
tat aac atc ctt ttc gtt ttt gaa aaa gag tct ttt atc acc att tta 480
Tyr Asn Ile Leu Phe Val Phe Glu Lys Glu Ser Phe Ile Thr Ile Leu
145 150 155 160
cca atg gga ttc gat gtg act gtg aac act aat aaa gaa gcg gtt ctt 528
Pro Met Gly Phe Asp Val Thr Val Asn Thr Asn Lys Glu Ala Val Leu
165 170 175
aag tta aca cct aaa gat aaa gtc act tat ggt cat gta tca gta aaa 576
Lys Leu Thr Pro Lys Asp Lys Val Thr Tyr Gly His Val Ser Val Lys
180 185 190
gct tta aat att att caa ctt atc aca gaa gat aaa ttt aac ttt ctt 624
Ala Leu Asn Ile Ile Gln Leu Ile Thr Glu Asp Lys Phe Asn Phe Leu
195 200 205
gct aca tta aaa aag gca cta aaa act cta taa 657
Ala Thr Leu Lys Lys Ala Leu Lys Thr Leu
210 215

<210> 4
<211> 218
<212> PRT
<213> Bacillus thuringiensis

<400> 4

66

38-21 (53327) B SEQ LISTING.ST25.txt

Val 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> 5
<211> 657
<212> DNA
<213> Bacillus thuringiensis

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(657)
<223> TIC812

<400> 5
gtg agt aaa gaa att cgt tta aat ttg agt aga gaa tca ggg gca gat 48
Val Ser Lys Glu Ile Arg Leu Asn Leu Ser Arg Glu Ser Gly Ala Asp
1 5 10 15

tta tat tta aaa ata ctt gct ttt gta aaa cct gag cat ttt ttt caa 96
Leu Tyr Leu Lys Ile Leu Ala Phe Val Lys Pro Glu His Phe Phe Gln
20 25 30

gca tat tta tta tgt aga gaa ttt gag tct atc gta gat cct aca aca 144
Ala Tyr Leu Leu Cys Arg Glu Phe Glu Ser Ile Val Asp Pro Thr Thr
35 40 45

38-21 (53327) B SEQ LISTING.ST25.txt

aga gaa ttg gat ttt gac aaa acg ctt acc att gta aag agt gat tca 192
Arg Glu Leu Asp Phe Asp Lys Thr Leu Thr Ile Val Lys Ser Asp Ser
50 55 60

act tta gtt acg gtt ggt aca atg aat act aaa ctt gtg aat agt caa 240
Thr Leu Val Thr Val Gly Thr Met Asn Thr Lys Leu Val Asn Ser Gln
65 70 75 80

gaa att cta gtt agt gat ttg att aag caa gtt gga agt cag ata gct 288
Glu Ile Leu Val Ser Asp Leu Ile Lys Gln Val Gly Ser Gln Ile Ala
85 90 95

gat acc tta ggt att aca gac att gat gca aat aca cag caa cga tta 336
Asp Thr Leu Gly Ile Thr Asp Ile Asp Ala Asn Thr Gln Arg Leu
100 105 110

acg gaa tta att gaa aat tta ttt gtg aat ctg aat tct caa gtt caa 384
Thr Glu Leu Ile Glu Asn Leu Phe Val Asn Leu Asn Ser Gln Val Gln
115 120 125

gac tat att tat ttt tat gag gaa aaa gaa aag caa aca agt tat cgc 432
Asp Tyr Ile Tyr Phe Tyr Glu Glu Lys Glu Lys Gln Thr Ser Tyr Arg
130 135 140

tat aac atc ctt ttc gtt ttt gaa aaa gag tct ttt atc acc att tta 480
Tyr Asn Ile Leu Phe Val Phe Glu Lys Glu Ser Phe Ile Thr Ile Leu
145 150 155 160

cca atg gga ttc gat gtg act gtg aac act aat aaa gaa gcg gtt ctt 528
Pro Met Gly Phe Asp Val Thr Val Asn Thr Asn Lys Glu Ala Val Leu
165 170 175

aag tta aca cct aaa gat aaa gtc act tat ggt cat gta tca gta aaa 576
Lys Leu Thr Pro Lys Asp Lys Val Thr Tyr Gly His Val Ser Val Lys
180 185 190

gct tta aat att att caa ttt atc aca gaa gat aaa ttg aac ttt ctt 624
Ala Leu Asn Ile Ile Gln Phe Ile Thr Glu Asp Lys Leu Asn Phe Leu
195 200 205

gct aca tta aaa aag gca cta aaa act cta taa 657
Ala Thr Leu Lys Lys Ala Leu Lys Thr Leu
210 215

<210> 6
<211> 218
<212> PRT
<213> Bacillus thuringiensis

<400> 6

Val 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 Leu 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 Lys Gln Val Gly Ser Gln Ile Ala
85 90 95

Asp Thr Leu Gly Ile Thr Asp Ile Asp Ala Asn Thr Gln Gln Arg Leu
100 105 110

38-21 (53327) B SEQ LISTING.ST25.txt

Thr Glu Leu Ile Glu Asn Leu Phe Val Asn Leu Asn Ser Gln Val Gln
115 120 125

Asp 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 Phe Ile Thr Glu Asp Lys Leu Asn Phe Leu
195 200 205

Ala Thr Leu Lys Lys Ala Leu Lys Thr Leu
210 215

<210> 7
<211> 696
<212> DNA
<213> Bacillus thuringiensis

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(696)
<223> ET29

<400> 7
atg ttc ttt aat cgc gtt att aca tta aca gta cca tct tca gat gtg 48
Met Phe Phe Asn Arg Val Ile Thr Leu Thr Val Pro Ser Ser Asp Val
1 5 10 15

gtt aat tat agt gaa att tat cag gta gct cca caa tat gtg aat caa 96
Val Asn Tyr Ser Glu Ile Tyr Gln Val Ala Pro Gln Tyr Val Asn Gln
20 25 30

gct ctt acg cta gct aaa tat ttc caa gga gca att gat ggt tca aca 144
Ala Leu Thr Leu Ala Lys Tyr Phe Gln Gly Ala Ile Asp Gly Ser Thr
35 40 45

tta cgt ttt gat ttt gaa aaa gcc tta caa att gca aat gat att cca 192
Leu Arg Phe Asp Phe Glu Lys Ala Leu Gln Ile Ala Asn Asp Ile Pro
50 55 60

cag gca gca gtg gta aac act tta aat caa act gtg cag caa ggt aca 240
Gln Ala Ala Val Val Asn Thr Leu Asn Gln Thr Val Gln Gln Gly Thr
65 70 75 80

gtc caa gta tca gtg atg ata gac aag att gta gac att atg aag aat 288
Val Gln Val Ser Val Met Ile Asp Lys Ile Val Asp Ile Met Lys Asn
85 90 95

gta tta tct att gta att gat aac aaa aag ttt tgg gat cag gta aca 336
Val Leu Ser Ile Val Ile Asp Asn Lys Lys Phe Trp Asp Gln Val Thr
100 105 110

gct gct att aca aat aca ttc aca aat cta aat tcg caa gaa agc gaa 384
Ala Ala Ile Thr Asn Thr Phe Thr Asn Leu Asn Ser Gln Glu Ser Glu
115 120 125

gca tgg att ttt tat tac aaa gaa gat gca cat aaa act agt tac tat 432
Ala Trp Ile Phe Tyr Tyr Lys Glu Asp Ala His Lys Thr Ser Tyr Tyr
130 135 140

tat aat atc tta ttt gct ata cag gat gag gaa aca ggt ggg gta atg 480

38-21 (53327) B SEQ LISTING.ST25.txt

Tyr Asn Ile Leu Phe Ala Ile Gln Asp Glu Glu Thr Gly Gly Val Met
145 150 155 160

gcg aca tta ccg att gca ttt gat att agt gta gat att gaa aaa gaa 528
Ala Thr Leu Pro Ile Ala Phe Asp Ile Ser Val Asp Ile Glu Lys Glu
165 170 175

aag gtt cta ttt gtt act atc aag gat act gaa aat tat gcg gtt aca 576
Lys Val Leu Phe Val Thr Ile Lys Asp Thr Glu Asn Tyr Ala Val Thr
180 185 190

gta aaa gct att aat gta gta caa gca ctt caa tct tcc cga gat tca 624
Val Lys Ala Ile Asn Val Val Gln Ala Leu Gln Ser Ser Arg Asp Ser
195 200 205

aaa gtt gta gat gct ttt aaa tcg cca cgt cac tta cct aga aaa aga 672
Lys Val Val Asp Ala Phe Lys Ser Pro Arg His Leu Pro Arg Lys Arg
210 215 220

cat aaa att tgt agt aac tct taa 696
His Lys Ile Cys Ser Asn Ser
225 230

<210> 8
<211> 231
<212> PRT
<213> Bacillus thuringiensis

<400> 8

Met Phe Phe Asn Arg Val Ile Thr Leu Thr Val Pro Ser Ser Asp Val
1 5 10 15

Val Asn Tyr Ser Glu Ile Tyr Gln Val Ala Pro Gln Tyr Val Asn Gln
20 25 30

Ala Leu Thr Leu Ala Lys Tyr Phe Gln Gly Ala Ile Asp Gly Ser Thr
35 40 45

Leu Arg Phe Asp Phe Glu Lys Ala Leu Gln Ile Ala Asn Asp Ile Pro
50 55 60

Gln Ala Ala Val Val Asn Thr Leu Asn Gln Thr Val Gln Gln Gly Thr
65 70 75 80

Val Gln Val Ser Val Met Ile Asp Lys Ile Val Asp Ile Met Lys Asn
85 90 95

Val Leu Ser Ile Val Ile Asp Asn Lys Lys Phe Trp Asp Gln Val Thr
100 105 110

Ala Ala Ile Thr Asn Thr Phe Thr Asn Leu Asn Ser Gln Glu Ser Glu
115 120 125

Ala Trp Ile Phe Tyr Tyr Lys Glu Asp Ala His Lys Thr Ser Tyr Tyr
130 135 140

Tyr Asn Ile Leu Phe Ala Ile Gln Asp Glu Glu Thr Gly Gly Val Met
145 150 155 160

Ala Thr Leu Pro Ile Ala Phe Asp Ile Ser Val Asp Ile Glu Lys Glu
165 170 175

Lys Val Leu Phe Val Thr Ile Lys Asp Thr Glu Asn Tyr Ala Val Thr
180 185 190

38-21 (53327) B SEQ LISTING.ST25.txt
Val Lys Ala Ile Asn Val Val Gln Ala Leu Gln Ser Ser Arg Asp Ser
195 200 205

Lys Val Val Asp Ala Phe Lys Ser Pro Arg His Leu Pro Arg Lys Arg
210 215 220

His Lys Ile Cys Ser Asn Ser
225 230

<210> 9
<211> 1411
<212> DNA
<213> Bacillus thuringiensis

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1411)
<223> TIC810 ORF 1-657; ET29 ORF 716-1411

<400> 9
atgagtaaaag aaattcggtt aaatttgagt agagaatcag gggcagattt atatttaaaa 60
atacttgctt ttgtaaaacc tgagcatttt tttcaagcat atttattatg tagagaattt 120
gagtctatcg tagatcctac aacaagagaa tcggattttg acaaaacact taccattgta 180
aagagtgatt caactttagt tacggttggt acaatgaata ctaaacttgt gaatagtcaa 240
gaaattctag ttagtgattt gattacgcaa gttggaagtc agatagctga taccttaggt 300
attacagaca ttgatgcaa tacacagcaa caattaacag aattaattgg aaatttattt 360
gtgaatctga attctcaagt tcaagaatat atttattttt atgaggaaaa agaaaagcaa 420
acaagttatc gctataacat ccttttcggt tttgaaaaag agtcttttat caccatttta 480
ccaatgggat tcgatgtgac tgtgaacact aataaagaag cggttcttaa gttaacacct 540
aaagataaag tcacttatgg tcatgtatca gtaaaagctt taaatattat tcaacttata 600
acagaagata aatttaactt tcttgctaca ttaaaaaagg cactaaaaac tctataagcg 660
ggttaagtag gtaaaataga attaaaatga aacagtatga aaggggtaat tttatatggt 720
ctttaatcgc gttattacat taacagtacc atcttcagat gtgggtaatt atagtgaat 780
ttatcaggta gctccacaat atgtgaatca agctcttacg ctagctaaat atttccaagg 840
agcaattgat ggttcaacat tacgttttga ttttgaaaaa gccttacaaa ttgcaaatga 900
tattccacag gcagcagtg taaacacttt aaatcaaact gtgcagcaag gtacagtcca 960
agtatcagtg atgatagaca agattgtaga cattatgaag aatgtattat ctattgtaat 1020
tgataacaaa aagttttggg atcaggtaac agctgctatt acaatacat tcacaaatct 1080
aaattcgcaa gaaagcgaag catggatttt ttattacaaa gaagatgcac ataaaactag 1140
ttactattat aatatcttat ttgctataca ggatgaggaa acaggtgggg taatggcgac 1200
attaccgatt gcatttgata ttagtgtaga tattgaaaaa gaaaagggtt tatttggtac 1260
tatcaaggat actgaaaatt atgcggttac agtaaaagct attaatgtag tacaagcact 1320
tcaatcttcc cgagattcaa aagttgtaga tgctttttaa tcgccacgtc acttacctag 1380
aaaaagacat aaaatttgta gtaactctta a 1411

<210> 10
<211> 1411
<212> DNA
<213> Bacillus thuringiensis

71

38-21 (53327) B SEQ LISTING.ST25.txt

```

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1411)
<223> TIC812 ORF 1-657; ET37 ORF 716-1411

<400> 10
atgagtaaag aaattcgttt aaatttgagt agagaatcag gggcagattt atatttaaaa      60
atacttgctt ttgtaaaacc tgagcatttt tttcaagcat atttattatg tagagaattt      120
gagtcctatc tagatcctac aacaagagaa ttggattttg acaaaacgct taccattgta      180
aagagtgatt caactttagt tacggttggt acaatgaata ctaaacttgt gaatagtcaa      240
gaaattctag ttagtgattt gattaagcaa gttggaagtc agatagctga taccttaggt      300
attacagaca ttgatgcaa tacacagcaa cgattaacgg aattaattga aaatttat      360
gtgaatctga attctcaagt tcaagactat atttattttt atgaggaaaa agaaaagcaa      420
acaagttatc gctataacat ccttttcggt tttgaaaaag agtcttttat caccatttta      480
ccaatgggat tcgatgtgac tgtgaacact aataaagaag cggttcttaa gttaacacct      540
aaagataaag tcacttatgg tcatgtatca gtaaaagctt taaatattat tcaatttatc      600
acagaagata aattgaactt tcttgctaca ttaaaaaagg cactaaaaac tctataagtg      660
ggtaagtag gtaaaataga attaaatga aacagtatga aaggggtaat tttatatgtt      720
ctttaatcgc gttattacat taacagtacc atcttcagat gtgggtaatt atagtgaat      780
ttatcaggta gctccacaat atgtgaatca agctcttacg ctagctaaat attccaagg      840
agcaattgat gggtcaacat tacgttttga ttttgaaaaa gccttacaaa ttgcaaatga      900
tattccacag gcagcagtg taaacacttt aaatcaaact gtgcagcaag gtacagtcca      960
agtatcagtg atgatagaca agattgtaga cattatgaag aatgtattat ctattgtaat     1020
tgataacaaa aagttttggg atcaggtaac agctgctatt acaaatacat tcacaaatct     1080
aaattcgcaa gaaagcgaag catggatttt ttattacaaa gaagatgcac ataaaactag     1140
ttactattat aatatcttat ttgctataca ggatgaggaa acaggtgggg taatggcgac     1200
attaccgatt gcatttgata ttagtgtaga tattgaaaaa gaaaagggtt tatttggtac     1260
tatcaaggat actgaaaatt atgctgttac agtaaaagct attaatgtag tacaagcact     1320
tcaatcttcc cgagattcaa aagttgtaga tgcttttaaa tcgccacgtc acttacctag     1380
aaaaagacat acaatttgta gtaactctta a                                     1411

```

```

<210> 11
<211> 1531
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

```

```

<220>
<223> ORF TIC810 1-657; ORF ET37 716 - 1411

```

```

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1531)
<223> TIC810 ORF 1-657; ET37 ORF 716-1411

<400> 11
gaattcgccc ttgcctaggt atgagtaaag aaattcgttt aaatttgagt agagaatcag      60
gggcagattt atatttaaaa atacttgctt ttgtaaaacc tgagcatttt tttcaagcat      120
atttattatg tagagaattt gagtcctatc tagatcctac aacaagagaa tcggattttg      180
acaaaacact taccattgta aagagtgatt caactttagt tacggttggt acaatgaata      240
ctaaacttgt gaatagtcaa gaaattctag ttagtgattt gattacgcaa gttggaagtc      300

```

72

38-21 (53327) B SEQ LISTING.ST25.txt

agatagctga taccttaggt attacagaca ttgatgcaaa tacacagcaa caattaacag 360
aattaattgg aaattttattt gtgaatctga attctcaagt tcaagaatat atttattttt 420
atgaggaaaa agaaaagcaa acaagttatc gctataacat ccttttcggt tttgaaaaag 480
agtcttttat caccatttta ccaatgggat tcgatgtgac tgtgaacact aataaagaag 540
cggttcttaa gttaacacct aaagataaag tcacttatgg tcatgtatca gtaaaagctt 600
taaataattat tcaacttadc acagaagata aatttaactt tcttgctaca ttaaaaaagg 660
cactaaaaac tctataagcg ggtaagtag gtaaaataga attaaaatga aacagtatga 720
aaggggtaat tttatatgtt cttaaatcgc gttattacat taacagtacc atcttcagat 780
gtggttaatt atagtgaat ttatcaggta gctccacaat atgtgaatca agctcttacg 840
ctagctaaat atttccaagg agcaattgat ggttcaacat tacgttttga ttttgaaaaa 900
gccttacaaa ttgcaaatga tattccacag gcagcagtg taaacacttt aaatcaaact 960
gtgcagcaag gtacagtcca agtatcagtg atgatagaca agattgtaga cattatgaag 1020
aatgtattat ctattgtaat tgataacaaa aagttttggg atcaggtaac agctgctatt 1080
acaaatacat tcacaaatct aaattcgcaa gaaagcgaag catggatttt ttattacaaa 1140
gaagatgcac ataaaactag ttactattat aatatcttat ttgctataca ggatgaggaa 1200
acaggtgggg taatggcgac attaccgatt gcatttgata ttagtgtaga tattgaaaaa 1260
gaaaaggttc tatttgttac tatcaaggat actgaaaatt atgctgttac agtaaaagct 1320
attaatgtag tacaagcact tcaatcttcc cgagattcaa aagttgtaga tgctttttaa 1380
tcgccacgtc acttacctag aaaaagacat acaatttgta gtaactctta agaagaccga 1440
caataagata aaatcttatt gcctatcttc ttagaataac aaatggctgt tatggggaag 1500
cactaaatgg actcgagtta agggcgaatt c 1531

<210> 12
<211> 1531
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> ORF TIC812 1-657; ORF ET29 716-1411

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1531)
<223> TIC812 ORF 1-657; ET29 ORF 716-1411

<400> 12
gaattcgccc ttgcctaggt atgagtaaag aaattcggtt aaatttgagt agagaatcag 60
gggcagattt atatttaaaa atacttgctt ttgtaaaacc tgagcatttt tttcaagcat 120
atttattatg tagagaattt gagtctatcg tagatcctac aacaagagaa ttggattttg 180
acaaaacgct taccattgta aagagtgatt caactttagt tacggttggt acaatgaata 240
ctaaacttgt gaatagtcaa gaaattctag ttagtgattt gattaagcaa gttggaagtc 300
agatagctga taccttaggt attacagaca ttgatgcaaa tacacagcaa cgattaacgg 360
aattaattga aaattttattt gtgaatctga attctcaagt tcaagactat atttattttt 420
atgaggaaaa agaaaagcaa acaagttatc gctataacat ccttttcggt tttgaaaaag 480
agtcttttat caccatttta ccaatgggat tcgatgtgac tgtgaacact aataaagaag 540
cggttcttaa gttaacacct aaagataaag tcacttatgg tcatgtatca gtaaaagctt 600

38-21 (53327) B SEQ LISTING.ST25.txt

```

taaataattat tcaatttatc acagaagata aattgaactt tcttgctaca ttaaaaaagg 660
cactaaaaaac tctataagtg ggtaagtag gtaaaataga attaaaatga aacagtatga 720
aaggggtaat tttatatgtt ctttaatcgc gttattacat taacagtacc atcttcagat 780
gtgggtaatt atagtgaat ttatcaggta gctccacaat atgtgaatca agctcttacg 840
ctagctaaat atttccaagg agcaattgat ggttcaacat tacgttttga ttttgaaaaa 900
gccttacaaa ttgcaaatga tattccacag gcagcagtg taaacacttt aaatcaaact 960
gtgcagcaag gtacagtcca agtatcagtg atgatagaca agattgtaga cattatgaag 1020
aatgtattat ctattgtaat tgataacaaa aagttttggg atcaggtaac agctgctatt 1080
acaaatacat tcacaaatct aaattcgcaa gaaagcgaag catggatttt ttattacaaa 1140
gaagatgcac ataaaactag ttactattat aatatcttat ttgctatata ggatgaggaa 1200
acaggtgggg taatggcgac attaccgatt gcatttgata ttagttaga tattgaaaaa 1260
gaaaagggtc tatttggtac tatcaaggat actgaaaatt atgcgggtac agtaaaagct 1320
attaatgtag tacaagcact tcaatcttcc cgagattcaa aagttgtaga tgctttttaa 1380
tcgccacgtc acttacctag aaaaagacat aaaatttgta gtaactctta agaagaccga 1440
caataagata aaatcttatt gtctatcttc ttagaataac aaatggctgt tatggggaag 1500
cactaaatgg actcgagtta agggcgaatt c 1531

```

<210> 13
 <211> 702
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic sequence for use in expressing TIC809 (ET29 MET-ALA) in planta

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(702)
 <223> TIC809

```

<400> 13
atg gcc ttc ttc aac cgg gtg atc acc ctc acg gtg ccg tcg tca gac 48
Met Ala Phe Phe Asn Arg Val Ile Thr Leu Thr Val Pro Ser Ser Asp
1 5 10 15

gtg gtc aac tac tcg gag atc tac cag gtg gct cct cag tat gtc aac 96
Val Val Asn Tyr Ser Glu Ile Tyr Gln Val Ala Pro Gln Tyr Val Asn
20 25 30

cag gcc ctg acc ctg gcc aag tac ttc cag gcc gcc atc gac gcc agc 144
Gln Ala Leu Thr Leu Ala Lys Tyr Phe Gln Gly Ala Ile Asp Gly Ser
35 40 45

acc ctg agg ttc gac ttc gag aag gcg tta cag atc gcc aac gac atc 192
Thr Leu Arg Phe Asp Phe Glu Lys Ala Leu Gln Ile Ala Asn Asp Ile
50 55 60

ccg cag gcc gcg gtg gtc aac acc ctg aac cag acc gtc cag cag ggg 240
Pro Gln Ala Ala Val Val Asn Thr Leu Asn Gln Thr Val Gln Gln Gly
65 70 75 80

acc gtc cag gtc agc gtc atg atc gac aag atc gtg gac atc atg aag 288
Thr Val Gln Val Ser Val Met Ile Asp Lys Ile Val Asp Ile Met Lys
85 90 95

aat gtc ctg tcc atc gtg ata gac aac aag aag ttt tgg gat cag gtc 336
Asn Val Leu Ser Ile Val Ile Asp Asn Lys Lys Phe Trp Asp Gln Val
100 105 110

acg gct gcc atc acc aac acc ttc acg aac ctg aac agc cag gag tcg 384
Thr Ala Ala Ile Thr Asn Thr Phe Thr Asn Leu Asn Ser Gln Glu Ser

```

74

38-21 (53327) B SEQ LISTING.ST25.txt

115	120	125	
gag gcc tgg atc ttc tat tac aag gag gac gcc cac aag acg tcc tac			432
Glu Ala Trp Ile Phe Tyr Tyr Lys Glu Asp Ala His Lys Thr Ser Tyr			
130	135	140	
tat tac aac atc ctc ttc gcc atc cag gac gaa gag acg ggt ggc gtg			480
Tyr Tyr Asn Ile Leu Phe Ala Ile Gln Asp Glu Glu Thr Gly Gly Val			
145	150	155	160
atg gcc acg ctg ccc atc gcc ttc gac atc agt gtg gac atc gag aag			528
Met Ala Thr Leu Pro Ile Ala Phe Asp Ile Ser Val Asp Ile Glu Lys			
	165	170	175
gag aag gtc ctg ttc gtg acc atc aag gac act gag aat tac gcc gtc			576
Glu Lys Val Leu Phe Val Thr Ile Lys Asp Thr Glu Asn Tyr Ala Val			
	180	185	190
acc gtc aag gcg atc aac gtg gtc cag gca ctc cag tct agc agg gat			624
Thr Val Lys Lys Ala Ile Asn Val Val Gln Ala Leu Gln Ser Ser Arg Asp			
	195	200	205
tct aag gtg gtt gat gcg ttc aaa tcg cca cgg cac tta ccc cgg aag			672
Ser Lys Val Val Asp Ala Phe Lys Ser Pro Arg His Leu Pro Arg Lys			
	210	215	220
agg cat aag att tgc tct aac tcg tga tga			702
Arg His Lys Ile Cys Ser Asn Ser			
	225	230	
<210> 14			
<211> 232			
<212> PRT			
<213> Artificial Sequence			
<220>			
<223> Synthetic Construct			
<400> 14			
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
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

75

38-21 (53327) B SEQ LISTING.ST25.txt

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> 15
<211> 666
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic sequence for use in expression of TIC810 in planta

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(666)
<223> TIC810

<400> 15
atg agc aaa gaa atc agg ctc aac ctt tct cgt gag agc ggc gcc gac 48
Met Ser Lys Glu Ile Arg Leu Asn Leu Ser Arg Glu Ser Gly Ala Asp
1 5 10 15

ctg tac ctc aag atc ctc gcc ttc gtg aag ccc gag cac ttc ttt cag 96
Leu Tyr Leu Lys Ile Leu Ala Phe Val Lys Pro Glu His Phe Phe Gln
20 25 30

gcg tac ctc ctg tgc cgc gag ttc gag agc atc gtg gat cct aca acc 144
Ala Tyr Leu Leu Cys Arg Glu Phe Glu Ser Ile Val Asp Pro Thr Thr
35 40 45

cgc gag tct gac ttc gac aag acg ctg acc atc gtg aag tcg gac tcc 192
Arg Glu Ser Asp Phe Asp Lys Thr Leu Thr Ile Val Lys Ser Asp Ser
50 55 60

acc ctc gtg acc gtg ggc acg atg aac acc aag ctg gtc aat agc caa 240
Thr Leu Val Thr Val Gly Thr Met Asn Thr Lys Leu Val Asn Ser Gln
65 70 75 80

gag atc ctc gtg tcg gac ttg atc act caa gtc ggt tcc cag atc gcc 288
Glu Ile Leu Val Ser Asp Leu Ile Thr Gln Val Gly Ser Gln Ile Ala
85 90 95

gat acc ctc ggc atc acg gac atc gac gcc aac acc cag caa cag ctc 336
Asp Thr Leu Gly Ile Thr Asp Ile Asp Ala Asn Thr Gln Gln Gln Leu
100 105 110

acg gag ctg atc ggc aac ctc ttc gtg aac ctc aat tcc caa gtt cag 384
Thr Glu Leu Ile Gly Asn Leu Phe Val Asn Leu Asn Ser Gln Val Gln
115 120 125

gag tac atc tac ttc tac gag gag aag gag aag cag acc tcc tac cgc 432
Glu Tyr Ile Tyr Phe Tyr Glu Glu Lys Glu Lys Gln Thr Ser Tyr Arg
130 135 140

tac aac atc ctc ttc gtg ttc gaa aag gag tcg ttc atc acc att ctg 480
Tyr Asn Ile Leu Phe Val Phe Glu Lys Glu Ser Phe Ile Thr Ile Leu
145 150 155 160

cca atg ggc ttc gac gtg acc gtg aac acg aac aag gag gcc gtc ctg 528
Pro Met Gly Phe Asp Val Thr Val Asn Thr Asn Lys Glu Ala Val Leu

76

38-21 (53327) B SEQ LISTING.ST25.txt
170 175

165
aag ctg acc ccg aag gac aag gtt acc tac ggc cac gtc agc gtc aag 576
Lys Leu Thr Pro Lys Asp Lys Val Thr Tyr Gly His Val Ser Val Lys
180 185 190
gcc ctc aac atc atc cag ctc att acg gag gac aag ttc aac ttc ctc 624
Ala Leu Asn Ile Ile Gln Leu Ile Thr Glu Asp Lys Phe Asn Phe Leu
195 200 205
gca acc ctc aag aag gct ctc aag acc ctg tga tga gaa ttc 666
Ala Thr Leu Lys Lys Ala Leu Lys Thr Leu Glu Phe
210 215 220

<210> 16
<211> 218
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Construct

<400> 16

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

77

38-21 (53327) B SEQ LISTING.ST25.txt

<210> 17
<211> 699
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic sequence for expression of ET37 in planta

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(699)
<223> ET37

```

<400> 17
atg ttc ttc aac cgg gtg atc acc ctc acg gtg ccg tcg tca gac gtg      48
Met Phe Phe Asn Arg Val Ile Thr Leu Thr Val Pro Ser Ser Asp Val
1          5          10          15

gtc aac tac tcg gag atc tac cag gtg gct cct cag tat gtc aac cag      96
Val Asn Tyr Ser Glu Ile Tyr Gln Val Ala Pro Gln Tyr Val Asn Gln
20        25        30

gcc ctg acc ctg gcc aag tac ttc cag ggc gcc atc gac ggc agc acc      144
Ala Leu Thr Leu Ala Lys Tyr Phe Gln Gly Ala Ile Asp Gly Ser Thr
35        40        45

ctg agg ttc gac ttc gag aag gcg tta cag atc gcc aac gac atc ccg      192
Leu Arg Phe Asp Phe Glu Lys Ala Leu Gln Ile Ala Asn Asp Ile Pro
50        55        60

cag gcc gcg gtg gtc aac acc ctg aac cag acc gtc cag cag ggg acc      240
Gln Ala Ala Val Val Asn Thr Leu Asn Gln Thr Val Gln Gln Gly Thr
65        70        75        80

gtc cag gtc agc gtc atg atc gac aag atc gtg gac atc atg aag aat      288
Val Gln Val Ser Val Met Ile Asp Lys Ile Val Asp Ile Met Lys Asn
85        90        95

gtc ctg tcc atc gtg ata gac aac aag aag ttt tgg gat cag gtc acg      336
Val Leu Ser Ile Val Ile Asp Asn Lys Lys Phe Trp Asp Gln Val Thr
100       105       110

gct gcc atc acc aac acc ttc acg aac ctg aac agc cag gag tcg gag      384
Ala Ala Ile Thr Asn Thr Phe Thr Asn Leu Asn Ser Gln Glu Ser Glu
115       120       125

gcc tgg atc ttc tat tac aag gag gac gcc cac aag acg tcc tac tat      432
Ala Trp Ile Phe Tyr Tyr Lys Glu Asp Ala His Lys Thr Ser Tyr Tyr
130       135       140

tac aac atc ctc ttc gcc atc cag gac gaa gag acg ggt ggc gtg atg      480
Tyr Asn Ile Leu Phe Ala Ile Gln Asp Glu Glu Thr Gly Gly Val Met
145       150       155       160

gcc acg ctg ccc atc gcc ttc gac atc agt gtg gac atc gag aag gag      528
Ala Thr Leu Pro Ile Ala Phe Asp Ile Ser Val Asp Ile Glu Lys Glu
165       170       175

aag gtc ctg ttc gtg acc atc aag gac act gag aat tac gcc gtc acc      576
Lys Val Leu Phe Val Thr Ile Lys Asp Thr Glu Asn Tyr Ala Val Thr
180       185       190

gtc aag gcg atc aac gtg gtc cag gca ctc cag tct agc agg gat tct      624
Val Lys Ala Ile Asn Val Val Gln Ala Leu Gln Ser Ser Arg Asp Ser
195       200       205

aag gtg gtt gat gcg ttc aaa tcg cca cgg cac tta ccc cgg aag agg      672
Lys Val Val Asp Ala Phe Lys Ser Pro Arg His Leu Pro Arg Lys Arg
210       215       220

cat acc att tgc tct aac tcg tga tga      699
His Thr Ile Cys Ser Asn Ser
225       230

```

<210> 18

38-21 (53327) B SEQ LISTING.ST25.txt

<211> 231
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Synthetic Construct

 <400> 18
 Met Phe Phe Asn Arg Val Ile Thr Leu Thr Val Pro Ser Ser Asp Val
 1 5 10 15

 Val Asn Tyr Ser Glu Ile Tyr Gln Val Ala Pro Gln Tyr Val Asn Gln
 20 25 30

 Ala Leu Thr Leu Ala Lys Tyr Phe Gln Gly Ala Ile Asp Gly Ser Thr
 35 40 45

 Leu Arg Phe Asp Phe Glu Lys Ala Leu Gln Ile Ala Asn Asp Ile Pro
 50 55 60

 Gln Ala Ala Val Val Asn Thr Leu Asn Gln Thr Val Gln Gln Gly Thr
 65 70 75 80

 Val Gln Val Ser Val Met Ile Asp Lys Ile Val Asp Ile Met Lys Asn
 85 90 95

 Val Leu Ser Ile Val Ile Asp Asn Lys Lys Phe Trp Asp Gln Val Thr
 100 105 110

 Ala Ala Ile Thr Asn Thr Phe Thr Asn Leu Asn Ser Gln Glu Ser Glu
 115 120 125

 Ala Trp Ile Phe Tyr Tyr Lys Glu Asp Ala His Lys Thr Ser Tyr Tyr
 130 135 140

 Tyr Asn Ile Leu Phe Ala Ile Gln Asp Glu Glu Thr Gly Gly Val Met
 145 150 155 160

 Ala Thr Leu Pro Ile Ala Phe Asp Ile Ser Val Asp Ile Glu Lys Glu
 165 170 175

 Lys Val Leu Phe Val Thr Ile Lys Asp Thr Glu Asn Tyr Ala Val Thr
 180 185 190

 Val Lys Ala Ile Asn Val Val Gln Ala Leu Gln Ser Ser Arg Asp Ser
 195 200 205

 Lys Val Val Asp Ala Phe Lys Ser Pro Arg His Leu Pro Arg Lys Arg
 210 215 220

 His Thr Ile Cys Ser Asn Ser
 225 230

 <210> 19
 <211> 657
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> synthetic sequence for expression of TIC812 in planta

 <220>

79

38-21 (53327) B SEQ LISTING.ST25.txt

```
<221> CDS
<222> (1)..(657)
<223> TIC812

<400> 19
atg agc aaa gaa atc agg ctc aac ctt tct cgt gag agc ggc gcc gac      48
Met Ser Lys Glu Ile Arg Leu Asn Leu Ser Arg Glu Ser Gly Ala Asp
1          5          10          15

ctg tac ctc aag atc ctc gcc ttc gtg aag ccc gag cac ttc ttt cag      96
Leu Tyr Leu Lys Ile Leu Ala Phe Val Lys Pro Glu His Phe Phe Gln
          20          25          30

gcg tac ctc ctg tgc cgc gag ttc gag agc atc gtg gat cct aca acc      144
Ala Tyr Leu Leu Cys Arg Glu Phe Glu Ser Ile Val Asp Pro Thr Thr
          35          40          45

cgc gag ctg gac ttc gac aag acg ctg acc atc gtg aag tcg gac tcc      192
Arg Glu Leu Asp Phe Asp Lys Thr Leu Thr Ile Val Lys Ser Asp Ser
          50          55          60

acc ctc gtg acc gtg ggc acg atg aac acc aag ctg gtc aat agc caa      240
Thr Leu Val Thr Val Gly Thr Met Asn Thr Lys Leu Val Asn Ser Gln
65          70          75          80

gag atc ctc gtg tcg gac ttg atc aag caa gtc ggt tcc cag atc gcc      288
Glu Ile Leu Val Ser Asp Leu Ile Lys Gln Val Gly Ser Gln Ile Ala
          85          90          95

gat acc ctc ggc atc acg gac atc gac gcc aac acc cag caa agg ctc      336
Asp Thr Leu Gly Ile Thr Asp Ile Asp Ala Asn Thr Gln Gln Arg Leu
          100          105          110

acg gag ctg atc gag aac ctc ttc gtg aac ctc aat tcc caa gtt cag      384
Thr Glu Leu Ile Glu Asn Leu Phe Val Asn Leu Asn Ser Gln Val Gln
          115          120          125

gac tac atc tac ttc tac gag gag aag gag aag cag acc tcc tac cgc      432
Asp Tyr Ile Tyr Phe Tyr Glu Glu Lys Glu Lys Gln Thr Ser Tyr Arg
          130          135          140

tac aac atc ctc ttc gtg ttc gaa aag gag tcg ttc atc acc att ctg      480
Tyr Asn Ile Leu Phe Val Phe Glu Lys Glu Ser Phe Ile Thr Ile Leu
          145          150          155          160

cca atg ggc ttc gac gtg acc gtg aac acg aac aag gag gcc gtc ctg      528
Pro Met Gly Phe Asp Val Thr Val Asn Thr Asn Lys Glu Ala Val Leu
          165          170          175

aag ctg acc ccg aag gac aag gtt acc tac ggc cac gtc agc gtc aag      576
Lys Leu Thr Pro Lys Asp Lys Val Thr Tyr Gly His Val Ser Val Lys
          180          185          190

gcc ctc aac atc atc cag ttc att acg gag gac aag ctc aac ttc ctc      624
Ala Leu Asn Ile Ile Gln Phe Ile Thr Glu Asp Lys Leu Asn Phe Leu
          195          200          205

gca acc ctc aag aag gct ctc aag acc ctg tga      657
Ala Thr Leu Lys Lys Ala Leu Lys Thr Leu
          210          215

<210> 20
<211> 218
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Construct

<400> 20
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
```

38-21 (53327) B SEQ LISTING.ST25.txt

Ala Tyr Leu Leu Cys Arg Glu Phe Glu Ser Ile Val Asp Pro Thr Thr
35 40 45

Arg Glu Leu 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 Lys Gln Val Gly Ser Gln Ile Ala
85 90 95

Asp Thr Leu Gly Ile Thr Asp Ile Asp Ala Asn Thr Gln Gln Arg Leu
100 105 110

Thr Glu Leu Ile Glu Asn Leu Phe Val Asn Leu Asn Ser Gln Val Gln
115 120 125

Asp 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 Phe Ile Thr Glu Asp Lys Leu Asn Phe Leu
195 200 205

Ala Thr Leu Lys Lys Ala Leu Lys Thr Leu
210 215

<210> 21
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic sequence; thermal amplification primer

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(22)
<223> thermal amplification primer; pr370

<400> 21
cctacttaac ccgcttatag ag

22

<210> 22
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic sequence; thermal amplification primer

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(21)

38-21 (53327) B SEQ LISTING.ST25.txt

<223> thermal amplification primer; pr371

<400> 22
cagtaccatc ttcagatgtg g 21

<210> 23
<211> 49
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic sequence; thermal amplification primer

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(49)
<223> thermal amplification primer; pr375

<400> 23
gactagtaat gagtaaagaa attcggttaa atttgagtag agaatacagg 49

<210> 24
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic sequence; thermal amplification primer

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(30)
<223> thermal amplification primer; pr376

<400> 24
aactcgagcc tacttaaccc gcttatagag 30

<210> 25
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic sequence; thermal amplification primer

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(35)
<223> thermal amplification primer; pr365

<400> 25
aactcgagtc catttagtgc ttccccataa cagcc 35

<210> 26
<211> 43
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic sequence; thermal amplification primer

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(43)
<223> thermal amplification primer; pr372

<400> 26
aacctaggat gttctttaat cgcgttatta cattaacagt acc 43

<210> 27

38-21 (53327) B SEQ LISTING.ST25.txt

<211> 49
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic sequence; thermal amplification primer

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(49)
<223> thermal amplification primer; pr421

<400> 27
gcctaggat gagtaaagaa attcgtttaa atttgagtag agaatcagg 49

<210> 28
<211> 4257
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic sequence; pMON64138 expression cassettes encoding TIC89
and TIC810

<220>
<221> misc_feature
<223> pMON64138 first and second plant expression cassettes

<220>
<221> promoter
<222> (1)..(614)
<223> e35S

<220>
<221> 5'UTR
<222> (650)..(710)
<223> Wheat CAB leader

<220>
<221> Intron
<222> (727)..(1206)
<223> rice actin

<220>
<221> CDS
<222> (1216)..(1917)
<223> TIC809

<220>
<221> terminator
<222> (1921)..(2130)
<223> Wheat Hsp17

<220>
<221> promoter
<222> (2168)..(2781)
<223> CaMV 35S enh

<220>
<221> 5'UTR
<222> (2817)..(2877)
<223> Wheat CAB leader

<220>
<221> Intron
<222> (2894)..(3373)
<223> rice actin

<220>
<221> CDS
<222> (3383)..(4042)
<223> TIC810

<220>
<221> terminator
<222> (4048)..(4257)

38-21 (53327) B SEQ LISTING.ST25.txt

<223> Wheat Hsp17

<400> 28

ggtccgatgt gagacttttc aacaaagggg aatatccgga aacctcctcg gattccattg 60

cccagctatc tgtcacttta ttgtgaagat agtggaaaag gaagggtggt cctacaaatg 120

ccatcattgc gataaaggaa aggccatcgt tgaagatgcc tctgccgaca gtgggtcccaa 180

agatggaccc ccaccacga ggagcatcgt gaaaaaagaa gacgttccaa ccacgtcttc 240

aaagcaagtg gattgatgtg atggtccgat gtgagacttt tcaacaaagg gtaatatccg 300

gaaacctcct cggattccat tgcccagcta tctgtcactt tattgtgaag atagtggaaa 360

aggaaggtgg ctccatacaa tgccatcatt gcgataaagg aaaggccatc gttgaagatg 420

cctctgccga cagtgggtccc aaagatggac cccacccac gaggagcatc gtggaaaaag 480

aagacgttcc aaccacgtct tcaaagcaag tggattgatg tgatatctcc actgacgtaa 540

gggatgacgc acaatccac tatccttcgc aagacccttc ctctatataa ggaagttcat 600

ttcatttga gaggacacgc tgacaagctg actctagcag atcctctaga accatcttcc 660

acacactcaa gccacactat tggagaacac acagggacaa cacaccataa gatccaaggg 720

aggcctccgc cgccgccgtt aaccaccccg cccctctcct ctttctttct ccgttttttt 780

ttccgtctcg gtctcgatct ttggccttgg tagtttgggt gggcgagagg cggcttcgtg 840

cgcgccaga tcggtgcgcg ggaggggscg gatctcgcg ctggggctct cgccggcgtg 900

gatccggccc ggatctcgcg gggaatgggg ctctcggatg tagatctgcg atccgccgtt 960

gttgggggag atgatggggg gtttaaaatt tccgccgtgc taaacaagat caggaagagg 1020

ggaaaagggc actatggttt atatttttat atatttctgc tgcttcgtca ggcttagatg 1080

tgctagatct ttctttcttc tttttgtggg tagaatttga atccctcagc attgttcac 1140

ggtagttttt cttttcatga tttgtgacaa atgcagcctc gtgcggagct tttttgtagg 1200

tagaagtgat caacc atg gcc ttc ttc aac cgg gtg atc acc ctc acg gtg 1251

Met Ala Phe Phe Asn Arg Val Ile Thr Leu Thr Val

1 5 10

ccg tcg tca gac gtg gtc aac tac tcg gag atc tac cag gtg gct cct 1299

Pro Ser Ser Asp Val Val Asn Tyr Ser Glu Ile Tyr Gln Val Ala Pro

15 20 25

cag tat gtc aac cag gcc ctg acc ctg gcc aag tac ttc cag gcc gcc 1347

Gln Tyr Val Asn Gln Ala Leu Thr Leu Ala Lys Tyr Phe Gln Gly Ala

30 35 40

atc gac gcc agc acc ctg agg ttc gac ttc gag aag gcg tta cag atc 1395

Ile Asp Gly Ser Thr Leu Arg Phe Asp Phe Glu Lys Ala Leu Gln Ile

45 50 55 60

gcc aac gac atc ccg cag gcc gcg gtg gtc aac acc ctg aac cag acc 1443

Ala Asn Asp Ile Pro Gln Ala Ala Val Val Asn Thr Leu Asn Gln Thr

65 70 75

gtc cag cag ggg acc gtc cag gtc agc gtc atg atc gac aag atc gtg 1491

Val Gln Gln Gly Thr Val Gln Val Ser Val Met Ile Asp Lys Ile Val

80 85 90

gac atc atg aag aat gtc ctg tcc atc gtg ata gac aac aag aag ttt 1539

Asp Ile Met Lys Asn Val Leu Ser Ile Val Ile Asp Asn Lys Lys Phe

95 100 105

tgg gat cag gtc acg gct gcc atc acc aac acc ttc acg aac ctg aac 1587

Trp Asp Gln Val Thr Ala Ala Ile Thr Asn Thr Phe Thr Asn Leu Asn

110 115 120

agc cag gag tcg gag gcc tgg atc ttc tat tac aag gag gac gcc cac 1635

Ser Gln Glu Ser Glu Ala Trp Ile Phe Tyr Tyr Lys Glu Asp Ala His

125 130 135 140

38-21 (53327) B SEQ LISTING.ST25.txt
aag acg tcc tac tat tac aac atc ctc ttc gcc atc cag gac gaa gag 1683
Lys Thr Ser Tyr Tyr Tyr Asn Ile Leu Phe Ala Ile Gln Asp Glu Glu
145 150 155
acg ggt ggc gtg atg gcc acg ctg ccc atc gcc ttc gac atc agt gtg 1731
Thr Gly Gly Val Met Ala Thr Leu Pro Ile Ala Phe Asp Ile Ser Val
160 165 170
gac atc gag aag gag aag gtc ctg ttc gtg acc atc aag gac act gag 1779
Asp Ile Glu Lys Glu Lys Val Leu Phe Val Thr Ile Lys Asp Thr Glu
175 180 185
aat tac gcc gtc acc gtc aag gcg atc aac gtg gtc cag gca ctc cag 1827
Asn Tyr Ala Val Thr Val Lys Ala Ile Asn Val Val Gln Ala Leu Gln
190 195 200
tct agc agg gat tct aag gtg gtt gat gcg ttc aaa tcg cca cgg cac 1875
Ser Ser Arg Asp Ser Lys Val Val Asp Ala Phe Lys Ser Pro Arg His
205 210 215 220
tta ccc cgg aag agg cat aag att tgc tct aac tcg tga tga 1917
Leu Pro Arg Lys Arg His Lys Ile Cys Ser Asn Ser
225 230
attctgcatg cgtttggacg tatgctcatt caggttggag ccaatttggg tgatgtgtgt 1977
gcgagttctt gcgagttctga tgagacatct ctgtattgtg tttctttccc cagtgttttc 2037
tgtacttgtg taatcggcta atcgccaaca gattcggcga tgaataaatg agaaataaat 2097
tgtttctgatt ttgagtga aaaaaaagga attagatctg tgtgtgtttt ttggatcccc 2157
agcttctgca ggtccgatgt gagacttttc aacaaagggt aatatccgga aacctcctcg 2217
gattccattg cccagctatc tgtcacttta ttgtgaagat agtggaaaag gaaggtggct 2277
cctacaaatg ccatcattgc gataaaggaa aggccatcgt tgaagatgcc tctgccgaca 2337
gtgggtcccaa agatggaccc ccaccacga ggagcatcgt ggaaaaagaa gacgttccaa 2397
ccacgtcttc aaagcaagtg gattgatgtg atggtccgat gtgagacttt tcaacaaagg 2457
gtaatatccg gaaacctcct cggattccat tgcccagcta tctgtcactt tattgtgaag 2517
atagtggaaa aggaaggtgg ctctacaaa tgccatcatt gcgataaagg aaagggcatc 2577
gttgaagatg cctctgccga cagtgggtccc aaagatggac cccacccac gaggagcatc 2637
gtggaaaaag aagacgttcc aaccacgtct tcaaagcaag tggattgatg tgatatctcc 2697
actgacgtaa gggatgacgc acaatccac tacccttcgc aagacccttc ctctatataa 2757
ggaagtcat ttcatttga gaggacacgc tgacaagctg actctagcag atcctctaga 2817
accatcttcc acacactcaa gccacactat tggagaacac acagggacaa cacaccataa 2877
gatccaaggg aggcctccgc cgcgcgggt aaccacccc cccctctcct ctttctttct 2937
ccgttttttt ttccgtctcg gtctcgatct ttggccttgg tagtttgggt gggcgagagg 2997
cggcttcgtg cgcgccaga tcggtgcgcg ggaggggagg gatctcgcg ctggggctct 3057
cgccggcgtg gatecggccc ggtctcgcg gggaatggg ctctcgatg tagatctgcg 3117
atccgcccgtt gttgggggag atgatggggg gtttaaaatt tccgccgtgc taaacaagat 3177
caggaagagg gaaaaaggc actatggttt atatttttat atatttctgc tgcttcgtca 3237
ggcttagatg tgctagatct ttctttcttc tttttgtggg tagaatttga atccctcagc 3297
attgttcacg ggtagttttt cttttcatga ttgtgacaa atgcagctc gtgcggagct 3357
ttttgttagg tagaagtgat caacc atg agc aaa gaa atc agg ctc aac ctt 3409
Met Ser Lys Glu Ile Arg Leu Asn Leu
235 240
tct cgt gag agc ggc gcc gac ctg tac ctc aag atc ctc gcc ttc gtg 3457
Ser Arg Glu Ser Gly Ala Asp Leu Tyr Leu Lys Ile Leu Ala Phe Val
245 250 255

38-21 (53327) B SEQ LISTING.ST25.txt

aag ccc gag cac ttc ttt cag gcg tac ctc ctg tgc cgc gag ttc gag 3505
Lys Pro Glu His Phe Phe Gln Ala Tyr Leu Leu Cys Arg Glu Phe Glu
260 265 270

agc atc gtg gat cct aca acc cgc gag tct gac ttc gac aag acg ctg 3553
Ser Ile Val Asp Pro Thr Thr Arg Glu Ser Asp Phe Asp Lys Thr Leu
275 280 285

acc atc gtg aag tcg gac tcc acc ctc gtg acc gtg ggc acg atg aac 3601
Thr Ile Val Lys Ser Asp Ser Thr Leu Val Thr Val Gly Thr Met Asn
290 295 300 305

acc aag ctg gtc aat agc caa gag atc ctc gtg tcg gac ttg atc act 3649
Thr Lys Leu Val Asn Ser Gln Glu Ile Leu Val Ser Asp Leu Ile Thr
310 315 320

caa gtc ggt tcc cag atc gcc gat acc ctc ggc atc acg gac atc gac 3697
Gln Val Gly Ser Gln Ile Ala Asp Thr Leu Gly Ile Thr Asp Ile Asp
325 330 335

gcc aac acc cag caa cag ctc acg gag ctg atc ggc aac ctc ttc gtg 3745
Ala Asn Thr Gln Gln Gln Leu Thr Glu Leu Ile Gly Asn Leu Phe Val
340 345 350

aac ctc aat tcc caa gtt cag gag tac atc tac ttc tac gag gag aag 3793
Asn Leu Asn Ser Gln Val Gln Glu Tyr Ile Tyr Phe Tyr Glu Glu Lys
355 360 365

gag aag cag acc tcc tac cgc tac aac atc ctc ttc gtg ttc gaa aag 3841
Glu Lys Gln Thr Ser Tyr Arg Tyr Asn Ile Leu Phe Val Phe Glu Lys
370 375 380 385

gag tcg ttc atc acc att ctg cca atg ggc ttc gac gtg acc gtg aac 3889
Glu Ser Phe Ile Thr Ile Leu Pro Met Gly Phe Asp Val Thr Val Asn
390 395 400

acg aac aag gag gcc gtc ctg aag ctg acc ccg aag gac aag gtt acc 3937
Thr Asn Lys Glu Ala Val Leu Lys Leu Thr Pro Lys Asp Lys Val Thr
405 410 415

tac ggc cac gtc agc gtc aag gcc ctc aac atc atc cag ctc att acg 3985
Tyr Gly His Val Ser Val Lys Ala Leu Asn Ile Ile Gln Leu Ile Thr
420 425 430

gag gac aag ttc aac ttc ctc gca acc ctc aag aag gct ctc aag acc 4033
Glu Asp Lys Phe Asn Phe Leu Ala Thr Leu Lys Lys Ala Leu Lys Thr
435 440 445

ctg tga tga gaattctgca tgcgtttgga cgtatgctca ttcaggttg 4082
Leu
450

agccaatttg gttgatgtgt gtgcgagttc ttgcgagtct gatgagacat ctctgtattg 4142

tgtttctttc cccagtgttt tctgtacttg tgtaatcggc taatcgccaa cagattcggc 4202

gatgaataaa tgagaaataa attgttctga ttttgagtgc aaaaaaaaag gaatt 4257

<210> 29
<211> 232
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Construct

<400> 29

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

38-21 (53327) B SEQ LISTING.ST25.txt

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> 30
<211> 218
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Construct

<400> 30

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

38-21 (53327) B SEQ LISTING.ST25.txt

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> 31
<211> 5079
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic sequence; expression cassettes encoding TIC809 and
TIC810 in pMON64139

<220>
<221> misc_feature
<223> pMON64139

<220>
<221> promoter
<222> (1)..(614)
<223> e35S

<220>
<221> 5'UTR
<222> (650)..(710)
<223> Wheat CAB leader

<220>
<221> Intron
<222> (727)..(1206)
<223> rice actin (Exon 727-738; intron 739-1199; Exon 1200-1206)

<220>
<221> transit_peptide
<222> (1230)..(1370)
<223> Maize SSU-signal

<220>
<221> Intron
<222> (1231)..(1539)
<223> Zm RbcS

<220>
<221> transit_peptide

38-21 (53327) B SEQ LISTING.ST25.txt

```

<222> (1540)..(1626)
<223> Zm RbcS

<220>
<221> CDS
<222> (1627)..(2328)
<223> TIC809

<220>
<221> terminator
<222> (2332)..(2541)
<223> Wheat Hsp17

<220>
<221> promoter
<222> (2579)..(3192)
<223> CaMV 35S enh

<220>
<221> 5'UTR
<222> (3228)..(3288)
<223> Wheat CAB leader

<220>
<221> Intron
<222> (3305)..(3784)
<223> Rice actin (Exon 3305-3316; intron 3317-3777; Exon 3778-3784)

<220>
<221> transit_peptide
<222> (3808)..(3948)
<223> Maize SSU - signal

<220>
<221> Intron
<222> (3949)..(4117)
<223> Zm RbcS

<220>
<221> transit_peptide
<222> (4118)..(4204)
<223> Zm RbcS

<220>
<221> CDS
<222> (4205)..(4864)
<223> TIC810

<220>
<221> terminator
<222> (4870)..(5079)
<223> Wheat Hsp17

<400> 31
ggtccgatgt gagacttttc aacaaagggt aatatccgga aacctcctcg gattccattg 60
cccagctatc tgtcacttta ttgtgaagat agtggaaaag gaagggtggct cctacaaatg 120
ccatcattgc gataaaggaa aggccatcgt tgaagatgcc tctgccgaca gtgggtccaa 180
agatggaccc ccaccacga ggagcatcgt ggaaaaagaa gacgttccaa ccacgtcttc 240
aaagcaagtg gattgatgtg atgggtccgat gtgagacttt tcaacaaagg gtaatatccg 300
gaaacctcct cggattccat tgcccagcta tctgtcactt tattgtgaag atagtggaaa 360
aggaaggtgg ctctacaaa tgccatcatt gcgataaagg aaaggccatc gttgaagatg 420
cctctgccga cagtgtgcc aaagatggac cccacccac gaggagcatc gtggaaaaag 480
aagacgttcc aaccacgtct tcaaagcaag tggattgatg tgatatctcc actgacgtaa 540
gggatgacgc acaatccac tatccttcgc aagacccttc ctctatataa ggaagtcat 600
ttcatttgga gaggacacgc tgacaagctg actctagcag atcctctaga accatcttcc 660
acacactcaa gccacactat tggagaacac acagggacaa cacaccataa gatccaaggg 720
aggcctccgc cgccgccggt aaccaccccg cccctctcct ctttctttct ccgttttttt 780

```

38-21 (53327) B SEQ LISTING.ST25.txt

```

ttccgtctcg gtctcgatct ttggccttgg tagtttgggt gggcgagagg cggcttcgtg      840
cgcgccccaga tcggtgcgcg ggaggggcgg gatctcgcgg ctggggctct cgccggcgtg      900
gatccggccc ggatctcgcg gggaatgggg ctctcggatg tagatctgcg atccgccgtt      960
gttgggggag atgatggggg gtttaaaatt tccgccgtgc taaacaagat caggaagagg     1020
ggaaaagggc actatggttt atatttttat atatttctgc tgcttcgtca ggcttagatg     1080
tgctagatct ttctttcttc tttttgtggg tagaatttga atccctcagc attgttcac      1140
ggtagttttt cttttcatga tttgtgacaa atgcagcctc gtgcggagct ttttttagg      1200
tagaagtgat caacctctag aggatcagca tggcgccac cgtgatgatg gcctcgtcgg      1260
ccaccgccgt cgctccgttc ctggggctca agtccaccgc cagcctcccc gtcgcccgcc      1320
gctcctccag aagcctcggc aacgtcagca acggcggaag gatccggtgc atgcaggtaa      1380
caaatgcac ctagctagta gttctttgca ttgcagcagc tqcagctagc gagttagtaa      1440
taggaaggga actgatgatc catgcatgga ctgatgtgtg ttgccatcc catcccatcc      1500
catttcccaa acgaaccgaa aacaccgtac tacgtgcagg tgtggcccta cggcaacaag      1560
aagttcgaga cgctgtcgta cctgccgccg ctgtcgaccg gcgggcgcat ccgtgcatg      1620
caggcc atg gcc ttc ttc aac cgg gtg atc acc ctc acg gtg ccg tcg      1668
Met Ala Phe Phe Asn Arg Val Ile Thr Leu Thr Val Pro Ser
1      5      10

tca gac gtg gtc aac tac tcg gag atc tac cag gtg gct cct cag tat      1716
Ser Asp Val Val Asn Tyr Ser Glu Ile Tyr Gln Val Ala Pro Gln Tyr
15     20     25     30

gtc aac cag gcc ctg acc ctg gcc aag tac ttc cag ggc gcc atc gac      1764
Val Asn Gln Ala Leu Thr Leu Ala Lys Tyr Phe Gln Gly Ala Ile Asp
35     40     45

ggc agc acc ctg agg ttc gac ttc gag aag gcg tta cag atc gcc aac      1812
Gly Ser Thr Leu Arg Phe Asp Phe Glu Lys Ala Leu Gln Ile Ala Asn
50     55     60

gac atc ccg cag gcc gcg gtg gtc aac acc ctg aac cag acc gtc cag      1860
Asp Ile Pro Gln Ala Ala Val Val Asn Thr Leu Asn Gln Thr Val Gln
65     70     75

cag ggg acc gtc cag gtc agc gtc atg atc gac aag atc gtg gac atc      1908
Gln Gly Thr Val Gln Val Ser Val Met Ile Asp Lys Ile Val Asp Ile
80     85     90

atg aag aat gtc ctg tcc atc gtg ata gac aac aag aag ttt tgg gat      1956
Met Lys Asn Val Leu Ser Ile Val Ile Asp Asn Lys Lys Phe Trp Asp
95     100    105    110

cag gtc acg gct gcc atc acc aac acc ttc acg aac ctg aac agc cag      2004
Gln Val Thr Ala Ala Ile Thr Asn Thr Phe Thr Asn Leu Asn Ser Gln
115    120    125

gag tcg gag gcc tgg atc ttc tat tac aag gag gac gcc cac aag acg      2052
Glu Ser Glu Ala Trp Ile Phe Tyr Tyr Lys Glu Asp Ala His Lys Thr
130    135    140

tcc tac tat tac aac atc ctc ttc gcc atc cag gac gaa gag acg ggt      2100
Ser Tyr Tyr Tyr Asn Ile Leu Phe Ala Ile Gln Asp Glu Glu Thr Gly
145    150    155

ggc gtg atg gcc acg ctg ccc atc gcc ttc gac atc agt gtg gac atc      2148
Gly Val Met Ala Thr Leu Pro Ile Ala Phe Asp Ile Ser Val Asp Ile
160    165    170

gag aag gag aag gtc ctg ttc gtg acc atc aag gac act gag aat tac      2196
Glu Lys Glu Lys Val Leu Phe Val Thr Ile Lys Asp Thr Glu Asn Tyr
175    180    185    190

gcc gtc acc gtc aag gcg atc aac gtg gtc cag gca ctc cag tct agc      2244
Ala Val Thr Val Lys Ala Ile Asn Val Val Gln Ala Leu Gln Ser Ser

```

38-21 (53327) B SEQ LISTING.ST25.txt															
195					200					205					
agg gat tct aag gtg gtt gat gcg ttc aaa tcg cca cgg cac tta ccc															2292
Arg Asp Ser Lys Val Val Asp Ala Phe Lys Ser Pro Arg His Leu Pro															
	210												220		
cgg aag agg cat aag att tgc tct aac tcg tga tga attctgcatg															2338
Arg Lys Arg His Lys Ile Cys Ser Asn Ser															
	225				230										
cgtttggacg tatgctcatt caggttggag ccaatttggg tgatgtgtgt gcgagttctt															2398
gcgagtctga tgagacatct ctgtattgtg tttctttccc cagtgttttc tgtacttgtg															2458
taatcggcta atcgccaaca gattcggcga tgaataaatg agaaataaat tgttctgatt															2518
ttgagtgcaa aaaaaaagga attagatctg tgttgtttt ttggatcccc agcttctgca															2578
ggtcogatgt gagacttttc aacaaagggg aatatccgga aacctcctcg gattccattg															2638
cccagctatc tgtcacttta ttgtgaagat agtggaaaag gaaggtgggt cctacaaatg															2698
ccatcattgc gataaaggaa aggccatcgt tgaagatgcc tctgccgaca gtgggtcccaa															2758
agatggaccc ccaccacga ggagcatcgt ggaaaaagaa gacgttccaa ccacgtcttc															2818
aaagcaagtg gattgatgtg atgggtccgat gtgagacttt tcaacaaagg gtaatatccg															2878
gaaacctcct cggattccat tgccagcta tctgtcactt tattgtgaag atagtggaaa															2938
aggaaggtgg ctctacaaa tgccatcatt gcgataaagg aaaggccatc gttgaagatg															2998
cctctgccga cagtgggtccc aaagatggac cccacccac gaggagcatc gtggaaaaag															3058
aagacgttcc aaccacgtct tcaaagcaag tggattgatg tgatatctcc actgacgtaa															3118
gggatgacgc acaatccac tatccttcgc aagacccttc ctctatataa ggaagttcat															3178
ttcatttga gaggacacgc tgacaagctg actctagcag atcctctaga accatcttcc															3238
acacactcaa gccacactat tggagaacac acagggacaa cacaccataa gatccaaggg															3298
aggcctccgc cgccgccggt aaccaccccg cccctctcct ctttctttct ccgttttttt															3358
ttccgtctcg gtctcgatct ttggccttgg tagtttgggt gggcgagagg cggcttcgtg															3418
cgcgccaga tcggtgcgcg ggaggggcgg gatctcgcgg ctggggctct cgccggcggtg															3478
gatccggccc ggatctcgcg gggaatgggg ctctcggtatg tagatctgcg atccgccgtt															3538
gttgggggag atgatggggg gtttaaaatt tccgccgtgc taaacaagat caggaagagg															3598
ggaaaagggc actatggttt atatttttat atatttctgc tgcttcgtca ggcttagatg															3658
tgctagatct ttctttcttc tttttgtgg tagaatttga atccctcagc attgttcac															3718
ggtagttttt cttttcatga ttgtgacaa atgcagcctc gtgcggagct tttttgtagg															3778
tagaagtgat caacctctag aggatcagca tggcgccac cgtgatgatg gcctcgtcgg															3838
ccaccgccgt cgctccgttc ctggggctca agtccaccgc cagcctcccc gtcgccgcc															3898
gtcctccag aagcctcggc aacgtcagca acggcggaag gatccggtgc atgcaggtaa															3958
caaatgcac ctagctagta gttctttgca ttgcagcagc tgcagctagc gagttagtaa															4018
taggaaggga actgatgatc catgcatgga ctgatgtgtg ttgccatcc catcccatcc															4078
catttcccaa acgaaccgaa aacaccgtac tacgtgcagg tgtggcccta cggcaacaag															4138
aagttcgaga cgctgtcgt cctgccgccg ctgtcgaccg gcgggcgcat ccgctgcatg															4198
caggcc atg agc aaa gaa atc agg ctc aac ctt tct cgt gag agc ggc															4246
Met Ser Lys Glu Ile Arg Leu Asn Leu Ser Arg Glu Ser Gly															
	235				240				245						
gcc gac ctg tac ctc aag atc ctc gcc ttc gtg aag ccc gag cac ttc															4294
Ala Asp Leu Tyr Leu Lys Ile Leu Ala Phe Val Lys Pro Glu His Phe															
	250				255				260						

38-21 (53327) B SEQ LISTING.ST25.txt

```

ttt cag gcg tac ctc ctg tgc cgc gag ttc gag agc atc gtg gat cct 4342
Phe Gln Ala Tyr Leu Leu Cys Arg Glu Phe Glu Ser Ile Val Asp Pro
265 270 275

aca acc cgc gag tct gac ttc gac aag acg ctg acc atc gtg aag tcg 4390
Thr Thr Arg Glu Ser Asp Phe Asp Lys Thr Leu Thr Ile Val Lys Ser
280 285 290

gac tcc acc ctc gtg acc gtg ggc acg atg aac acc aag ctg gtc aat 4438
Asp Ser Thr Leu Val Thr Val Gly Thr Met Asn Thr Lys Leu Val Asn
295 300 305 310

agc caa gag atc ctc gtg tcg gac ttg atc act caa gtc ggt tcc cag 4486
Ser Gln Glu Ile Leu Val Ser Asp Leu Ile Thr Gln Val Gly Ser Gln
315 320 325

atc gcc gat acc ctc ggc atc acg gac atc gac gcc aac acc cag caa 4534
Ile Ala Asp Thr Leu Gly Ile Thr Asp Ile Asp Ala Asn Thr Gln Gln
330 335 340

cag ctc acg gag ctg atc ggc aac ctc ttc gtg aac ctc aat tcc caa 4582
Gln Leu Thr Glu Leu Ile Gly Asn Leu Phe Val Asn Leu Asn Ser Gln
345 350 355

gtt cag gag tac atc tac ttc tac gag gag aag gag aag cag acc tcc 4630
Val Gln Glu Tyr Ile Tyr Phe Tyr Glu Glu Lys Glu Lys Gln Thr Ser
360 365 370

tac cgc tac aac atc ctc ttc gtg ttc gaa aag gag tcg ttc atc acc 4678
Tyr Arg Tyr Asn Ile Leu Phe Val Phe Glu Lys Glu Ser Phe Ile Thr
375 380 385 390

att ctg cca atg ggc ttc gac gtg acc gtg aac acg aac aag gag gcc 4726
Ile Leu Pro Met Gly Phe Asp Val Thr Val Asn Thr Asn Lys Glu Ala
395 400 405

gtc ctg aag ctg acc ccg aag gac aag gtt acc tac ggc cac gtc agc 4774
Val Leu Lys Leu Thr Pro Lys Asp Lys Val Thr Tyr Gly His Val Ser
410 415 420

gtc aag gcc ctc aac atc atc cag ctc att acg gag gac aag ttc aac 4822
Val Lys Ala Leu Asn Ile Ile Gln Leu Ile Thr Glu Asp Lys Phe Asn
425 430 435

ttc ctc gca acc ctc aag aag gct ctc aag acc ctg tga tga 4864
Phe Leu Ala Thr Leu Lys Lys Ala Leu Lys Thr Leu
440 445 450

gaattctgca tgcgtttgga cgtatgctca ttcaggttg agccaatttg gttgatgtgt 4924

gtgcgagttc ttgcgagtct gatgagacat ctctgtattg tgtttctttc cccagtgttt 4984

tctgtacttg tgtaatcggc taatcgccaa cagattcggc gatgaataaa tgagaaataa 5044

attgttctga ttttgagtgc aaaaaaaag gaatt 5079

```

<210> 32
 <211> 232
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic Construct

<400> 32

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

38-21 (53327) B SEQ LISTING.ST25.txt

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> 33
<211> 218
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Construct

<400> 33

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

38-21 (53327) B SEQ LISTING.ST25.txt

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> 34
<211> 2148
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic sequence; expression cassette in pMON70513 encoding
TIC809

<220>
<221> misc feature
<223> pMON70513 plant expression cassette

<220>
<221> promoter
<222> (1)..(614)
<223> e35S

<220>
<221> 5'UTR
<222> (650)..(710)
<223> Wheat CAB leader

<220>
<221> Intron
<222> (727)..(1206)
<223> rice actin

<220>
<221> CDS
<222> (1216)..(1917)
<223> TIC809

<220>
<221> terminator
<222> (1939)..(2148)
<223> Wheat Hsp17

<400> 34
ggtcgatgt gagacttttc aacaaaggg aatatccgga aacctcctcg gattccattg 60
cccagctatc tgtcacttta ttgtgaagat agtggaaaag gaaggtggct cctacaaatg 120

38-21 (53327) B SEQ LISTING.ST25.txt

```

ccatcattgc gataaaggaa aggccatcgt tgaagatgcc tctgccgaca gtggtcccaa 180
agatggaccc ccaccacga ggagcatcgt ggaaaaagaa gacgttccaa ccacgtcttc 240
aaagcaagtg gattgatgtg atggtccgat gtgagacttt tcaacaaagg gtaatatccg 300
gaaacctcct cggattccat tgcccagcta tctgtcactt tattgtgaag atagtggaaa 360
aggaaggtgg ctctacaaa tgccatcatt gcgataaagg aaaggccatc gttgaagatg 420
cctctgccga cagtgggtccc aaagatggac cccacccac gaggagcatc gtggaaaaag 480
aagacgttcc aaccacgtct tcaaagcaag tggattgatg tgatatctcc actgacgtaa 540
gggatgacgc acaatccac tatccttcgc aagacccttc ctctatataa ggaagtccat 600
ttcatttga gaggacacgc tgacaagctg actctagcag atcctctaga accatcttcc 660
acacactcaa gccacactat tggagaacac acagggacaa cacaccataa gatccaaggg 720
aggcctccgc cgccgccggt aaccaccccg cccctctcct ctttctttct ccgttttttt 780
ttccgtctcg gtctcgatct ttggccttgg tagtttgggt gggcgagagg cggcttcgtg 840
cgcgccaga tcggtgcgcg ggaggggagg gatctcgagg ctggggctct cgccggcggtg 900
gatccggccc ggatctcgcg gggaatgggg ctctcgatg tagatctcg atccggcggt 960
gttgggggag atgatggggg gtttaaaatt tccgccgtgc taaacaagat caggaagagg 1020
ggaaaagggc actatggttt atatttttat atatttctgc tgcttcgtca ggcttagatg 1080
tgctagatct ttctttcttc tttttgtggg tagaatttga atccctcagc attgttcac 1140
ggtagttttt cttttcatga tttgtgacaa atgcagcctc gtgcggagct tttttgtagg 1200
tagaagtgat caacc atg gcc ttc ttc aac cgg gtg atc acc ctc acg gtg 1251
          Met Ala Phe Phe Asn Arg Val Ile Thr Leu Thr Val
          1             5             10

ccg tcg tca gac gtg gtc aac tac tcg gag atc tac cag gtg gct cct 1299
Pro Ser Ser Asp Val Val Asn Tyr Ser Glu Ile Tyr Gln Val Ala Pro
          15             20             25

cag tat gtc aac cag gcc ctg acc ctg gcc aag tac ttc cag ggc gcc 1347
Gln Tyr Val Asn Gln Ala Leu Thr Leu Ala Lys Tyr Phe Gln Gly Ala
          30             35             40

atc gac ggc agc acc ctg agg ttc gac ttc gag aag gcg tta cag atc 1395
Ile Asp Gly Ser Thr Leu Arg Phe Asp Phe Glu Lys Ala Leu Gln Ile
          45             50             55             60

gcc aac gac atc ccg cag gcc gcg gtg gtc aac acc ctg aac cag acc 1443
Ala Asn Asp Ile Pro Gln Ala Ala Val Val Asn Thr Leu Asn Gln Thr
          65             70             75

gtc cag cag ggg acc gtc cag gtc agc gtc atg atc gac aag atc gtg 1491
Val Gln Gln Gly Thr Val Gln Val Ser Val Met Ile Asp Lys Ile Val
          80             85             90

gac atc atg aag aat gtc ctg tcc atc gtg ata gac aac aag aag ttt 1539
Asp Ile Met Lys Asn Val Leu Ser Ile Val Ile Asp Asn Lys Lys Phe
          95             100             105

tgg gat cag gtc acg gct gcc atc acc aac acc ttc acg aac ctg aac 1587
Trp Asp Gln Val Thr Ala Ala Ile Thr Asn Thr Phe Thr Asn Leu Asn
          110             115             120

agc cag gag tcg gag gcc tgg atc ttc tat tac aag gag gac gcc cac 1635
Ser Gln Glu Ser Glu Ala Trp Ile Phe Tyr Tyr Lys Glu Asp Ala His
          125             130             135             140

aag acg tcc tac tat tac aac atc ctc ttc gcc atc cag gac gaa gag 1683
Lys Thr Ser Tyr Tyr Tyr Asn Ile Leu Phe Ala Ile Gln Asp Glu Glu
          145             150             155

acg ggt ggc gtg atg gcc acg ctg ccc atc gcc ttc gac atc agt gtg 1731
Thr Gly Gly Val Met Ala Thr Leu Pro Ile Ala Phe Asp Ile Ser Val

```

38-21 (53327) B SEQ LISTING.ST25.txt
165 170

160
gac atc gag aag gag aag gtc ctg ttc gtg acc atc aag gac act gag 1779
Asp Ile Glu Lys Glu Lys Val Leu Phe Val Thr Ile Lys Asp Thr Glu
175 180 185
aat tac gcc gtc acc gtc aag gcg atc aac gtg gtc cag gca ctc cag 1827
Asn Tyr Ala Val Thr Val Lys Ala Ile Asn Val Val Gln Ala Leu Gln
190 195 200
tct agc agg gat tct aag gtg gtt gat gcg ttc aaa tcg cca cgg cac 1875
Ser Ser Arg Asp Ser Lys Val Val Asp Ala Phe Lys Ser Pro Arg His
205 210 215 220
tta ccc cgg aag agg cat aag att tgc tct aac tcg tga tga 1917
Leu Pro Arg Lys Arg His Lys Ile Cys Ser Asn Ser
225 230
attcggatcc aaggcgcaat tctgcatgcg ttggacgta tgctcattca ggttgagacc 1977
aatttggttg atgtgtgtgc gaggcttctgc gaggctgatg agacatctct gtattgtgtt 2037
tctttcccca gtgttttctg tacttgtgta atcggctaata cgccaacaga ttccgcatg 2097
aataaatgag aaataaattg ttctgatttt gaggcagaaa aaaaaggaat t 2148

<210> 35
<211> 232
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Construct

<400> 35

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

96

38-21 (53327) B SEQ LISTING.ST25.txt

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> 36
<211> 2541
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic sequence; expression cassette in pMON70514 encoding
TIC809

<220>
<221> misc feature
<223> pMON70514 plant expression cassette

<220>
<221> promoter
<222> (1)..(614)
<223> o35S

<220>
<221> 5'UTR
<222> (650)..(710)
<223> Wheat CAB leader

<220>
<221> Intron
<222> (727)..(1206)
<223> rice actin

<220>
<221> transit_peptide
<222> (1230)..(1270)
<223> Zm RbcS

<220>
<221> Intron
<222> (1371)..(1539)
<223> Zm RbcS

<220>
<221> transit_peptide
<222> (1540)..(1626)
<223> Zm RbcS

<220>
<221> CDS
<222> (1627)..(2328)
<223> TIC809

<220>
<221> terminator
<222> (2332)..(2541)
<223> Wheat Hsp17

<400> 36
gggtccgatgt gagacttttc aacaaagggt aatatccgga aacctcctcg gattccattg 60
cccagctatc tgtcacttta ttgtgaagat agtggaaaag gaaggtggct cctacaaatg 120
ccatcattgc gataaaggaa aggccatcgt tgaagatgcc tctgccgaca gtggtcccaa 180

38-21 (53327) B SEQ LISTING.ST25.txt
agatggaccc ccacccacga ggagcatcgt ggaaaaagaa gacgttccaa ccacgtcttc 240
aaagcaagtg gattgatgtg atggtccgat gtgagacttt tcaacaaagg gtaatatccg 300
gaaacctcct cggattccat tgcccagcta tctgtcactt tattgtgaag atagtggaaa 360
aggaaggtgg ctccatacaa tgccatcatt gcgataaagg aaaggccatc gttgaagatg 420
cctctgccga cagtgggtccc aaagatggac cccacccac gagagcatc gtggaaaaag 480
aagacgttcc aaccacgtct tcaaagcaag tggattgatg tgatatctcc actgacgtaa 540
gggatgacgc acaatccac tctcttcgc aagacccttc ctctatataa ggaagttcat 600
ttcatttggg gaggacacgc tgacaagctg actctagcag atcctctaga accatcttcc 660
acacactcaa gccacactat tggagaacac acagggacaa cacaccataa gatccaaggg 720
aggcctccgc cgccgccggt aaccaccccg cccctctcct ctttctttct ccgttttttt 780
ttccgtctcg gtctcgatct ttggccttgg tagtttgggt gggcgagagg cggtctcggt 840
cgcgcccgaga tcggtgcgcg ggaggggcgg gatctcgcg ctggggctct cgccggcgtg 900
gatccggccc ggatctcgcg gggaatgggg ctctcggatg tagatctcg atccgccgtt 960
gttgggggag atgatggggg gtttaaaatt tccgccgtgc taaacaagat caggaagagg 1020
ggaaaagggc actatggttt atatttttat atatttctgc tgcttcgtca ggcttagatg 1080
tgctagatct ttctttcttc tttttgtgg tagaatttga atccctcagc attgttcac 1140
ggtagttttt cttttcatga tttgtgacaa atgcagcctc gtgcggagct tttttgtagg 1200
tagaagtgat caacctctag aggatcagca tggcgccac cgtgatgatg gcctcgtcgg 1260
ccaccgccgt cgtccgttc ctggggctca agtccaccgc cagcctcccc gtccgccgcc 1320
gtcctccag aagcctcggc aacgtcagca acggcggaag gatccggtgc atgcaggtaa 1380
caaatgcac cttagctagta gttctttgca ttgcagcagc tgcagctagc gagttagtaa 1440
taggaaggga actgatgac catgcatgga ctgatgtgtg ttgcccatcc catcccatcc 1500
catttcccaa acgaaccgaa aacaccgtac tacgtgcagg tgtggcccta cggcaacaag 1560
aagtccgaga cgtgtcgtg cctgccgccg ctgtcgaccg gcgggcgcat ccgctgcatg 1620
caggcc atg gcc ttc ttc aac cgg gtg atc acc ctc acg gtg ccg tcg 1668
Met Ala Phe Phe Asn Arg Val Ile Thr Leu Thr Val Pro Ser
1 5 10
tca gac gtg gtc aac tac tgc gag atc tac cag gtg gct cct cag tat 1716
Ser Asp Val Val Asn Tyr Ser Glu Ile Tyr Gln Val Ala Pro Gln Tyr
15 20 25 30
gtc aac cag gcc ctg acc ctg gcc aag tac ttc cag ggc gcc atc gac 1764
Val Asn Gln Ala Leu Thr Leu Ala Lys Tyr Phe Gln Gly Ala Ile Asp
35 40 45
ggc agc acc ctg agg ttc gac ttc gag aag gcg tta cag atc gcc aac 1812
Gly Ser Thr Leu Arg Phe Asp Phe Glu Lys Ala Leu Gln Ile Ala Asn
50 55 60
gac atc ccg cag gcc gcg gtg gtc aac acc ctg aac cag acc gtc cag 1860
Asp Ile Pro Gln Ala Ala Val Val Asn Thr Leu Asn Gln Thr Val Gln
65 70 75
cag ggg acc gtc cag gtc agc gtc atg atc gac aag atc gtg gac atc 1908
Gln Gly Thr Val Gln Val Ser Val Met Ile Asp Lys Ile Val Asp Ile
80 85 90
atg aag aat gtc ctg tcc atc gtg ata gac aac aag aag ttt tgg gat 1956
Met Lys Asn Val Leu Ser Ile Val Ile Asp Asn Lys Lys Phe Trp Asp
95 100 105 110
cag gtc acg gct gcc atc acc aac acc ttc acg aac ctg aac agc cag 2004
Gln Val Thr Ala Ala Ile Thr Asn Thr Phe Thr Asn Leu Asn Ser Gln
115 120 125

38-21 (53327) B SEQ LISTING.ST25.txt

gag tcg gag gcc tgg atc ttc tat tac aag gag gac gcc cac aag acg 2052
Glu Ser Glu Ala Trp Ile Phe Tyr Tyr Lys Glu Asp Ala His Lys Thr
130 135 140

tcc tac tat tac aac atc ctc ttc gcc atc cag gac gaa gag acg ggt 2100
Ser Tyr Tyr Tyr Asn Ile Leu Phe Ala Ile Gln Asp Glu Glu Thr Gly
145 150 155

ggc gtg atg gcc acg ctg ccc atc gcc ttc gac atc agt gtg gac atc 2148
Gly Val Met Ala Thr Leu Pro Ile Ala Phe Asp Ile Ser Val Asp Ile
160 165 170

gag aag gag aag gtc ctg ttc gtg acc atc aag gac act gag aat tac 2196
Glu Lys Glu Lys Val Leu Phe Val Thr Ile Lys Asp Thr Glu Asn Tyr
175 180 185 190

gcc gtc acc gtc aag gcg atc aac gtg gtc cag gca ctc cag tct agc 2244
Ala Val Thr Val Lys Ala Ile Asn Val Val Gln Ala Leu Gln Ser Ser
195 200 205

agg gat tct aag gtg gtt gat gcg ttc aaa tcg cca cgg cac tta ccc 2292
Arg Asp Ser Lys Val Val Asp Ala Phe Lys Ser Pro Arg His Leu Pro
210 215 220

cgg aag agg cat aag att tgc tct aac tcg tga tga attctgcatg 2338
Arg Lys Arg His Lys Ile Cys Ser Asn Ser
225 230

cggttgagc tatgtcatt caggttgag ccaatttggg tgatgtgtgt gcgagttctt 2398

gcgagtcctga tgagacatct ctgtattgtg tttctttccc cagtgttttc tgtactgtg 2458

taatcggtcta atcgccaaca gattcggcga tgaataaat agaaataaat tgttctgatt 2518

ttgagtgcaa aaaaaaagga att 2541

<210> 37
<211> 232
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Construct

<400> 37

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

38-21 (53327) B SEQ LISTING.ST25.txt

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> 38
<211> 4083
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic sequence; expression cassette in pMON64144 encoding
TIC809

<220>
<221> misc feature
<223> pMON64144 plant expression cassette

<220>
<221> promoter
<222> (1)..(1844)
<223> rice Rcc3

<220>
<221> 5'UTR
<222> (1845)..(1943)
<223> rice Rcc3

<220>
<221> Intron
<222> (1952)..(2755)
<223> HSP70

<220>
<221> transit_peptide
<222> (2772)..(2912)
<223> Zm RbcS

<220>
<221> Intron
<222> (2913)..(3081)
<223> Zm RbcS

<220>
<221> transit_peptide
<222> (3082)..(3168)
<223> Zm RbcS

<220>
<221> CDS
<222> (3169)..(3870)
<223> TIC809

<220>

38-21 (53327) B SEQ LISTING.ST25.txt

<221> terminator
<222> (3874)..(4083)
<223> Wheat Hsp17

```

<400> 38
gcaatcaacc aacatatact gaatatggga aagtttcttt tagcttttct aaattaagta      60
ctgattctta aacttaagtg agaatctagc ctgttcaggg gcgacggcta aaggacatag      120
caccactagt ctacgcgatt gcaaaaaaga agaatgcaag cctgcaacaa gtatcgcttt      180
cccgaccaat ggttggttga cctcggtttg ccggtaacct caggctggac gacagaacta      240
attagccaac ttgtcaatgt ctagggtgct gttcatagcc tgcagttgac agagtacgaa      300
aaggacaaga tcacatggaa gctaactagt cacggcgaat acatgacgac atcggcctac      360
aacgcacaac ttcttgggcat aaaagcttca atttcaatgc ccctatctgg aagccctagg      420
cgccgcgcaa atgtaaaaca ttcgcttcgc ttggcttggt atccaaaata gagtatggac      480
ctccgacaga ttggcaaccc gtgggtaatc gaaaatggct ccctctgccc ctttgtcgaa      540
ggaatcagga aacggccctc acctcctggc ggagtgtaga tatgtgaaag aatctaggcg      600
acacttgcat actggacaac atgtgaacaa ataagaccaa cgttatggca acaagcctcg      660
acgctactca agtggtggga ggccaccgca tgttccaacg aagcgccaaa gaaagccttg      720
cagactctaa tgctattagt cgcctaggat atttggaatg aaaggaaccg cagagttttt      780
cagcaccaag agcttcgggt ggctagtctg atagccaaaa ttaaggagga tgccaaaaca      840
tggttcttgg cgggcgcgaa acaccttgat aggtggctta ctttttaaca tgttcggggc      900
aaaggccttg agacggtaaa gttttctatt tgcgcttgcg catgtacaat tttattcctc      960
tattcaatga aattgggtgc tcaactgggtc attaaaaaaa aaagaatcta gcctgttcgg      1020
gaagaagagg attttgttcg tgagagagag agagagagag agagagagag agagagagaa      1080
ggaggaggag gattttcagg cttcgcattg cccaacctct gcttctgttg gcccaagaag      1140
aatcccaggc gcccatgggc tggcagttta ccacggacct acctagccta ccttagctat      1200
ctaagcgggc cgacctagta gccacgtgcc tagtgtagat taaagttgcc gggccagcag      1260
gaagccacgc tgcaatggca tcttcccctg tccttcgcgt acgtgaaaac aaaccaggt      1320
aagcttagaa tcttcttgcc cgttggtgct ggacaccac caatcccacc atgccccgat      1380
attcctccgg tctcggttca tgtgatgtcc tctcttgtgt gatcacggag caagcattct      1440
taaacggcaa aagaaaatca ccaacttgct cacgcagtca cgctgcaccg gcggaagcga      1500
cgcccgatag gccaagatcg cgagataaaa taacaaccaa tgatcataag gaaacaagcc      1560
cgcgatgtgt cgtgtgcagc aatcttggtc atttgcgga tcgagtgtt cacagctaac      1620
caaataattc gccgatgatt taacacatta tcagcgtaga tgtacgtacg atttgtaaat      1680
taatctacga gccttgctag ggcagggtgt ctgccagcca atccagatcg cctcgtatg      1740
cacgctcaca tgatggcagg gcagggttca catgagctct aacggctgat taattaatcc      1800
cggggctcga ctataaatac ctccctaata ccatgatcaa aacctctca agcagcctaa      1860
tcattctccag ctgatcaaga gctcttaatt agctagctag tgattagctg cgcttgatg      1920
cgatcgatct cgggtacgta gcaatagatc taccgtcttc ggtacgcgct cactccgccc      1980
tctgcctttg ttactgccac gtttctctga atgctctctt gtgtggtgat tgctgagagt      2040
ggttttagctg gatctagaat tacactctga aatcgtgttc tgcctgtgct gattacttgc      2100
cgtcctttgt agcagcaaaa tatagggaca tggtagtacg aaacgaagat agaacctaca      2160
cagcaatacg agaaatgtgt aatttggtgc ttacgggtat ttatttaagc acatgttgg      2220
    
```

38-21 (53327) B SEQ LISTING.ST25.txt

gttatagggc acttggattc agaagtttgc tgttaattta ggcacaggct tcatactaca 2280
 tgggtcaata gtatagggat tcatattata ggcgatacta taataatttg ttcgtctgca 2340
 gagcttatta tttgcaaaaa ttagatattc ctattctgtt tttgtttgtg tgctgttaaa 2400
 ttgttaacgc ctgaaggaat aaatataaat gacgaaattt tgatgtttat ctctgctcct 2460
 ttattgtgac cataagtcaa gatcagatgc acttgtttta aatattgttg tctgaagaaa 2520
 taagtactga cagtattttg atgcattgat ctgcttgttt gttgtaacaa aatttaaaaa 2580
 taaagagttt cctttttgtt gctctcctta cctcctgatg gtatctagta tctaccaact 2640
 gacactatat tgcttctctt tacatacgtt tcttgctcga tgccttctcc ctagtgttga 2700
 ccagtgttac tcacatagtc tttgctcatt tcattgtaat gcagatacca agcggcctct 2760
 agaggatcag catggcgccc accgtgatga tggcctcgtc ggccaccgcc gtcgctccgt 2820
 tcttggggct caagtccacc gccagcctcc ccgtcgcccg ccgtcctcc agaagcctcg 2880
 gcaacgtcag caacggcgga aggatccggt gcatgcaggt aacaaatgca tcctagctag 2940
 tagttctttg cattgcagca gctgcagcta gcgagttagt aataggaagg gaactgatga 3000
 tccatgcatg gactgatgtg tgttgcccat cccatcccat cccatttccc aaacgaaccg 3060
 aaaacaccgt actacgtgca ggtgtggccc tacggcaaca agaagttcga gacgctgtcg 3120
 tacctgccgc cgctgtcgac cggcgggcgc atccgctgca tgcaggcc atg gcc ttc 3177
 Met Ala Phe
 1
 ttc aac cgg gtg atc acc ctc acg gtg ccg tcg tca gac gtg gtc aac 3225
 Phe Asn Arg Val Ile Thr Leu Thr Val Pro Ser Ser Asp Val Val Asn
 5 10 15
 tac tcg gag atc tac cag gtg gct cct cag tat gtc aac cag gcc ctg 3273
 Tyr Ser Glu Ile Tyr Gln Val Ala Pro Gln Tyr Val Asn Gln Ala Leu
 20 25 30 35
 acc ctg gcc aag tac ttc cag ggc gcc atc gac ggc agc acc ctg agg 3321
 Thr Leu Ala Lys Tyr Phe Gln Gly Ala Ile Asp Gly Ser Thr Leu Arg
 40 45 50
 ttc gac ttc gag aag gcg tta cag atc gcc aac gac atc ccg cag gcc 3369
 Phe Asp Phe Glu Lys Ala Leu Gln Ile Ala Asn Asp Ile Pro Gln Ala
 55 60 65
 gcg gtg gtc aac acc ctg aac cag acc gtc cag cag ggg acc gtc cag 3417
 Ala Val Val Asn Thr Leu Asn Gln Thr Val Gln Gln Gly Thr Val Gln
 70 75 80
 gtc agc gtc atg atc gac aag atc gtg gac atc atg aag aat gtc ctg 3465
 Val Ser Val Met Ile Asp Lys Ile Val Asp Ile Met Lys Asn Val Leu
 85 90 95
 tcc atc gtg ata gac aac aag aag ttt tgg gat cag gtc acg gct gcc 3513
 Ser Ile Val Ile Asp Asn Lys Lys Phe Trp Asp Gln Val Thr Ala Ala
 100 105 110 115
 atc acc aac acc ttc acg aac ctg aac agc cag gag tcg gag gcc tgg 3561
 Ile Thr Asn Thr Phe Thr Asn Leu Asn Ser Gln Glu Ser Glu Ala Trp
 120 125 130
 atc ttc tat tac aag gag gac gcc cac aag acg tcc tac tat tac aac 3609
 Ile Phe Tyr Tyr Lys Glu Asp Ala His Lys Thr Ser Tyr Tyr Tyr Asn
 135 140 145
 atc ctc ttc gcc atc cag gac gaa gag acg ggt ggc gtg atg gcc acg 3657
 Ile Leu Phe Ala Ile Gln Asp Glu Glu Thr Gly Gly Val Met Ala Thr
 150 155 160
 ctg ccc atc gcc ttc gac atc agt gtg gac atc gag aag gag aag gtc 3705
 Leu Pro Ile Ala Phe Asp Ile Ser Val Asp Ile Glu Lys Glu Lys Val
 165 170 175
 ctg ttc gtg acc atc aag gac act gag aat tac gcc gtc acc gtc aag 3753

38-21 (53327) B SEQ LISTING.ST25.txt

```

Leu Phe Val Thr Ile Lys Asp Thr Glu Asn Tyr Ala Val Thr Val Lys
180          185          190          195

gcg atc aac gtg gtc cag gca ctc cag tct agc agg gat tct aag gtg      3801
Ala Ile Asn Val Val Gln Ala Leu Gln Ser Ser Arg Asp Ser Lys Val
          200          205          210

gtt gat gcg ttc aaa tcg cca cgg cac tta ccc cgg aag agg cat aag      3849
Val Asp Ala Phe Lys Ser Pro Arg His Leu Pro Arg Lys Arg His Lys
          215          220          225

att tgc tct aac tcg tga tga attctgcatg cgtttggacg tatgctcatt      3900
Ile Cys Ser Asn Ser
          230

caggttgagg ccaatttggt tgatgtgtgt gcgagttctt gcgagtctga tgagacatct      3960
ctgtattgtg tttctttccc cagtgttttc tgtacttggtg taatcggcta atcgccaaca      4020
gattcggcga tgaataaatg agaaataaat tgttctgatt ttgagtgcaa aaaaaaagga      4080
att                                                                 4083

<210> 39
<211> 232
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Construct

<400> 39

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

```

38-21 (53327) B SEQ LISTING.ST25.txt
185 190

180

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> 40
- <211> 6641
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220>
- <223> synthetic sequence; expression cassettes in pMON64150 encoding TIC809 and TIC810
- <220>
- <221> misc feature
- <223> pMON64150 first and second plant expression cassettes
- <220>
- <221> promoter
- <222> (1)..(1844)
- <223> rice Rcc3
- <220>
- <221> 5'UTR
- <222> (1845)..(1943)
- <223> rice Rcc3 leader
- <220>
- <221> Intron
- <222> (1952)..(2755)
- <223> HSP70 intron
- <220>
- <221> transit_peptide
- <222> (2772)..(2912)
- <223> Zm RbcS
- <220>
- <221> Intron
- <222> (2913)..(3081)
- <223> Zm RbcS
- <220>
- <221> transit_peptide
- <222> (3082)..(3168)
- <223> Zm RbcS
- <220>
- <221> CDS
- <222> (3169)..(3870)
- <223> TIC809
- <220>
- <221> terminator
- <222> (3874)..(4083)
- <223> Wheat Hsp17
- <220>
- <221> promoter
- <222> (4139)..(4750)
- <223> e35S
- <220>
- <221> 5'UTR
- <222> (4751)..(4759)
- <223> leader

38-21 (53327) B SEQ LISTING.ST25.txt

<220>
<221> 5'UTR
<222> (4786)..(4846)
<223> lWheat CAB leader

<220>
<221> Intron
<222> (4863)..(5342)
<223> rice actin

<220>
<221> transit_peptide
<222> (5366)..(5506)
<223> Zm.RbcS

<220>
<221> Intron
<222> (5507)..(5676)
<223> Zm.RbcS

<220>
<221> transit_peptide
<222> (5677)..(5766)
<223> Zm RbcS

<220>
<221> CDS
<222> (5767)..(6426)
<223> TIC810

<220>
<221> terminator
<222> (6432)..(6641)
<223> Wheat Hsp17

<400> 40
gcaatcaacc aacatatact gaatatggga aagtttcttt tagcttttct aaattaagta 60
ctgattctta aacttaagtg agaacttagc ctgttcaggg gcgacggcta aaggacatag 120
caccactagt ctacgcgatt gcaaaaaaga agaatgcaag cctgcaacaa gtatcgcttt 180
cccgaaccaat ggttggttga cctcggtttg ccggtaacct caggctggac gacagaacta 240
attagccaac ttgtcaatgt ctagggtgct gttcatagcc tgcagttgac agagtacgaa 300
aaggacaaga tcacatggaa gctaactagt cacggcgaat acatgacgac atcggcctac 360
aacgcacaac ttcttggcat aaaagcttca atttcaatgc ccctatcttg aagccctagg 420
cgccgcgcaa atgtaaaaca ttcgcttcgc ttggcttggt atccaaaata gagtatggac 480
ctccgacaga ttggcaaccc gtgggtaatc gaaaatggct ccatctgccc ctttgtcgaa 540
ggaatcagga aacggccctc acctcctggc ggagtgtaga tatgtgaaag aatctaggcg 600
acacttgag actggacaac atgtgaacaa ataagaccaa cgttatggca acaagcctcg 660
acgctactca agtggtggga ggccaccgca tgttccaacg aagcgccaaa gaaagccttg 720
cagactctaa tgctattagt cgcctaggat atttggaatg aaaggaaccg cagagttttt 780
cagcaccaag agcttccggt ggctagtctg atagccaaaa ttaaggagga tgccaaaaca 840
tgggtcttgg cgggcgcgaa acaccttgat aggtggctta ccttttaaca tgttcgggcc 900
aaaggccttg agacggtaaa gttttctatt tgcgcttgcg catgtacaat ttatttcctc 960
tattcaatga aatttggtgc tcaactggtt attaaaaaaa aaagaatcta gcctgttcgg 1020
gaagaagagg attttgttcg tgagagagag agagagagag agagagagag agagagagaa 1080
ggaggaggag gattttcagg cttcgcattg cccaacctct gcttctgttg gcccaagaag 1140
aatcccaggc gcccatgggc tggcagttta ccacggacct acctagccta ccttagctat 1200
ctaagcgggc cgacctagta gccacgtgcc tagttagat taaagttgcc gggccagcag 1260
gaagccacgc tgcaatggca tcttcccctg tccttcgcgt acgtgaaaac aaaccaggt 1320

105

38-21 (53327) B SEQ LISTING.ST25.txt

```

aagcttagaa tcttcttgcc cggttgactg ggacacccac caatcccacc atgccccgat 1380
attcctccgg tctcggttca tgtgatgtcc tctcttgtgt gatcacggag caagcattct 1440
taaacggcaa aagaaaatca ccaacttgct cagcgagtca cgctgcaccg cgcaagcga 1500
cgcccgatag gccaaagatcg cgagataaaa taacaaccaa tgatcataag gaaacaagcc 1560
cgcgatgtgt cggtgacagc aatcttggtc atttgcggga tcgagtgttt cacagctaac 1620
caaatattcg gccgatgatt taacacatta tcagcgtaga tgtacgtacg atttgtaaat 1680
taatctacga gccttgctag ggcaggtgtt ctgccagcca atccagatcg ccctcgtagt 1740
cacgctcaca tgatggcagg gcagggttca catgagctct aacggtcgat taattaatcc 1800
cggggctcga ctataaatc ctccctaata ccatgatcaa aaccatctca agcagcctaa 1860
tcattctcag ctgatcaaga gctcttaatt agctagctag tgattagctg cgcttgtagt 1920
cgatcgatct cgggtacgta gcaatagatc taccgtcttc ggtacgcgct cactccgccc 1980
tctgcctttg ttactgccac gtttctctga atgctctctt gtgtgtgtgt tgctgagagt 2040
ggtttagctg gatctagaat tacactctga aatcgtgttc tgctgtgtgt gattacttgc 2100
cgtcctttgt agcagcaaaa tatagggaca tggtagtacg aaacgaagat agaacctaca 2160
cagcaatacg agaaatgtgt aatttggtgc ttagcgggat ttatttaagc acatgttggt 2220
gttatagggc acttggtatc agaagtttgc tgtaattta ggcacaggct tcatactaca 2280
tggttcaata gtatagggat tcatattata ggcatacta taataatttg ttcgtctgca 2340
gagcttatta ttggcaaaa ttagatattc ctattctgtt tttgtttgtg tgctgttaaa 2400
ttgttaacgc ctgaaggaat aaatataaat gacgaaattt tgatgtttat ctctgctcct 2460
ttattgtgac cataagtcaa gatcagatgc acttgtttta aatattgttg tctgaagaaa 2520
taagtactga cagtattttg atgcattgat ctgcttgttt gttgtaacaa aatttaaaaa 2580
taaagagttt cctttttgtt gctctcctta cctcctgatg gtatctagta totaccaact 2640
gacactatat tgcttctctt tacatacgta tcttgctcga tgccttctcc ctagtgttga 2700
ccagtgttac tcacatagtc ttgtctcatt tcattgtaat gcagatacca agcggcctct 2760
agaggatcag catggcgccc accgtgatga tggcctcgtc ggccaccgcc gtcgctccgt 2820
tcctggggct caagtccacc gccagcctcc ccgtcgcccg ccgtcctcc agaagcctcg 2880
gcaacgtcag caacggcgga aggatccggt gcatgcaggt aacaaatgca tcctagctag 2940
tagttctttg cattgcagca gctgcagcta gcgagttagt aataggaagg gaactgatga 3000
tccatgcgatg gactgatgtg tgttgcccat cccatcccat cccatttccc aaacgaaccg 3060
aaaacaccgt actacgtgca ggtgtggccc tacggcaaca agaagttcga gacgctgtcg 3120
tacctgccgc cgctgtcgac cggcgggcgc atccgctgca tgcaggcc atg gcc ttc 3177
Met Ala Phe
1

ttc aac cgg gtg atc acc ctc acg gtg ccg tcg tca gac gtg gtc aac 3225
Phe Asn Arg Val Ile Thr Leu Thr Val Pro Ser Ser Asp Val Val Asn
5 10 15

tac tcg gag atc tac cag gtg gct cct cag tat gtc aac cag gcc ctg 3273
Tyr Ser Glu Ile Tyr Gln Val Ala Pro Gln Tyr Val Asn Gln Ala Leu
20 25 30 35

acc ctg gcc aag tac ttc cag gcc gcc atc gac ggc agc acc ctg agg 3321
Thr Leu Ala Lys Tyr Phe Gln Gly Ala Ile Asp Gly Ser Thr Leu Arg
40 45 50

ttc gac ttc gag aag gcg tta cag atc gcc aac gac atc ccg cag gcc 3369
Phe Asp Phe Glu Lys Ala Leu Gln Ile Ala Asn Asp Ile Pro Gln Ala

```

38-21 (53327) B SEQ LISTING.ST25.txt

```

55                               60                               65
gcg gtg gtc aac acc ctg aac cag acc gtc cag cag ggg acc gtc cag 3417
Ala Val Val Asn Thr Leu Asn Gln Thr Val Gln Gln Gly Thr Val Gln
70                               75                               80

gtc agc gtc atg atc gac aag atc gtg gac atc atg aag aat gtc ctg 3465
Val Ser Val Met Ile Asp Lys Ile Val Asp Ile Met Lys Asn Val Leu
85                               90                               95

tcc atc gtg ata gac aac aag aag ttt tgg gat cag gtc acg gct gcc 3513
Ser Ile Val Ile Asp Asn Lys Lys Phe Trp Asp Gln Val Thr Ala Ala
100                            105                            110                            115

atc acc aac acc ttc acg aac ctg aac agc cag gag tgc gag gcc tgg 3561
Ile Thr Asn Thr Phe Thr Asn Leu Asn Ser Gln Glu Ser Glu Ala Trp
120                            125                            130

atc ttc tat tac aag gag gac gcc cac aag acg tcc tac tat tac aac 3609
Ile Phe Tyr Tyr Lys Glu Asp Ala His Lys Thr Ser Tyr Tyr Tyr Asn
135                            140                            145

atc ctc ttc gcc atc cag gac gaa gag acg ggt ggc gtg atg gcc acg 3657
Ile Leu Phe Ala Ile Gln Asp Glu Glu Thr Gly Gly Val Met Ala Thr
150                            155                            160

ctg ccc atc gcc ttc gac atc agt gtg gac atc gag aag gag aag gtc 3705
Leu Pro Ile Ala Phe Asp Ile Ser Val Asp Ile Glu Lys Glu Lys Val
165                            170                            175

ctg ttc gtg acc atc aag gac act gag aat tac gcc gtc acc gtc aag 3753
Leu Phe Val Thr Ile Lys Asp Thr Glu Asn Tyr Ala Val Thr Val Lys
180                            185                            190                            195

gcg atc aac gtg gtc cag gca ctc cag tct agc agg gat tct aag gtg 3801
Ala Ile Asn Val Val Gln Ala Leu Gln Ser Ser Arg Asp Ser Lys Val
200                            205                            210

gtt gat gcg ttc aaa tcg cca cgg cac tta ccc cgg aag agg cat aag 3849
Val Asp Ala Phe Lys Ser Pro Arg His Leu Pro Arg Lys Arg His Lys
215                            220                            225

att tgc tct aac tcg tga tga attctgcatg cgtttggacg tatgctcatt 3900
Ile Cys Ser Asn Ser
230

caggttgag ccaatttggg tgatgtgtgt gcgagttctt gcgagtctga tgagacatct 3960

ctgtattgtg tttctttccc cagtgttttc tgtacttgtg taatcggtta atcgccaaca 4020

gattcggcga tgaataaatg agaaataaat tgttctgatt ttgagtgcga aaaaaagga 4080

attagatctg tgtgtgtttt ttggatcccc ggggcggccg cgtaacaag cttctgcagg 4140

tccgattgag acttttcaac aaagggtaat atccggaaac ctctcggat tccattgccc 4200

agctatctgt cactttattg tgaagatagt ggaaaaggaa ggtggctcct acaaatgcca 4260

tcattgcgat aaaggaaagg ccacgttgga agatgcctct gccgacagtg gtcccaaaga 4320

tggaacccca ccacagga gcatcgtgga aaaagaagac gttccaacca cgtcttcaaa 4380

gcaagtggat tgatgtgatg gtccgattga gacttttcaa caaagggtaa tatccgaaa 4440

cctcctcgga ttccattgcc cagctatctg tcactttatt gtgaagatag tggaaaagga 4500

agggtggctc tacaaatgcc atcattgcga taaaggaaag gccatcgttg aagatgcctc 4560

tgccgacagt ggtcccaaag atggaccccc acccagcagg agcatcgttg aaaaagaaga 4620

cgttccaacc acgtcttcaa agcaagtgga ttgatgtgat atctccactg acgtaaggga 4680

tgacgcacaa tcccactatc cttcgcaaga ccttcctct atataaggaa gttcatttca 4740

tttgagagg acacgtgac aagctgactc tagcagatcc tctagaacca tctccacac 4800

actcaagcca cactattgga gaacacacag ggacaacaca ccataagatc caagggaggc 4860

ctccgcccgc gccggtaacc accccgcccc tctcctcttt cttctcctt ttttttttcc 4920

```

107

38-21 (53327) B SEQ LISTING.ST25.txt

```

gtctcgggtct cgatcttttg ccttggtagt ttgggtgggc gagaggcggc ttcgtgcgcg 4980
cccagatcgg tgcgcgggag gggcgggatc tcgcggctgg ggctctcgcc ggcgtggatc 5040
cggcccgat ctcgcgggga atggggctct cggatgtaga tctgcgatcc gccgttggtg 5100
ggggagatga tggggggttt aaaatttccg ccgtgctaaa caagatcagg aagaggggaa 5160
aagggcacta tggtttatat ttttatatat ttctgctgct tcgtcaggct tagatgtgct 5220
agatctttct ttcttctttt tgtgggtaga atttgaatcc ctcagcattg ttcacgcgta 5280
gtttttcttt tcatgatttg tgacaaatgc agcctcgtgc ggagcttttt tgtaggtaga 5340
agtgatcaac ctctagagga tcagcatggc gcccaccgtg atgatggcct cgtcgccac 5400
cgccgtcgct ccgttcagg ggctcaagtc caccgccagc ctccccgtcg cccgccgctc 5460
ctccagaagc ctcggcaacg tcagcaacgg cggaaggatc cgggtcatgc aggtaacaaa 5520
tgcaccttag ctagtagttc ttgcatgac agcagctgca gctagcgagt tagtaatagg 5580
aagggaactg atgatccatg catggactga tgtgtgttgc ccatcccatc ccatttccca 5640
accccaaacg aacaaaaca cacgtactac gtgcagggtg ggccggccta cggcaacaag 5700
aagttcgaga cgctgctgta cctgccgccg ctgtcgaccg gcgggcgcac ccgctgcatg 5760
caggcc atg agc aaa gaa atc agg ctc aac ctt tct cgt gag agc ggc 5808
      Met Ser Lys Glu Ile Arg Leu Asn Leu Ser Arg Glu Ser Gly
          235                240                245

gcc gac ctg tac ctc aag atc ctc gcc ttc gtg aag ccc gag cac ttc 5856
Ala Asp Leu Tyr Leu Lys Ile Leu Ala Phe Val Lys Pro Glu His Phe
          250                255                260

ttt cag gcg tac ctc ctg tgc cgc gag ttc gag agc atc gtg gat cct 5904
Phe Gln Ala Tyr Leu Leu Cys Arg Glu Phe Glu Ser Ile Val Asp Pro
          265                270                275

aca acc cgc gag tct gac ttc gac aag acg ctg acc atc gtg aag tcg 5952
Thr Thr Arg Glu Ser Asp Phe Asp Lys Thr Leu Thr Ile Val Lys Ser
          280                285                290

gac tcc acc ctc gtg acc gtg ggc acg atg aac acc aag ctg gtc aat 6000
Asp Ser Thr Leu Val Thr Val Gly Thr Met Asn Thr Lys Leu Val Asn
          295                300                305                310

agc caa gag atc ctc gtg tcg gac ttg atc act caa gtc ggt tcc cag 6048
Ser Gln Glu Ile Leu Val Ser Asp Leu Ile Thr Gln Val Gly Ser Gln
          315                320                325

atc gcc gat acc ctc ggc atc acg gac atc gac gcc aac acc cag caa 6096
Ile Ala Asp Thr Leu Gly Ile Thr Asp Ile Asp Ala Asn Thr Gln Gln
          330                335                340

cag ctc acg gag ctg atc ggc aac ctc ttc gtg aac ctc aat tcc caa 6144
Gln Leu Thr Glu Leu Ile Gly Asn Leu Phe Val Asn Leu Asn Ser Gln
          345                350                355

gtt cag gag tac atc tac ttc tac gag gag aag gag aag cag acc tcc 6192
Val Gln Glu Tyr Ile Tyr Phe Tyr Glu Glu Lys Glu Lys Gln Thr Ser
          360                365                370

tac cgc tac aac atc ctc ttc gtg ttc gaa aag gag tcg ttc atc acc 6240
Tyr Arg Tyr Asn Ile Leu Phe Val Phe Glu Lys Glu Ser Phe Ile Thr
          375                380                385                390

att ctg cca atg ggc ttc gac gtg acc gtg aac acg aac aag gag gcc 6288
Ile Leu Pro Met Gly Phe Asp Val Thr Val Asn Thr Asn Lys Glu Ala
          395                400                405

gtc ctg aag ctg acc ccg aag gac aag gtt acc tac ggc cac gtc agc 6336
Val Leu Lys Leu Thr Pro Lys Asp Lys Val Thr Tyr Gly His Val Ser
          410                415                420

gtc aag gcc ctc aac atc atc cag ctc att acg gag gac aag ttc aac 6384
Val Lys Ala Leu Asn Ile Ile Gln Leu Ile Thr Glu Asp Lys Phe Asn

```

38-21 (53327) B SEQ LISTING.ST25.txt

425

430

435

ttc ctc gca acc ctc aag aag gct ctc aag acc ctg tga tga 6426
Phe Leu Ala Thr Leu Lys Lys Ala Leu Lys Thr Leu
440 445 450
gaattctgca tgcgtttgga cgtatgctca ttcaggttgg agccaatttg gttagatgtg 6486
gtgcgagttc ttgcgagttc gatgagacat ctctgtattg tgtttctttc cccagtgttt 6546
tctgtacttg tgaatcggc taatcgccaa cagattcggc gatgaataaa tgagaaataa 6606
attgttctga ttttgagtgc aaaaaaaaag gaatt 6641

<210> 41
<211> 232
<212> FRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Construct

<400> 41

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

38-21 (53327) B SEQ LISTING.ST25.txt

Arg His Lys Ile Cys Ser Asn Ser
225 230

<210> 42
<211> 218
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Construct

<400> 42

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> 43
<211> 5813
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic sequence; expression cassettes in pMON64151 encoding

38-21 (53327) B SEQ LISTING.ST25.txt

TIC809 and TIC810

```

<220>
<221> misc feature
<223> pMON64151 first and second plant expression cassettes

<220>
<221> promoter
<222> (1)..(1844)
<223> rice Rcc3

<220>
<221> 5'UTR
<222> (1845)..(1943)
<223> rice Rcc3 leader

<220>
<221> Intron
<222> (1952)..(2755)
<223> HSP70 intron

<220>
<221> CDS
<222> (2772)..(3473)
<223> TIC809

<220>
<221> terminator
<222> (3477)..(3686)
<223> Wheat Hsp17

<220>
<221> promoter
<222> (3724)..(4337)
<223> e35S

<220>
<221> 5'UTR
<222> (4373)..(4433)
<223> Wheat CAB leader

<220>
<221> Intron
<222> (4450)..(4929)
<223> rice actin

<220>
<221> CDS
<222> (4939)..(5598)
<223> TIC810

<220>
<221> terminator
<222> (5604)..(5813)
<223> Wheat Hsp17

<400> 43
gcaatcaacc aacatatact gaatatggga aagtttcttt tagcttttct aaattaagta 60
ctgattctta aacttaagtg agaatctagc ctgttcaggg gcgacggcta aaggacatag 120
caccactagt ctacgcgatt gcaaaaaaga agaatgcaag cctgcaacaa gtatcgcttt 180
cccgaccaat ggttggttga cctcggtttg ccgtaacct caggctggac gacagaacta 240
attagccaac ttgtcaatgt ctagggtgct gttcatagcc tgcagttgac agagtacgaa 300
aaggacaaga tcacatggaa gctaactagt cacggcgaat acatgacgac atcggcctac 360
aacgcacaac ttcttggcat aaaagcttca atttcaatgc ccctatctgg aagccctagg 420
cgccgcgcaa atgtaaaaca ttcgcttcgc ttggcttggt atccaaaata gagtatggac 480
ctccgacaga ttggcaaccc gtgggtaatc gaaaatggct ccctctgccc ctttgtcgaa 540
ggaatcagga aacggccctc acctcctggc ggagtgtaga tatgtgaaag aatctaggcg 600
acactgcag actggacaac atgtgaacaa ataagaccaa cgttatggca acaagcctcg 660

```

111

38-21 (53327) B SEQ LISTING.ST25.txt

acgctactca agtgggtggga ggccaccgca tgttccaacg aagcgccaaa gaaagccttg	720
cagactctaa tgcattagtg cgcctaggat atttggatg aaaggaaccg cagagttttt	780
cagcaccaag agcttccggg ggctagtctg atagccaaaa ttaaggagga tgcacaaaca	840
tgggtcttgg cgggcgcgaa acaccttgat aggtggctta ccttttaaca tgttcggggc	900
aaagccttg agacggtaaa gttttctatt tgcgcttgcg catgtacaat tttattcttc	960
tattcaatga aattgggtgg tcaactggtc attaaaaaa aaagaatcta gctgttccg	1020
gaagaagagg attttgttcg tgagagagag agagagagag agagagagaa	1080
ggaggaggag gattttcagg ctctgcattg cccaacctct gcttctgttg gcccaagaag	1140
aatcccaggc gcccatgggc tggcagttta ccacggacct acctagccta ccttagctat	1200
ctaagcgggc cgacctagta gccacgtgac tagttagatg taaagttgcc gggccagcag	1260
gaagccacgc tgcattggca tcttcccttg tcttccgct acgtgaaaac aaaccacggg	1320
aagcttagaa tcttcttgcc cgttggactg ggacacccac caatcccacc atgcccagat	1380
attctctcgg tctcgggtta tgtgatgtcc tctctgtgt gatcacggag caagcattct	1440
taaacggcaa aagaaatca ccaacttgct cagcagtcga cgtgcacgc cgcgaagcga	1500
cgcctgatag gccaagatcg cgagataaaa taacaaccaa tgatcataag gaaacaagcc	1560
cgcgatgctg cgtgtgcagc aatcttggtc atttgcggga tgcagtgtct cacagctaac	1620
caaattctcg gcgatgatt taacacatta tcagcgtaga tgtacgtacg atttgttaat	1680
taatctacga gcttgcctag ggcaggtgtt ctgccagcca atccagatcg cctcgtatg	1740
cagctcaca tgaaggcagg gcagggttca catgagctct aacggctgat taattaatcc	1800
cggggctcga ctataaatc ctccctaato ccattgatca aaccatctca agcagcctaa	1860
tcatctccag ctgatcaaga gctcttaatt agctagctag tgattagctg cgttctgtat	1920
cgatcgatct cgggtacgta gcaatagatc taccgtcttc ggtacgcgct cactccggcc	1980
tctgcttttg ttactgccac gttctctga atgctctctt gtgtggtgat tgotgagagt	2040
ggtttagctg gatctagaat tacactctga aatcgtgttc tgcctgtgtt gattacttgc	2100
cgtcctttgt agcagcaaaa tatagggaca tggtagtacg aaacgaagat agaacctaca	2160
cagcaatagc agaaatgtgt aatttgggtc tttagcggtat ttatttaagc acatgttggg	2220
gttatagggc acttggatcc agaagtttgc tgttaattta ggcacaggct tcatactaca	2280
tgggtcaata gtatagggt tcatattata ggcgatacta taataatttg ttogtctgca	2340
gagcttatta tttgcaaaaa ttagatattc ctattctgtt ttgttttggt tgotgttaaa	2400
ttgttaacgc ctgaaggaa aaatataaat gacgaattt tgaatgttat ctctgctcct	2460
ttattgtgac cataagtcaa gatcagatgc acttgtttta aatattgttg tctgaagaaa	2520
taagtactga cagtattttg atgcattgat ctgcttgttt gttgtaacaa aatttaaaaa	2580
taaagagttt cctttttgtt gctctcctta cctcctgatg glatctagta tctaccaact	2640
gacactatat tgcctctctt tacatacgtg tcttgcctga tgccttctcc ctagtgttga	2700
ccagtgttac tcacatagtc tttgctcatt tcattgtaat gcagatacca agcggcctct	2760
agaggatctc c atg gcc ttc ttc aac cgg gtg atc acc ctg acg gtg ccg	2810
Met Ala Phe Phe Asn Arg Val Ile Thr Leu Thr Val Pro	
1 5 10	
tcg tca gac gtg gtc aac tac tgg gag atc tac cag gtg gct cct cag	2858
Ser Ser Asp Val Val Asn Tyr Ser Glu Ile Tyr Gln Val Ala Pro Gln	
15 20 25	

112

38-21 (53327) B SEQ LISTING.ST25.txt

tat gtc aac cag gcc ctg acc ctg gcc aag tac ttc cag ggc gcc atc	2906
Tyr Val Asn Gln Ala Leu Thr Leu Ala Lys Tyr Phe Gln Gly Ala Ile	
30 35 40 45	
gac ggc agc acc ctg agg ttc gac ttc gag aag gcg tta cag atc gcc	2954
Asp Gly Ser Thr Leu Arg Phe Asp Phe Glu Lys Ala Leu Gln Ile Ala	
50 55 60	
aac gac atc ccc cag gcc gcg gtg gtc aac acc ctg aac cag acc gtc	3002
Asn Asp Ile Pro Gln Ala Ala Val Val Asn Thr Leu Asn Gln Thr Val	
65 70 75	
cag cag ggc acc gtc cag gtc agc gtc atg atc gac aag atc gtg gac	3050
Gln Gln Gly Thr Val Gln Val Ser Val Met Ile Asp Lys Ile Val Asp	
80 85 90	
atc atg aag aat gtc ctg tcc atc gtg ata gac aac aag aag ttt tgg	3098
Ile Met Lys Asn Val Leu Ser Ile Val Ile Asp Asn Lys Lys Phe Trp	
95 100 105	
gat cag gtc acg gct gcc atc acc aac acc ttc acg aac ctg aac agc	3146
Asp Gln Val Thr Ala Ala Ile Thr Asn Thr Phe Thr Asn Leu Asn Ser	
110 115 120 125	
cag gag tgg gag gcc tgg atc ttc tat tac aag gag gac gcc cac aag	3194
Gln Glu Ser Glu Ala Trp Ile Phe Tyr Tyr Lys Glu Asp Ala His Lys	
130 135 140	
acg tcc tac tat tac aac atc ctg ttc gcc atc cag gac gaa gag acg	3242
Thr Ser Tyr Tyr Tyr Asn Ile Leu Phe Ala Ile Gln Asp Glu Glu Thr	
145 150 155	
ggt ggc gtg atg gcc acg ctg ccc atc gcc ttc gac atc agt gtg gac	3290
Gly Gly Val Met Ala Thr Leu Pro Ile Ala Phe Asp Ile Ser Val Asp	
160 165 170	
atc gag aag gag aag gtc ctg ttc gtg acc atc aag gac act gag aat	3338
Ile Glu Lys Glu Lys Val Leu Phe Val Thr Ile Lys Asp Thr Glu Asn	
175 180 185	
tac gcc gtc acc gtc aag gcg atc aac gtg gtc cag gca ctg cag tct	3386
Tyr Ala Val Thr Val Lys Ala Ile Asn Val Val Gln Ala Leu Gln Ser	
190 195 200 205	
agc agg gat tct aag gtg gtt gat gcg ttc aaa tgg cca cgg cac tta	3434
Ser Arg Asp Ser Lys Val Val Asp Ala Phe Lys Ser Pro Arg His Leu	
210 215 220	
ccc cgg aag agg cat aag att tgc tct aac tgg tga tga attctgcatg	3483
Pro Arg Lys Arg His Lys Ile Cys Ser Asn Ser	
225 230	
cgtttgagc tatgtcatt cagggttgag ccaatttggg tgaatgtgtg gcgagttctt	3543
gcgagttctga tgagacatct ctgtattgtg tttctttccc cagtgttttc tgtacttgtg	3603
taatcggcta atcgccaaca gattcggcga tgaataaatg agaaataaat tgttctgatt	3663
ttgagtgcga aaaaaaagga attagatctg tgtgtgtttt ttggatcccc agcttctgca	3723
ggtccgatgt gagacttttc aacaaagggt aatatccgga aacctctctg gattccattg	3783
cccagctatc tgtcacttta ttgtgaagat agtggaaaag gaaggtgggt cctacaaaatg	3843
ccatcattgc gataaaggaa aggccatcgt tgaagatgcc tctgccgaca gtggtcccaa	3903
agatggaccc ccaccacga ggagcatcgt ggaaaaagaa gacgttccaa ccacgtcttc	3963
aaagcaagtg gattgatgtg atgggtccat gtgagaacttt tcaacaaagg gtaatatccg	4023
gaaacctcct cggattccat tgcccagcta totgtcactt tattgtgaag atagtggaaa	4083
aggaagggtg ctcctacaaa tgccatcatt gcgataaagg aaaggccatc gttgaagatg	4143
cctctgccga cagtgtgtcc aaagatggac ccccaccac gaggagcatc gtggaaaaag	4203
aagacgttcc aaccacgtct tcaaaagcaag tggattgatg tgatatctcc actgacgtaa	4263
gggatgacgc acaatccac tatecttgc aagacccttc ctctatataa ggaagttcat	4323

113

38-21 (53327) B SEQ LISTING.ST25.txt

```

ttcatttgga gaggacacgc tgacaagctg actctagcag atcctctaga accatcttcc 4383
acacactcaa gccacactat tggagaacac acagggacaa cacaccataa gatccaaggg 4443
aggcctccgc cgcgcgcggt aaccaccccg cccctctcct ctttctttct ccgttttttt 4503
ttcogtctcg gtctcgatct ttggccttgg tagtttgggt gggcgagagg cggcttcgtg 4563
cgcgcacaga tgggtgcgcg ggaggggcgg gatctcgccg ctggggctct cgcgcgcgtg 4623
gatccggccc ggatctcgcg gggaatgggg ctctcggatg tagatctgag atccgcggtt 4683
gttgggggag atgatggggg gtttaaaatt tccgcctggc taaacaagat caggaagagg 4743
ggaaaagggc actatggttt atatttttat atatttctgc tgettcgtca ggcttagatg 4803
tgctagatct ttctttcttc tttttgtggg tagaatttga atccctcagc attgttcac 4863
ggtagttttt cttttcatga tttgtgacaa atgcagcctc gtgcggagct tttttgtagg 4923
tagaagtgat caacc atg agc aaa gaa atc agg ctc aac ctt tct cgt gag 4974
      Met Ser Lys Glu Ile Arg Leu Asn Leu Ser Arg Glu
      235                      240

agc ggc gcc gac ctg tac ctc aag atc ctc gcc ttc gtg aag ccc gag 5022
Ser Gly Ala Asp Leu Tyr Leu Lys Ile Leu Ala Phe Val Lys Pro Glu
245                      250                      255                      260

cac ttc ttt cag gcg tac ctc ctg tgc cgc gag ttc gag agc atc gtg 5070
His Phe Phe Gln Ala Tyr Leu Leu Cys Arg Glu Phe Glu Ser Ile Val
265                      270                      275

gat cct aca acc cgc gag tct gac ttc gac aag acg ctg acc atc gtg 5118
Asp Pro Thr Thr Arg Glu Ser Asp Phe Asp Lys Thr Leu Thr Ile Val
280                      285                      290

aag tcg gac tcc acc ctc gtg acc gtg ggc acg atg aac acc aag ctg 5166
Lys Ser Asp Ser Thr Leu Val Thr Val Gly Thr Met Asn Thr Lys Leu
295                      300                      305

gtc aat agc caa gag atc ctc gtg tcg gac ttg atc act caa gtc ggt 5214
Val Asn Ser Gln Glu Ile Leu Val Ser Asp Leu Ile Thr Gln Val Gly
310                      315                      320

tcc cag atc gcc gat acc ctc ggc atc acg gac atc gac gcc aac acc 5262
Ser Gln Ile Ala Asp Thr Leu Gly Ile Thr Asp Ile Asp Ala Asn Thr
325                      330                      335                      340

cag caa cag ctc acg gag ctg atc ggc aac ctc ttc gtg aac ctc aat 5310
Gln Gln Gln Leu Thr Glu Leu Ile Gly Asn Leu Phe Val Asn Leu Asn
345                      350                      355

tcc caa gtt cag gag tac atc tac ttc tac gag gag aag gag aag cag 5358
Ser Gln Val Gln Glu Tyr Ile Tyr Phe Tyr Glu Glu Lys Glu Lys Gln
360                      365                      370

acc tcc tac cgc tac aac atc ctc ttc gtg ttc gaa aag gag tcg ttc 5406
Thr Ser Tyr Arg Tyr Asn Ile Leu Phe Val Phe Glu Lys Glu Ser Phe
375                      380                      385

atc acc att ctg cca atg ggc ttc gac gtg acc gtg aac acg aac aag 5454
Ile Thr Ile Leu Pro Met Gly Phe Asp Val Thr Val Asn Thr Asn Lys
390                      395                      400

gag gcc gtc ctg aag ctg acc ccg aag gac aag gtt acc tac ggc cac 5502
Glu Ala Val Leu Lys Leu Thr Pro Lys Asp Lys Val Thr Tyr Gly His
405                      410                      415                      420

gtc agc gtc aag gcc ctc aac atc atc cag ctc att acg gag gac aag 5550
Val Ser Val Lys Ala Leu Asn Ile Ile Gln Leu Ile Thr Glu Asp Lys
425                      430                      435

ttc aac ttc ctc gca acc ctc aag aag gct ctc aag acc ctg tga tga 5598
Phe Asn Phe Leu Ala Thr Leu Lys Lys Ala Leu Lys Thr Leu
440                      445                      450

gaattctgca tgcgtttgga cgtatgctca ttcagggttg agccaatttg gttgatgtgt 5658

```

114

38-21 (53327) B SEQ LISTING.ST25.txt

gtgcgagttc ttgcgagttc gatgagacat ctctgtattg tgtttctttc cccagtgttt 5718
 tctgtacttg tgtaatcgcc taatcgccaa cagattcgcc gatgaataaa tgagaaataa 5778
 attgtttcga ttttgagtcg aaaaaaaaaa gaatt 5813

<210> 44
 <211> 232
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic Construct

<400> 44

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> 45
 <211> 218

115

38-21 (53327) B SEQ LISTING.ST25.txt

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 45

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> 46

<211> 1413

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1407)

<223> TIC127

<220>

<223> Synthetic Construct

<220>

116

38-21 (53327) B SEQ LISTING.ST25.txt

```

<223> (1)..(696)
<223> TIC809 amino acid sequence

<220>
<223> (697)..(753)
<223> proteolysis susceptible spacer or linker amino acid sequence

<220>
<223> (754)..(1407)
<223> TIC810 amino acid sequence

<400> 46
atg gcc ttc ttc aac cgg gtg atc acc ctc acg gtg ccg tcg tca gac 48
Met Ala Phe Phe Asn Arg Val Ile Thr Leu Thr Val Pro Ser Ser Asp
1 5 10 15

gtg gtc aac tac tcg gag atc tac cag gtg gct cct cag tat gtc aac 96
Val Val Asn Tyr Ser Glu Ile Tyr Gln Val Ala Pro Gln Tyr Val Asn
20 25 30

cag gcc ctg acc ctg gcc aag tac ttc cag ggc gcc atc gac ggc agc 144
Gln Ala Leu Thr Leu Ala Lys Tyr Phe Gln Gly Ala Ile Asp Gly Ser
35 40 45

acc ctg agg ttc gac ttc gag aag gcg tta cag atc gcc aac gac atc 192
Thr Leu Arg Phe Asp Phe Glu Lys Ala Leu Gln Ile Ala Asn Asp Ile
50 55 60

ccg cag gcc gcg gtg gtc aac acc ctg aac cag acc gtc cag cag ggg 240
Pro Gln Ala Ala Val Val Asn Thr Leu Asn Gln Thr Val Gln Gln Gly
65 70 75 80

acc gtc cag gtc agc gtc atg atc gac aag atc gtg gac atc atg aag 288
Thr Val Gln Val Ser Val Met Ile Asp Lys Ile Val Asp Ile Met Lys
85 90 95

aat gtc ctg tcc atc gtg ata gac aac aag aag ttt tgg gat cag gtc 336
Asn Val Leu Ser Ile Val Ile Asp Asn Lys Lys Phe Trp Asp Gln Val
100 105 110

acg gct gcc atc acc aac acc ttc acg aac ctg aac agc cag gag tcg 384
Thr Ala Ala Ile Thr Asn Thr Phe Thr Asn Leu Asn Ser Gln Glu Ser
115 120 125

gag gcc tgg atc ttc tat tac aag gag gac gcc cac aag acg tcc tac 432
Glu Ala Trp Ile Phe Tyr Tyr Lys Glu Asp Ala His Lys Thr Ser Tyr
130 135 140

tat tac aac atc ctc ttc gcc atc cag gac gaa gag acg ggt ggc gtg 480
Tyr Tyr Asn Ile Leu Phe Ala Ile Gln Asp Glu Glu Thr Gly Gly Val
145 150 155 160

atg gcc acg ctg ccc atc gcc ttc gac atc agt gtg gac atc gag aag 528
Met Ala Thr Leu Pro Ile Ala Phe Asp Ile Ser Val Asp Ile Glu Lys
165 170 175

gag aag gtc ctg ttc gtg acc atc aag gac act gag aat tac gcc gtc 576
Glu Lys Val Leu Phe Val Thr Ile Lys Asp Thr Glu Asn Tyr Ala Val
180 185 190

acc gtc aag gcg atc aac gtg gtc cag gca ctc cag tct agc agg gat 624
Thr Val Lys Ala Ile Asn Val Val Gln Ala Leu Gln Ser Ser Arg Asp
195 200 205

tct aag gtg gtt gat gcg ttc aaa tcg cca cgg cac tta ccc cgg aag 672
Ser Lys Val Val Asp Ala Phe Lys Ser Pro Arg His Leu Pro Arg Lys
210 215 220

agg cat aag att tgc tct aac tcg aag ccc gcc ctg ctc aag gag gct 720
Arg His Lys Ile Cys Ser Asn Ser Lys Pro Ala Leu Leu Lys Glu Ala
225 230 235 240

ccc cgc gcc gag gag gag ctg cct ccc cgc aag atg agc aaa gaa atc 768
Pro Arg Ala Glu Glu Leu Pro Pro Arg Lys Met Ser Lys Glu Ile
245 250 255

agg ctc aac ctt tct cgt gag agc ggc gcc gac ctg tac ctc aag atc 816
Arg Leu Asn Leu Ser Arg Glu Ser Gly Ala Asp Leu Tyr Leu Lys Ile
260 265 270

```

117

38-21 (53327) B SEQ LISTING.ST25.txt

```

ctc gcc ttc gtg aag ccc gag cac ttc ttt cag gcg tac ctc ctg tgc      864
Leu Ala Phe Val Lys Pro Glu His Phe Phe Gln Ala Tyr Leu Leu Cys
275                               280                               285

cgc gag ttc gag agc atc gtg gat cct aca acc cgc gag tct gac ttc      912
Arg Glu Phe Glu Ser Ile Val Asp Pro Thr Thr Arg Glu Ser Asp Phe
290                               295                               300

gac aag acg ctg acc atc gtg aag tcc gac tcc acc ctc gtg acc gtg      960
Asp Lys Thr Leu Thr Ile Val Lys Ser Asp Ser Thr Leu Val Thr Val
305                               310                               315                               320

ggc acg atg aac acc aag ctg gtc aat agc caa gag atc ctc gtg tcc      1008
Gly Thr Met Asn Thr Lys Leu Val Asn Ser Gln Glu Ile Leu Val Ser
325                               330                               335

gac ttg atc act caa gtc ggt tcc cag atc gcc gat acc ctc ggc atc      1056
Asp Leu Ile Thr Gln Val Gly Ser Gln Ile Ala Asp Thr Leu Gly Ile
340                               345                               350

acg gac atc gac gcc aac acc cag caa cag ctc acg gag ctg atc ggc      1104
Thr Asp Ile Asp Ala Asn Thr Gln Gln Gln Leu Thr Glu Leu Ile Gly
355                               360                               365

aac ctc ttc gtg aac ctc aat tcc caa gtt cag gag tac atc tac ttc      1152
Asn Leu Phe Val Asn Leu Asn Ser Gln Val Gln Glu Tyr Ile Tyr Phe
370                               375                               380

tac gag gag aag gag aag cag acc tcc tac cgc tac aac atc ctc ttc      1200
Tyr Glu Glu Lys Glu Lys Gln Thr Ser Tyr Arg Tyr Asn Ile Leu Phe
385                               390                               395                               400

gtg ttc gaa aag gag tcc ttc atc acc att ctg cca atg ggc ttc gac      1248
Val Phe Glu Lys Glu Ser Phe Ile Thr Ile Leu Pro Met Gly Phe Asp
405                               410                               415

gtg acc gtg aac acg aac aag gag gcc gtc ctg aag ctg acc cgc aag      1296
Val Thr Val Asn Thr Asn Lys Glu Ala Val Leu Lys Leu Thr Pro Lys
420                               425                               430

gac aag gtt acc tac ggc cac gtc agc gtc aag gcc ctc aac atc atc      1344
Asp Lys Val Thr Tyr Gly His Val Ser Val Lys Ala Leu Asn Ile Ile
435                               440                               445

cag ctc att acg gag gac aag ttc aac ttc ctc gca acc ctc aag aag      1392
Gln Leu Ile Thr Glu Asp Lys Phe Asn Phe Leu Ala Thr Leu Lys Lys
450                               455                               460

gct ctc aag acc ctg tgatga      1413
Ala Leu Lys Thr Leu
465

```

<210> 47
 <211> 469
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<400> 47

```

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

```

38-21 (53327) B SEQ LISTING.ST25.txt

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 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

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

119

38-21 (53327) B SEQ LISTING.ST25.txt
395 400

385

390

Val Phe Glu Lys Glu Ser Phe Ile Thr Ile Leu Pro Met Gly Phe Asp
405 410 415Val Thr Val Asn Thr Asn Lys Glu Ala Val Leu Lys Leu Thr Pro Lys
420 425 430Asp Lys Val Thr Tyr Gly His Val Ser Val Lys Ala Leu Asn Ile Ile
435 440 445Gln Leu Ile Thr Glu Asp Lys Phe Asn Phe Leu Ala Thr Leu Lys Lys
450 455 460Ala Leu Lys Thr Leu
465

**COMPOSICIONES INSECTICIDAS Y MÉTODOS PARA CREAR PLANTAS
TRANSGÉNICAS RESISTENTES A INSECTOS**

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

En general, la presente invención se relaciona con el campo de la biología molecular de plantas, y más particularmente, con nuevas secuencias de polinucleótidos, y proteínas codificadas por estas secuencias, que derivan de *Bacillus thuringiensis* y codifican proteínas ET29, TIC809, ET37, TIC810 y TIC812, que son tóxicas para especies de coleópteros e insectos dentro del superorden conocido como Hemiptera. Las proteínas tóxicas para coleópteros incluyen ET29, TIC809 (una variante de la secuencia de aminoácidos de ET29) y ET37 (un homólogo de ET29). En la presente documentación también se proporcionan TIC810 y TIC812, y las secuencias de nucleótidos que codifican estas proteínas. Cuando se combina TIC810 o TIC812 con ET29, TIC809 o ET37, se obtienen composiciones insecticidas que presentan una potencia sorprendentemente mayor contra especies de coleópteros, en comparación con la presentación de ET29, TIC809 o ET37 solas, y la combinación de dos de ellas (TIC810 con cualquiera de ET29, TIC809 o ET37, o TIC812 con cualquiera de ET29, TIC809 o ET37) sorprendentemente provee una composición tóxica para hemípteros, en particular cuando se la coloca en la dieta de una especie tal como *Lygus hesperus* (chinche vegetal manchada occidental, WTPB). También se describen métodos para preparar y usar los polinucleótidos que codifican estas y otras proteínas relacionadas en el desarrollo de plantas transgénicas y células vegetales que son resistentes a la infestación por parte de insectos coleópteros y hemípteros.

Los métodos y las composiciones sensibles al ambiente para controlar o erradicar infestaciones de insectos son deseables en muchos casos, ya que los cultivos de interés comercial comúnmente son el blanco del ataque de los insectos, particularmente el ataque de insectos plaga coleópteros y lepidópteros. Esto es particularmente verdadero para los granjeros, los cuidadores, los encargados de cultivos y las áreas comerciales y residenciales que desean controlar las poblaciones de insectos usando métodos y composiciones que no dañen el ambiente. El control o la erradicación de las infestaciones de hemípteros en los cultivos también es de importancia comercial, y tiene una importancia que crece a medida que hay cada vez más abordajes biotecnológicos disponibles para los métodos de control de plagas de coleópteros y lepidópteros, particularmente porque se utilizan menos aplicaciones de insecticidas químicos, lo que resulta en una actividad insecticida de amplio espectro.

Las propiedades insecticidas de la bacteria *Bacillus thuringiensis* han sido reconocidas desde hace tiempo. *B. thuringiensis* es bien conocida porque produce cristales parasporales proteináceos, o δ -endotoxinas, que presentan una toxicidad específica para una variedad de larvas de lepidópteros, coleópteros y dípteros (English et. al., Patente de los EEUU N° 6063597). Las composiciones que comprenden cepas de *B. thuringiensis* que producen proteínas insecticidas han sido usadas en el ámbito comercial como insecticidas aceptables para usar en el medio ambiente, ya que presentan una toxicidad específica para insectos blanco específicos y no presentan toxicidad sobre plantas, animales y otros organismos distintos del blanco.

Se han aislado y caracterizado más de 250 δ -endotoxinas diferentes. Se han usado secuencias que codifican algunas de estas δ -endotoxinas para construir productos de *B. thuringiensis* modificados genéticamente, en los que se expresan una o más proteínas insecticidas que presentan actividad insecticida específica sobre plagas blanco, y han sido aprobadas para usar como composiciones insecticidas aplicadas de forma tópica. Las plantas transgénicas que expresan una o más proteínas insecticidas delta endotoxinas Bt, que pueden usarse para controlar uno o más insectos dentro de una clase específica, tales como los lepidópteros o los coleópteros plaga, han sido aprobadas para la comercialización y han resultado exitosas. Sin embargo, existe el riesgo de que las poblaciones de los insectos plaga blanco que se alimenten con estas plantas transgénicas desarrollen resistencia a una o más de las toxinas producidas por las plantas, por lo que subsiste la necesidad de identificar nuevas proteínas insecticidas, que puedan usarse solas o en combinación con otras, que manifiesten sus efectos tóxicos a través de distintos modos de acción. Se desean nuevas composiciones insecticidas para producir plantas transgénicas que expresen una o más proteínas insecticidas de *B. thuringiensis* tóxicas para la misma especie de insecto, con lo que se proporcionará un medio para manejar la resistencia y demorar o eliminar el desarrollo de resistencia de cualquier especie de insecto particular, susceptible a cualquiera de los uno o más agentes insecticidas expresados dentro de una planta transgénica.

La mayor parte de las toxinas Bt son tóxicas para especies de lepidópteros. Se ha demostrado que unas pocas son efectivas contra especies de coleópteros, y que otras contienen toxinas citolíticas que presentan un rango nulo de especificidad de huésped. No se ha demostrado que haya toxinas Bt que presenten actividad insecticida sobre insectos plaga pertenecientes a especies de

lepidópteros, coleópteros y hemípteros. Por consiguiente, existe la necesidad de identificar nuevas composiciones insecticidas específicas para coleópteros y/o hemípteros, y métodos para controlar infestaciones provocadas por insectos miembros de los órdenes Coleoptera y Hemiptera, particularmente Coleoptera, por miembros de la familia Chrysomelidae, más particularmente, por el género *Diabrotica* de la familia Chrysomelidae, que puede incluir aquellas especies del género *Diabrotica*, tales como *Diabrotica virgifera* (oruga de la raíz del maíz occidental, WCR), *Diabrotica undecempunctata* (oruga de la raíz del maíz del sur, SCR), *Diabrotica barberi* (oruga de la raíz del maíz del norte, NCR), *Diabrotica virgifera zea* (oruga de la raíz del maíz mexicana, MCR), *Diabrotica balteata* (oruga de la raíz del maíz del Brasil, BZR), y el complejo de la oruga de la raíz del maíz del Brasil (BCR), que consiste en *Diabrotica viridula* y *Diabrotica speciosa*, y particularmente por miembros del superorden Hemiptera, que incluye cualquier insecto plaga dentro del suborden Heteroptera, incluyendo los insectos conocidos comúnmente como chinches de olor, chinches *Lygus* (incluyendo *Lygus hesperus*, *Lygus lineolus* y *Lygus elisus*), chinches asesinas, chinches de cama y chinches de las flores, y el suborden Homoptera, incluyendo los insectos conocidos comúnmente como cigarras, pulgones, cotorritas, cochinillas y moscas blancas.

RESUMEN DE LA INVENCION

En la presente invención se proveen composiciones de polipéptidos aislados a partir de *B. thuringiensis*, que presentan actividad insecticida contra insectos plaga coleópteros y hemípteros, y se proveen secuencias de nucleótidos que codifican estos polipéptidos. En la presente invención se provee el control de infestaciones de insectos coleópteros y hemípteros, mediante la co-expresión de al menos dos proteínas de *B. thuringiensis* en plantas, ya sea como proteínas independientes o como una proteína de fusión de ambas, lo que resulta en niveles sorprendentemente elevados de acumulación de las proteínas insecticidas, para proporcionar el control efectivo de insectos plaga coleópteros y hemípteros, y provee mejoras en el manejo de la resistencia de los insectos coleópteros y hemípteros responsables de las infestaciones. Adicionalmente, se proporciona un método para incrementar el nivel de acumulación *in planta* de una proteína insecticida de *B. Thuringiensis*, o una variante de ésta, que también provee el beneficio adicional de la ausencia de morfologías anormales para las plantas transgénicas que expresan estas proteínas.

Para lograr lo anterior, se proporciona una molécula de polinucleótido como se indica en SEQ ID N° 1, aislada a partir de la cepa de *B. thuringiensis* EG5078.

La molécula de polinucleótido codifica una proteína insecticida como se indica en SEQ ID N° 2, designada en la presente documentación ET37, que presenta actividad biológica de inhibición de insectos coleópteros plaga.

También se proporciona una molécula de polinucleótido como se indica en
5 SEQ ID N° 3, que ha sido aislada a partir de la cepa de *B. thuringiensis* EG4096, que codifica una secuencia de aminoácidos TIC810, como se indica en SEQ ID N° 4.

Se proporciona aún otra secuencia de polinucleótidos como se indica en
10 SEQ ID N° 5, que codifica una secuencia de aminoácidos TIC812, como se indica en SEQ ID N° 6, que ha sido aislada a partir de la cepa de *B. thuringiensis* EG5078. TIC812 es sustancialmente idéntica a TIC810.

En la presente documentación se contempla específicamente una molécula de polinucleótido aislada que codifica una proteína insecticida, o un fragmento insecticida de ésta, que presenta entre aproximadamente 70% y aproximadamente
15 99%, o más similitud de secuencia con una secuencia de polipéptido como se indica en SEQ ID N° 4 y SEQ ID N° 6, o cualquier porcentaje intermedio. La proteína insecticida o el fragmento insecticida está codificado por una molécula de polinucleótido aislada derivada de *B. thuringiensis*, y comprende una secuencia de polinucleótidos que presenta al menos aproximadamente 70%, aproximadamente
20 80%, aproximadamente 90% o aproximadamente 99%, o más identidad de secuencia, o cualquier porcentaje intermedio, o que hibridiza bajo condiciones estrictas, con una secuencia de polinucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID N° 3 y SEQ ID N° 5, o el complemento de ésta.

En aún otra realización, se proporciona una molécula de polinucleótido para
25 usar con el fin de obtener la expresión mejorada de una proteína insecticida en una planta. La proteína insecticida preferiblemente presenta actividad biológica de control de plagas de insectos coleópteros o hemípteros, o ambos, pero puede ser activa contra otros insectos plaga distintos de los coleópteros o los hemípteros, y puede estar codificada por una secuencia de nucleótidos diseñada para que se
30 exprese en una célula vegetal, tal como se detalla en SEQ ID N° 15 (TIC810) o SEQ ID N° 19 (ET37).

En la presente documentación se proporcionan otras secuencias de polinucleótidos que pueden usarse para obtener células vegetales transformadas en forma estable, que expresan una o más de las proteínas de la presente
35 invención. Estas secuencias de nucleótidos incluyen, sin limitaciones, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 19, SEQ ID N° 28, SEQ ID N° 31,

SEQ ID N° 34, SEQ ID N° 36, SEQ ID N° 38, SEQ ID N° 40, SEQ ID N° 43 y SEQ ID N° 46.

Se proporcionan secuencias de oligonucleótidos para usar en la identificación de secuencias de nucleótidos relacionadas en otras bacterias, y en particular, en otras cepas de bacterias *Bacillus*, incluyendo *Bacillus thuringiensis*,
5 *Bacillus laterosperous* y *Bacillus entomocidus*.

Se proporcionan proteínas insecticidas que comprenden, por ejemplo, las secuencias de aminoácidos indicadas en SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 14 y SEQ ID N° 47 (TIC127). En realizaciones
10 particulares, se proporciona SEQ ID N° 4 (TIC810) y SEQ ID N° 6 (TIC812) como proteínas accesorias, chaperonas, o proteínas que de otro modo estabilizan y mejoran la expresión y la acumulación de una segunda proteína, que se expresa al mismo tiempo que estas proteínas accesorias. TIC809, ET29 y ET37 son todas proteínas insecticidas que presentan mayores niveles de estabilidad, lo que
15 significa niveles de acumulación mejorados cuando se expresan ambos al mismo tiempo junto con una secuencia de aminoácidos TIC810 o TIC812. Estas secuencias pueden expresarse juntas en el mismo compartimiento subcelular, es decir, en el citoplasma, o mediante una inserción y una acumulación dirigida en el cloroplasto o el plástido de una célula vegetal, o pueden expresarse al mismo
20 tiempo para que se acumulen en distintos compartimientos subcelulares, tales como TIC810 en el citoplasma y ET29 o TIC809 con una inserción y una acumulación dirigida en el cloroplasto o el plástido de la planta. Además, la combinación de cualquiera de las proteínas TIC809, ET29 o ET37, junto con cualquiera de las proteínas TIC810 o TIC812, resulta en una composición que está
25 sorprendentemente estabilizada para obtener un nivel elevado de expresión y acumulación de componentes proteicos en células vegetales, y presenta actividad insecticida dirigida al control de plagas de plantas de los órdenes Coleoptera y Hemiptera. La combinación de proteínas también puede expresarse como un péptido de fusión, por ejemplo, tal como SEQ ID N° 47.

30 En otra realización, la presente invención se relaciona con un cultivo puro desde el punto de vista biológico de una cepa tipo salvaje de *B. thuringiensis* seleccionada del grupo que consiste en EG5078, a partir del cual se aísla la secuencia de polinucleótidos que se indica en SEQ ID N° 1, que codifica la proteína ET37, y SEQ ID N° 5, que codifica la proteína TIC812, y EG4096, a partir
35 del cual se aísla SEQ ID N° 3, que codifica la proteína TIC810, y SEQ ID N° 7, que codifica la proteína ET29. EG4096 y EG5078 han sido depositados en el

Laboratorio de Investigación Regional del Norte de la Colección Central del Servicio de Investigación Agrícola (NRRL), USDA, 1815 North University Street, Peoria, IL 61604, de acuerdo con el Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional de Depósitos de Microorganismos para Propósitos de
5 Procedimientos de Patentes, y se les han asignado los Números de acceso NRRL-B-21582 y NRRL-B-30841, respectivamente. EG4096 se depositó el 30 de Mayo de 1996, y EG5087 se depositó el 3 de Mayo de 2005.

La presente invención también se relaciona con una construcción de ADN recombinante que puede expresarse en una planta o una célula vegetal, que
10 comprende un cassette genético doble que expresa simultáneamente una primera secuencia de polinucleótidos y una segunda secuencia de polinucleótidos, donde la primera secuencia de polinucleótidos codifica una secuencia de polipéptido seleccionada del grupo que consiste en ET29, TIC809 y ET37, o fragmentos de ésta con actividad insecticida, y donde la segunda secuencia de polinucleótidos
15 codifica una secuencia de polipéptido seleccionada del grupo que consiste en TIC810 y TIC812, y fragmentos de ésta con actividad insecticida. La primera secuencia de polinucleótidos se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID N° 13 y SEQ ID N° 17, y la segunda secuencia de polinucleótidos se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID N° 15 y SEQ ID N° 19, donde la segunda secuencia
20 de polinucleótidos se co-expresa con la primera secuencia de polinucleótidos para potenciar o mejorar la expresión de la primera secuencia de polinucleótidos, y para facilitar la actividad insecticida dirigida para controlar infestaciones de insectos coleópteros y hemípteros que son plagas de plantas.

La presente invención también se relaciona con una célula huésped transformada para que contenga el vector de expresión o la construcción de ADN
25 recombinante de la presente invención, descrita en la presente documentación. La célula huésped puede seleccionarse del grupo que consiste en una célula bacteriana, una célula fúngica y una célula vegetal. En un aspecto de la realización, la célula huésped es una célula bacteriana, tal como una célula de *B. thuringiensis* que ha sido transformada para que contenga el vector de expresión de la presente invención. En otro aspecto de la realización, la célula huésped es una
30

célula vegetal transgénica transformada para que contenga la construcción de ADN recombinante de la presente invención. La construcción de ADN
35 recombinante puede comprender secuencias de polinucleótidos que codifican una combinación simultánea de dos de las cuatro proteínas, cuyas secuencias de

polipéptidos se indican en SEQ ID N° 14 (TIC809), SEQ ID N° 16 (TIC810), SEQ ID N° 18 (ET37) y SEQ ID N° 20 (TIC812). Las combinaciones de las proteínas preferidas pueden incluir TIC809 y TIC810, TIC809 y TIC812, ET37 y TIC810, y ET37 y TIC812, donde la co-expresión de la secuencia de polinucleótidos que codifica TIC810 o TIC812 con la secuencia de polinucleótidos que codifica TIC809 (o ET29) o ET37 resultará en (a) una mayor acumulación de TIC809 (o ET29) o la proteína ET37 en la célula vegetal, (b) un crecimiento celular normal, (c) una planta transgénica regenerada a partir de la célula vegetal huésped, (d) un fenotipo normal, y (e) mayores niveles de resistencia a insectos coleópteros y hemipteros.

La célula vegetal transgénica de la presente invención puede comprender una célula vegetal de maíz, una célula vegetal de trigo, una célula vegetal de centeno, una célula vegetal de cebada, una célula vegetal de avena, una célula vegetal de trigo sarraceno, una célula vegetal de sorgo, una célula vegetal de arroz, una célula vegetal de caña de azúcar, una célula vegetal de guisante, una célula vegetal de maní, una célula vegetal de cebolla, una célula vegetal de ajo, una célula vegetal de pasto (incluyendo pasto curvo, festuca, broma, Timothy, vergel, Bermuda, zoysia, y semejantes), una célula vegetal de *Arabidopsis*, una célula vegetal de brócoli, una célula vegetal de girasol, una célula vegetal de canola, una célula vegetal de arveja, una célula vegetal de garbanzo, una célula vegetal de poroto, una célula vegetal de café, una célula vegetal de soja, una célula vegetal de algodón, una célula vegetal de lino, una célula vegetal de coliflor, una célula vegetal de espárrago, una célula vegetal de lechuga, una célula vegetal de repollo, una célula vegetal de tabaco, una célula vegetal de especia (incluyendo curry, mostaza, salvia, perejil, pimienta, tomillo, cilantro, baya, comino, curcumina, nuez moscada, canela y semejantes), una célula vegetal de remolacha, una célula vegetal de papa, una célula vegetal de batata, una célula vegetal de zanahoria, una célula vegetal de nabo, una célula vegetal de apio, una célula vegetal de tomate, una célula vegetal de berenjena, una célula vegetal de pepino, una célula vegetal de zapallito o una célula vegetal de melón, y semejantes, una célula vegetal de un árbol frutal (incluyendo manzana, albaricoque, durazno, pera, ciruela, naranja, limón, lima y semejantes), una célula vegetal de un árbol productor de frutas secas (incluyendo bellota, nuez americana, Brasil, pecana, castaña, avellana y semejantes), una célula vegetal de uva, una célula vegetal de baya (incluyendo zarzamora, grosella, frutilla, arándano agrio y semejantes), y células vegetales de flores.

En otra realización, la presente invención se relaciona con una planta transgénica transformada para que contenga una construcción de ADN recombinante descrita en la presente documentación. La planta transgénica puede regenerarse a partir de la célula vegetal transgénica de la presente invención, o puede provenir de una semilla transgénica que se obtiene a partir de la planta transgénica regenerada o su descendencia. La planta transgénica se selecciona del grupo que consiste en una planta monocotiledónea y una planta dicotiledónea, que puede incluir monocotiledóneas, tales como maíz, trigo, centeno, cebada, avena, trigo sarraceno, sorgo, arroz, caña de azúcar, guisante, maní, cebolla, ajo, pasto, o dicotiledóneas, tales como girasol, canola, arveja, garbanzo, poroto, café, soja, algodón, lino, coliflor, espárrago, lechuga, repollo, tabaco, plantas productoras de especias (incluyendo curry, mostaza, salvia, perejil, pimienta, tomillo, cilantro, baya, comino, curcumina, nuez moscada, canela y semejantes), remolacha, papa, batata, zanahoria, nabo, apio, tomate, berenjena, pepino, zapallito o melón, y semejantes, un árbol frutal (incluyendo manzana, albaricoque, durazno, pera, ciruela, naranja, limón, lima y semejantes), un árbol productor de frutas secas (incluyendo bellota, nuez americana, Brasil, pecana, castaña, avellana y semejantes), uva, plantas productoras de bayas (incluyendo zarzamora, grosella, frutilla, arándano agrio y semejantes) y plantas florales.

En otra realización, la presente invención se relaciona con una semilla transgénica de la planta transgénica transformada para que contenga una construcción de ADN recombinante. La semilla transgénica puede ser de la planta transgénica que se regenera a partir de la célula vegetal transgénica de la presente invención, o puede ser de la descendencia de la planta transgénica regenerada, o de híbridos creados como resultado del cruzamiento o el cultivo de la planta transgénica con una planta no transgénica. En un aspecto, la semilla transgénica puede estar recubierta con un recubrimiento para semillas, donde la semilla comprende una composición herbicida, un recubrimiento fungicida para semillas, un recubrimiento bactericida para semillas, un recubrimiento insecticida para semillas, un recubrimiento de hormonas vegetales para semillas, un recubrimiento de nutrientes para semillas, un recubrimiento de inóculos microbianos para semillas, un recubrimiento colorante para semillas, un recubrimiento repelente de aves para semillas, un recubrimiento repelente de roedores para semillas, un recubrimiento de proteínas insecticida para semillas, un recubrimiento bacteriano para semillas que contiene una proteína insecticida, un recubrimiento de ARN de cadena simple para semillas, un recubrimiento de ARN

de cadena doble para semillas, un recubrimiento de micro ARN para semillas o un recubrimiento de ARN pequeño de interferencia para semillas. Un medio para permitir y estabilizar un recubrimiento para semillas que comprende estas composiciones de ARN de cadena simple o doble comprende combinar estas moléculas de ARN con moléculas de ARN complementarias, de modo que los híbridos moleculares de ADN-ARN estabilizados se presentan en la composición de recubrimiento para semillas, lo que permite la presentación del ARN de cadena doble o el ARN de cadena simple a una plaga que se alimenta con la semilla, o al microambiente dentro del reino de la semilla en brotación o las micro-raíces de un brote emergente en brotación, una vez que germina la semilla recubierta.

De acuerdo con una realización de la presente invención, se proporciona un método para generar una planta resistente a una infestación por insectos coleópteros y/o hemípteros, que comprende los pasos de:

- a) insertar en el genoma de una célula vegetal una primera molécula de ácido nucleico, que funciona en la planta para codificar una primera proteína seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID N° 14 (TIC809) y SEQ ID N° 18 (ET37), y una segunda molécula de ácido nucleico, que funciona en la planta para codificar una segunda proteína seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID N° 16 (TIC810) y SEQ ID N° 20 (TIC812);
- b) obtener la célula vegetal que contiene las moléculas de ácidos nucleicos del paso (a); y
- c) regenerar una planta transgénica que expresa ambas proteínas a partir de la célula vegetal, donde la planta transgénica presenta resistencia a coleópteros y/o hemípteros plaga, en comparación con una planta que carece dichas moléculas.

En otra realización, en la presente invención también se provee un método para controlar una infestación por insectos coleópteros y/o hemípteros plaga en una planta, que comprende introducir en la dieta del insecto plaga una planta, un tejido vegetal o células vegetales que expresan una proteína TIC809, ET2, o una proteína ET37 junto con una proteína TIC810 o TIC812.

El polinucleótido y las composiciones de polipéptidos y los métodos descritos en la presente documentación serán particularmente beneficiosos cuando se los use contra insectos plaga coleópteros y hemípteros seleccionados del grupo de familias de coleópteros que consiste en Chrysomelidae, Cucujidae, Scarabaeidae, Trogositidae, Tenebrionidae, Curculionidae, Elateridae y Bruchidae, y miembros del orden Hemiptera, incluyendo específicamente los miembros de los subórdenes Heteroptera y Homoptera. En un aspecto de la invención, los insectos

coleópteros son aquellos de la familia Chrysomelidae. Los ejemplos de insectos coleópteros en la familia Chrysomelidae pueden incluir aquellos del género *Diabrotica*, incluyendo *D. virgifera* (WCR), *D. undecempunctata* (SCR), *D. barberi* (NCR), *D. virgifera zeae* (MCR), *D. balteata* (BZR), y el complejo de la oruga de la raíz del maíz del Brasil (BCR), que consiste en *D. viridula* y *D. speciosa*.

Es posible construir una molécula con una secuencia de ácido nucleico que incorpore una tercera secuencia genética estructural que codifique un tercer agente (un ARN de cadena doble o una proteína), como un medio para introducir en la misma planta un carácter agrícola adicional que presente una actividad dirigida al control de más de una plaga de plantas, tal como el control de insectos coleópteros y/o hemípteros, y un carácter adicional de resistencia a insectos lepidópteros, resistencia a infestaciones bacterianas, virales o fúngicas, resistencia a nematodos, o para proporcionar un carácter suplementario, tal como un carácter de resistencia a herbicidas, un carácter de rendimiento, un carácter de estrés, un carácter de alimentación o un carácter de que resulta en la mejora del proceso de alimentación, y semejantes. El método puede consistir en los pasos de insertar en el genoma de una célula vegetal una primera molécula de ácido nucleico que codifica una proteína que se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID N° 14 (TIC809) y SEQ ID N° 18 (ET37). La primera molécula de ácido nucleico está unida a una segunda molécula de ácido nucleico que codifica una proteína seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID N° 16 (TIC810) y SEQ ID N° 20 (TIC812). Una tercera molécula que se introduce en el genoma de la planta codifica un agente que provee un carácter agrícola que es distinto de los proporcionados por la primera y la segunda molécula de ácido nucleico, incluyendo, sin limitaciones, resistencia a insectos lepidópteros, resistencia a infestaciones bacterianas, virales o fúngicas, resistencia a nematodos, o para proporcionar un carácter suplementario, tal como un carácter de resistencia a herbicidas, un carácter de rendimiento, un carácter de estrés, un carácter de mejora de la alimentación o un carácter de que resulta en la mejora del proceso de alimentación, y semejantes

Además de proporcionar las proteínas de la presente invención en una composición para controlar infestaciones de insectos plaga de los órdenes Coleoptera o Hemiptera, también se contempla específicamente una secuencia de polinucleótidos que se transcribe en una molécula de ácido ribonucleico (ARN) que, cuando es ingerida por un invertebrado plaga, funciona controlando la infestación del invertebrado plaga, mediante la inhibición de una función biológica

en la plaga, como un segundo modo de acción o como una característica de manejo de la resistencia a insectos de la composición. La molécula de ARN puede comprender una molécula de ARN de cadena doble, una molécula de ARN de cadena simple, una molécula de ARN pequeño de interferencia o una molécula de ARNss, y debería ser específica para inhibir un gen esencial de un insecto plaga, tal como una plaga atacada por las composiciones de la presente invención.

Las composiciones y los métodos descritos en la presente invención proporcionan diversas ventajas respecto de la técnica previa, incluyendo aquellas detalladas específicamente con anterioridad. Estas ventajas pueden incluir: obtener un control mejorado de insectos plaga susceptibles, incluyendo no solamente aquellos que infestan plantas, obtener una mayor cantidad de líneas de plagas resistentes a insectos comercialmente viables; obtener una protección durante toda una temporada contra insectos patogénicos; e incrementar la incidencia de plantas transformadas con morfología normal.

15 DESCRIPCIÓN DE LAS SECUENCIAS

SEQ ID N° 1 es una secuencia de polinucleótidos de *B. thuringiensis* que codifica una proteína insecticida ET37.

SEQ ID N° 2 es una secuencia de aminoácidos ET37 codificada por la secuencia de polinucleótidos que se indica en SEQ ID N° 1.

20 SEQ ID N° 3 es una secuencia de polinucleótidos que codifica una proteína insecticida TIC810.

SEQ ID N° 4 es una secuencia de aminoácidos TIC810 codificada por la secuencia de polinucleótidos que se indica en SEQ ID N° 3.

25 SEQ ID N° 5 es una secuencia de polinucleótidos de *B. thuringiensis* que codifica una proteína TIC812.

SEQ ID N° 6 es una secuencia de aminoácidos TIC812 codificada por la secuencia de polinucleótidos que se indica en SEQ ID N° 5.

SEQ ID N° 7 es una secuencia de polinucleótidos de *B. thuringiensis* que codifica una proteína ET29.

30 SEQ ID N° 8 es una secuencia de aminoácidos ET29 codificada por la secuencia de polinucleótidos que se indica en SEQ ID N° 7.

SEQ ID N° 9 es una secuencia de polinucleótidos de *B. thuringiensis* que codifica TIC810, desde el nucleótido en la posición 1 hasta el nucleótido en la posición 657, y que codifica ET29, incluyendo los nucleótidos entre las posiciones 716 y 1411.

35

SEQ ID N° 10 es una secuencia de polinucleótidos de *B. thuringiensis* que codifica TIC812, incluyendo los nucleótidos entre las posiciones 1 y 657, y que codifica ET37, incluyendo los nucleótidos entre las posiciones 716 y 1411.

5 SEQ ID N° 11 es una secuencia de polinucleótidos que codifica TIC810, desde el nucleótido en la posición 1 hasta el nucleótido en la posición 657, y que codifica ET37, incluyendo los nucleótidos entre las posiciones 716 y 1411.

SEQ ID N° 12 es una secuencia de polinucleótidos que codifica TIC812, incluyendo los nucleótidos entre las posiciones 1 y 657, y que codifica ET29, incluyendo los nucleótidos entre las posiciones 716 y 1411.

10 SEQ ID N° 13 es una secuencia de polinucleótidos construida para expresar en una célula vegetal, que codifica una proteína TIC809.

SEQ ID N° 14 es una secuencia de aminoácidos TIC809 codificada por la secuencia de polinucleótidos que se indica en SEQ ID N° 13.

15 SEQ ID N° 15 es una secuencia de polinucleótidos construida para expresar en una célula vegetal, que codifica una proteína TIC810.

SEQ ID N° 16 es una secuencia de aminoácidos TIC810 codificada por la secuencia de polinucleótidos que se indica en SEQ ID N° 15.

SEQ ID N° 17 representa una secuencia de polinucleótidos construida para expresar en una célula vegetal, que codifica una proteína ET37.

20 SEQ ID N° 18 es una secuencia de aminoácidos ET37 codificada por la secuencia de polinucleótidos que se indica en SEQ ID N° 19.

SEQ ID N° 19 es una secuencia de polinucleótidos construida para expresar en una célula vegetal, que codifica una proteína TIC812.

25 SEQ ID N° 20 es una secuencia de aminoácidos TIC812 codificada por la secuencia de polinucleótidos que se indica en SEQ ID N° 17.

SEQ ID N° 21 es un cebador de amplificación térmica para usar en la amplificación de una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos TIC810, y se conoce en la presente documentación como pr370.

30 SEQ ID N° 22 es un cebador de amplificación térmica para usar en la amplificación de una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos TIC810, y se conoce en la presente documentación como pr371.

SEQ ID N° 23 es un cebador de amplificación térmica para usar en la amplificación de una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos TIC810, y se conoce en la presente documentación como pr375.

SEQ ID N° 24 es un cebador de amplificación térmica para usar en la amplificación de una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos TIC810, y se conoce en la presente documentación como pr376.

5 SEQ ID N° 25 es un cebador de amplificación térmica para usar en la amplificación de una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos ET29, y se conoce en la presente documentación como pr365.

SEQ ID N° 26 es un cebador de amplificación térmica para usar en la amplificación de una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos ET29, y se conoce en la presente documentación como pr372.

10 SEQ ID N° 27 es un cebador de amplificación térmica para usar en la amplificación de una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de operón TIC810_ET29 o TIC812_ET37, y se conoce en la presente documentación como pr421.

15 SEQ ID N° 28 es una secuencia de nucleótidos sintética presente en el vector de transformación pMON64138, que consiste en un primer cassette de expresión para plantas que codifica una proteína TIC809 y un segundo cassette de expresión para plantas que codifica una proteína TIC810.

SEQ ID N° 29 es una secuencia de aminoácidos TIC809 codificada por el primer cassette de expresión para plantas que se indica en SEQ ID N° 28.

20 SEQ ID N° 30 es una secuencia de aminoácidos TIC810 codificada por el segundo cassette de expresión para plantas que se indica en SEQ ID N° 28.

25 SEQ ID N° 31 es una secuencia de nucleótidos sintética presente en pMON64139, que consiste en un primer cassette de expresión para plantas que codifica una TIC809 dirigida al cloroplasto y un segundo cassette de expresión para plantas que codifica una TIC810 dirigida al cloroplasto.

SEQ ID N° 32 es una secuencia de aminoácidos TIC809 codificada por el primer cassette de expresión para plantas que se indica en SEQ ID N° 31.

SEQ ID N° 33 es una secuencia de aminoácidos TIC810 codificada por el segundo cassette de expresión para plantas que se indica en SEQ ID N° 31.

30 SEQ ID N° 34 es una secuencia de nucleótidos sintética presente en pMON70513, y consiste en un cassette de expresión para plantas que codifica una secuencia de aminoácidos TIC809.

SEQ ID N° 35 es una secuencia de aminoácidos TIC809 codificada por el cassette de expresión para plantas que se indica en SEQ ID N° 34.

SEQ ID N° 36 es una secuencia de nucleótidos sintética presente en pMON70514, y consiste en un cassette de expresión para plantas que codifica una secuencia de aminoácidos TIC809 dirigida al cloroplasto.

5 SEQ ID N° 37 es una secuencia de aminoácidos TIC809 codificada por el cassette de expresión para plantas que se indica en SEQ ID N° 36.

SEQ ID N° 38 es una secuencia de nucleótidos sintética presente en pMON64144, y consiste en un cassette de expresión para plantas que codifica una secuencia de aminoácidos TIC809 dirigida al cloroplasto.

10 SEQ ID N° 39 es una secuencia de aminoácidos TIC809 codificada por el cassette de expresión para plantas que se indica en SEQ ID N° 38.

SEQ ID N° 40 es una secuencia de nucleótidos sintética presente en pMON64150, y consiste en un primer cassette de expresión para plantas que codifica una secuencia de aminoácidos TIC809 dirigida al cloroplasto y un segundo cassette de expresión para plantas que codifica una secuencia de aminoácidos TIC810 dirigida al cloroplasto.

SEQ ID N° 41 es una secuencia de aminoácidos TIC809 codificada por el primer cassette de expresión para plantas que se indica en SEQ ID N° 40.

SEQ ID N° 42 es una secuencia de aminoácidos TIC810 codificada por el segundo cassette de expresión para plantas que se indica en SEQ ID N° 40.

20 SEQ ID N° 43 es una secuencia de nucleótidos sintética presente en pMON64151, y consiste en un primer cassette de expresión para plantas que codifica una secuencia de aminoácidos TIC809 y un segundo cassette de expresión para plantas que codifica una secuencia de aminoácidos TIC810.

25 SEQ ID N° 44 es una secuencia de aminoácidos TIC809 codificada por el primer cassette de expresión para plantas que se indica en SEQ ID N° 43.

SEQ ID N° 45 es una secuencia de aminoácidos TIC810 codificada por el segundo cassette de expresión para plantas que se indica en SEQ ID N° 43.

30 SEQ ID N° 46 es una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido TIC127, que corresponde a una fusión entre TIC809 (codificada por los nucleótidos en las posiciones 1-696) y TIC810 (codificada por los nucleótidos en las posiciones 754-1407), donde se ha introducido una secuencia conectora corta (codificada por los nucleótidos en las posiciones 697-753) para permitir que las dos proteínas se separen por proteólisis después de expresarse en una célula vegetal (o al ser ingeridas, dentro del intestino de un insecto plaga blanco).

35 SEQ ID N° 47 es una secuencia de aminoácidos TIC127.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA PRESENTE INVENCION

En la presente documentación se proporcionan secuencias de polinucleótidos derivadas de *B. thuringiensis*, que codifican proteínas ET29, ET37, TIC809, TIC810 y TIC812, así como una fusión entre el derivado de ET29 TIC809 y TIC810. También se proporcionan secuencias de nucleótidos sintéticas, construidas para expresar en plantas, que codifican secuencias de aminoácidos ET29, TIC809, ET37, TIC810 y TIC812, así como la proteína de fusión TIC127 entre TIC809 y TIC810. También se describen métodos para preparar y usar las secuencias de polinucleótidos en el desarrollo de plantas transgénicas y células vegetales que son resistentes a infestaciones de insectos coleópteros y hemípteros. Las proteínas también se proporcionan como composiciones insecticidas, en formulaciones para aplicación tópica en diversos ambientes agrícolas o animales, o como composiciones insecticidas producidas por una célula huésped preferida, tal como una célula bacteriana, una célula vegetal o una levadura o una célula fúngica. En referencia al término "derivada", se interpreta que una secuencia puede aislarse directamente a partir de una fuente particular, o después de aislarla a partir de una fuente particular, es posible modificar esta secuencia de nucleótidos para que codifique una proteína sustancialmente igual a la secuencia que fue aislada de una fuente particular. Como alternativa, una secuencia de aminoácidos puede ser sustancialmente la misma que una secuencia de aminoácidos aislada a partir de una fuente particular, o codificada por una secuencia de nucleótidos particular. Una secuencia de aminoácidos puede ser una quimera de una cantidad de secuencias de aminoácidos diferentes aisladas individualmente a partir de una fuente particular, donde se han agrupado unos con otros diversos segmentos de estas secuencias de aminoácidos diferentes para producir la quimera. En este sentido, la quimera deriva de cada una de las diversas secuencias de aminoácidos. De forma similar, una secuencia de nucleótidos puede derivar de otras secuencias de nucleótidos. Una secuencia de nucleótidos puede derivar de otra secuencia de nucleótidos como consecuencia de su producción, o cuando ha sido obtenida usando como referencia a una o más secuencias de nucleótidos alternativas. De forma similar, pueden obtenerse o producirse secuencias de aminoácidos usando como referencia una o más secuencias de aminoácidos alternativas, y por consiguiente, puede derivársela de este modo.

Las secuencias de polinucleótidos sintéticas de la presente invención preferiblemente están diseñadas para la expresión *in planta* de proteínas

insecticidas en tejidos vegetales y células vegetales. En particular, las proteínas insecticidas de la presente invención se conocen como proteínas ET29, ET37, TIC809, TIC810, TIC812 y TIC127. Una secuencia de aminoácidos de cualquiera de estas proteínas se incluye dentro del alcance de la presente invención, siempre que presente una actividad insecticida al menos equivalente a la de la proteína completa de la que deriva.

En una realización, la presente invención se relaciona con un cultivo puro desde el punto de vista biológico de una bacteria *B. thuringiensis*, que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica una o más de las proteínas descritas en la presente documentación. En particular, las secuencias de nucleótidos son aquellas indicadas en SEQ ID N° 1, que codifica ET37 (SEQ ID N° 2), SEQ ID N° 3, que codifica TIC810 (SEQ ID N° 4), SEQ ID N° 5, que codifica TIC812 (SEQ ID N° 6), y SEQ ID N° 7, que codifica ET29 (SEQ ID N° 8). En la presente documentación también se contemplan y se incluyen específicamente fusiones, tales como TIC127 (SEQ ID N° 46, que codifica SEQ ID N° 47). Un cultivo puro desde el punto de vista biológico también puede incluir aquellos que han sido transformados con una secuencia de polinucleótidos de la presente invención, o con dos o más secuencias de polinucleótidos, donde al menos una primera secuencia de polinucleótidos se selecciona del grupo que consiste en una secuencia codificante ET37 y una secuencia codificante ET29, y al menos una segunda secuencia de polinucleótidos que se selecciona del grupo que consiste en una secuencia codificante TIC810 y una secuencia codificante TIC812. Se han depositado ejemplos de cepas bacterianas, es decir, EG4096 y EG5078, en el Laboratorio de Investigación Regional del Norte de la Colección Central del Servicio de Investigación Agrícola (NRRL), USDA, 1815 North University Street, Peoria, IL 61604, de acuerdo con el Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional de Depósitos de Microorganismos para Propósitos de Procedimientos de Patentes, y se les han asignado los números de acceso indicados en la Tabla 1.

Tabla 1. Ejemplos de cepas de *B. thuringiensis*

Cepa Bt	Naturaleza de las cepas	Toxinas contenidas	Números NRRL	Fechas de depósito
EG4096	Tipo salvaje	ET29, TIC810	NRRL-B-21582	30 de Mayo de 1996
EG5078	Tipo salvaje	ET37, TIC812	NRRL B-30841	3 de Mayo de 1996

La secuencia de polinucleótidos de ocurrencia natural (nativa) que codifica ET37 se detalla en SEQ ID N° 1. Esta secuencia presenta aproximadamente 99% de identidad de secuencia con la secuencia de polinucleótidos que codifica una proteína insecticida ET29, como se describe en la Patente de los EEUU N° 6093695, y como se describe en la presente documentación como SEQ ID N° 7. La secuencia de aminoácidos ET37, codificada por SEQ ID N° 1, se detalla en SEQ ID N° 2. En la presente documentación, la actividad insecticida de la proteína ET37 se demuestra en ensayos biológicos, usando insectos coleópteros del género *Diabrotica*, incluyendo WCR y SCR, e insectos hemípteros del género *Lygus*. En el curso de la realización de análisis de secuencia de los plásmidos extra-cromosómicos en los que se localizan las secuencias codificantes ET37 y ET29 en las cepas respectivas, se identificó un único marco abierto de lectura río arriba de cada uno de los marcos abiertos de lectura ET37 y ET29, donde estos corresponden, respectivamente, a secuencias que codifican las proteínas TIC812 y TIC810. La molécula de polinucleótido nativa (SEQ ID N° 3) que codifica una proteína TIC810 (SEQ ID N° 4) se localiza inmediatamente río arriba de la secuencia codificante ET29 en la cepa de *B. thuringiensis* EG4096. La molécula de polinucleótido nativa (SEQ ID N° 5) que codifica una proteína TIC812 (SEQ ID N° 6) se localiza inmediatamente río arriba de la secuencia codificante ET37 en la cepa de *B. thuringiensis* EG5078.

ET29, ET37, TIC810 y TIC812 están todas relacionadas en forma distante con la familia de toxinas insecticidas Cyt; sin embargo, desde una perspectiva filogenética, las proteínas ET29 y 37 son mucho más cercanas entre sí que otras proteínas Cyt, y las proteínas TIC810 y 812 también son mucho más cercanas entre sí que otras proteínas Cyt. La secuencia de aminoácidos ET37 comparte aproximadamente 99% de similitud de secuencia con ET29. TIC810 y TIC812 comparten aproximadamente 97% de similitud de secuencia de aminoácidos entre sí. TIC810 presenta aproximadamente 33% de similitud de secuencia de aminoácidos con ET29 y ET37. De forma similar, la proteína TIC812 presenta aproximadamente 32% de similitud de secuencia de aminoácidos con ET29 y ET37. La comparación de similitud se basa en alineamientos por pares de las proteínas, usando el conjunto Wisconsin versión 10.3, Accelrys Inc., San Diego, CA.

De acuerdo con la presente invención, determinadas combinaciones de expresión de las proteínas TIC810, TIC812, ET37 y ET29 en una célula huésped funcionan para obtener un nivel elevado deseado de acumulación de una proteína

insecticida en la célula huésped, lo que resulta en una actividad insecticida mejorada dirigida a determinados insectos plaga coleópteros y hemípteros blanco. Es posible co-expresar una secuencia de polinucleótidos que codifica ET29 con una secuencia de polinucleótidos que codifica una proteína TIC810 para obtener una expresión y/o una acumulación mejorada de la proteína insecticida ET29 en una célula huésped. De forma similar, es posible co-expresar una secuencia de polinucleótidos que codifica ET37 con una secuencia de polinucleótidos que codifica TIC812, para obtener una expresión y/o una acumulación mejorada de la proteína insecticida ET37 en una célula huésped. Se contempla la posibilidad de intercambiar TIC812 por TIC810 como agente insecticida, y como una chaperona o una proteína accesoria requerida para la estabilización, la acumulación y la actividad biológica sobre un mayor rango de huéspedes de ET37 o ET29. La co-expresión de TIC810 o TIC812 junto con ET37 o ET29 resulta en la expresión y/o la acumulación mejorada de ET37 o ET29. En la presente documentación, estas combinaciones se conocen como composiciones insecticidas estabilizadas. Además, las composiciones estabilizadas presentan un rango de huéspedes más amplio, al menos con referencia a su eficacia insecticida dirigida a insectos coleópteros y hemípteros plaga, que cualquiera de los componentes individuales de las composiciones. Una célula recombinante que comprende una proteína consiste en ET37 o ET29, y una segunda proteína que consiste en TIC810 o TIC812, presenta niveles incrementados de acumulación de ET29/ET37, provee niveles de resistencia a insectos coleópteros y hemípteros que anteriormente no podían obtenerse con las proteínas insecticidas ET37 y ET29, y resulta en un ausencia de morfologías y/o fenotipos anormales en la célula o el organismo que consiste en estas células recombinantes, todos en comparación con una cantidad que expresa ET29 o ET37 en ausencia de TIC810 o TIC812.

Las combinaciones insecticidas anteriores también pueden expresarse en una planta junto con al menos una proteína insecticida adicional, diferente de cualquier proteína incluida en la combinación, que presente un modo de acción diferente del de cualquiera de las proteínas incluidas en la combinación, y que sea tóxica para la misma especie de insecto que las proteínas de la combinación. Esta segunda combinación, que incluye la proteína insecticida adicional, provee un medio para manejar la resistencia de insectos coleópteros. Estas proteínas adicionales incluyen, sin limitaciones, las toxinas para coleópteros Cry3Bb y sus variantes, Cry22A, TIC901, TIC1201, TIC407, TIC417, CryET70, las toxinas binarias PS149B1, ET33/34 y ET80/76, y otras proteínas diversas de las que se ha

demostrado que presentan actividad insecticida contra coleópteros, tales como patatinas, variantes de Cry3Aa y composiciones insecticidas no específicas que pueden aislarse a partir de especies de bacterias, tales como *Xenhorabdus* y *Photorhabdus*.

5 Cada proteína ET29 o ET37 puede combinarse con TIC810 o TIC812, y co-expresarse en una planta con un agente que presenta actividad insecticida dirigida contra una especie de insecto plaga distinto de los coleópteros, para obtener el control deseado de más de un tipo de plaga común seleccionada del grupo que consiste en insectos plaga lepidópteros e insectos plaga hemípteros. Además,
10 estas combinaciones aún podrían combinarse con otros agentes que fueran efectivos para controlar plagas virales, plagas bacterianas, plagas fúngicas y semejantes. Los agentes contemplados en estas combinaciones pueden expresarse junto con la combinación ET29/ET37 y TIC810/TIC812, o pueden proporcionarse mediante la aplicación de agentes insecticidas o plaguicidas en
15 una formulación aceptable para el uso agrícola, tal vez con un vehículo, tal como un emoliente, un coloide, un rocío, un polvo, una mezcla o un polvillo. En situaciones en que las composiciones pudieran ser útiles para controlar plaga de animales, tales como pulgas, garrapatas, piojos, ácaros y semejantes, sería útil incluir, junto con la combinación ET29/ET37 y TIC810/TIC812, un agente que
20 fuera efectivo para controlar plagas iguales o diferentes a las cuales estuviera dirigida la combinación, por lo que estas aplicaciones deberían proporcionarse en una formulación aceptable para el uso farmacéutico. Se contempla el uso de las formulaciones particulares de las combinaciones insecticidas de la presente invención en una aplicación tópica y/o sistémica sobre campos de cultivo, pastos,
25 frutas y verduras, y plantas ornamentales. En una realización, la composición insecticida comprende una suspensión que fluye en aceite de células bacterianas que expresan una o más de las nuevas proteínas insecticidas descriptas en la presente documentación. Los ejemplos de células incluyen las cepas de *B. thuringiensis* EG4096, EG5078, sIC8134 o sIC8135; sin embargo, sería útil cualquier célula huésped bacteriana de este tipo, tal como *B. megaterium*, *B. subtilis*, *E. coli*, o *Pseudomonas* spp., que expresara una composición insecticida.
30

Las composiciones insecticidas de la presente invención pueden combinarse con otros métodos de biotecnología, tales como la tecnología de supresión genética mediada por ADN de cadena doble, para obtener el control
35 deseado de una o más plagas de una planta particular. Las secuencias nucleótidos específicas, seleccionadas entre las secuencias nativas de las células

de una plaga particular que participan en una vía biológica esencial, se expresan en una célula vegetal, de modo que se obtiene la formación de un ARN de cadena doble, o aún un ARN de cadena doble estabilizado. De este modo, una vez que la plaga ingiere una cantidad efectiva como plaguicida del ARN, es decir, una o más células vegetales que expresan el ARN de cadena doble que deriva de las células de dicha plaga, se obtiene la supresión de una o más vías biológicas esenciales en la plaga. Junto con el ARN de cadena doble, la plaga ingiere una cantidad efectiva como plaguicida de las composiciones insecticidas descritas en la presente documentación, lo que resulta en la provisión de un sistema efectivo para el manejo de la resistencia de los insectos o las plagas, con el que se evita la probabilidad de inicio de resistencia, debido a que los dos agentes plaguicidas operan con modos de acción diferentes. Una célula vegetal recombinante particular, que expresa una composición que corresponde a las proteínas insecticidas contra coleópteros y hemípteros de la presente invención, también pueden expresar, como moléculas de ARN de cadena doble, una o más secuencias derivadas del genoma de un coleóptero plaga blanco, y una o más secuencias derivadas del genoma de un hemípteros plaga blanco, lo que resulta en la obtención de múltiples cantidades efectivas como insecticidas de las proteínas de la presente invención, y de los ARN de cadena doble diseñados para la supresión de uno o más genes esenciales en los coleópteros y/o hemípteros plaga blanco. Las plantas que consisten en el gen que codifica una o más de las proteínas de la presente invención, solas o en combinación con agentes para controlar plagas adicionales, tales como agentes de ARNs, presentan un rendimiento y una tolerancia a la sequía mejorada, en comparación con las plantas que carecen de estos agentes plaguicidas. Esto puede deberse a que estos caracteres resultan en masas radicales estabilizadas, que son más uniformes, fuertes y saludables, y proporcionan una mayor contenido de nutrientes y una mayor capacidad de recolección de humedad, en comparación con las masas radicales que carecen de estos agentes.

Es posible sintetizar una proteína quimérica en la que se fusione una secuencia que codifique ET29 o ET37, y una secuencia que codifique TIC810 o TIC812, para obtener la expresión de la composición insecticida estabilizada como una proteína individual. Se contempla que la proteína quimérica pueda no estar estabilizada, o que pueda no presentar actividad biológica insecticida, a menos que los dos péptidos fusionados estén separados. Esta separación física puede obtenerse incluyendo, como espaciador entre las proteínas, una secuencia

peptídica única que sea el blanco de cualquier cantidad de proteasas conocidas en la técnica. La proteína quimérica también puede estar unida a otras secuencias que afecten la estabilidad de la quimera, lo que resultará en la formación de una forma cristalina o un cuerpo de inclusión, que consistirá sustancialmente en el péptido quimérico-de fusión, y en la exclusión de otras composiciones, péptidos o moléculas contaminantes. Se presentan ejemplos de estas quimeras o fusiones en el Ejemplo 11 de la presente documentación, como TIC127 (fusión consecutiva de TIC809 y TIC810 unidas por un péptido corto) y TIC128 (fusión consecutiva de TIC810 y TIC809), y de las que se ha demostrado que presentan actividad biológica insecticida contra coleópteros y hemípteros.

También se proporcionan vectores de expresión para usar en una célula huésped. En diversas realizaciones, se proporcionan vectores de expresión que comprenden secuencias que resultan en la expresión de una combinación de al menos dos de las secuencias de polinucleótidos descritos en la presente documentación. En una realización, un vector de expresión es una molécula de polinucleótido aislada y purificada que comprende una combinación de dos secuencias de polinucleótidos diferentes, donde cada secuencia contiene un promotor funcional en una célula huésped deseada, que está unido operativamente a un segmento de nucleótido que codifica una proteína TIC809, TIC810, TIC812, ET29 o ET37. En algunas realizaciones, es posible incluir una secuencia de terminación de la transcripción y poliadenilación 3' del segmento de nucleótidos que codifica una de estas proteínas.

Se proporcionan vectores de expresión para usar en una célula huésped bacteriana, por ejemplo, en una célula de *E. coli* o una célula de *Bacillus*, incluyendo una de *B. thuringiensis*, *B. megaterium*, *B. subtilis*, o de una especie de *Bacillus* relacionada. Los vectores de expresión para células huésped bacterianas pueden contener una secuencia de nucleótidos que expresa una o más de las proteínas de la presente invención en serie, prácticamente del mismo modo que pueden expresarse las proteínas en la mayor parte de las células bacterianas, es decir, en un cassette de expresión policistónico. Como alternativa, un vector de expresión bacteriano puede consistir en una secuencia de nucleótidos que codifica solamente una de las proteínas de la presente invención.

Los promotores que funcionan en bacterias son bien conocidos en la técnica. Un ejemplo de un promotor para las proteínas cristalinas de *Bacillus* puede incluir cualquiera de los promotores de genes de proteínas cristalinas, incluyendo el promotor del gen ET29 (Patente de los EEUU N° 6093695) y

promotores específicos para los factores sigmas de *B. thuringiensis* (Baum y Malvar, *Molec. Microbiol.*, 18(1): 1-12, 1995). Como alternativa, aquellos entrenados en la técnica pueden modificar promotores de genes mutagenizados o recombinantes que codifican proteínas cristalinas, y pueden usarlos para
5 promover la expresión de las nuevas secuencias de polinucleótidos descritas en la presente documentación. Para el propósito de la presente invención, el promotor usado en la presente documentación para expresar las secuencias de polinucleótidos es el promotor cry1A.

Se proporcionan construcciones de ADN recombinante para expresar en
10 una célula vegetal. Estas construcciones típicamente contienen dos o más cassettes de expresión funcionales en plantas, que están unidos unos con otros de modo tal que se obtenga la introducción simultánea de los dos o más cassettes de expresión en el mismo locus del genoma de una planta, o como alternativa, pueden contener dos o más cassettes de expresión funcionales en planta que
15 están unidos dentro de la construcción o el vector, pero que pueden introducirse independientemente en distintos loci dentro del genoma de una planta. Estos cassettes de expresión pueden conocerse como un primer y un segundo cassette de expresión, que expresan respectivamente una primera secuencia de polinucleótidos, que codifica una primera proteína, y una segunda secuencia de
20 polinucleótidos, que codifica una segunda proteína. Se contempla que la primera proteína pueda ser cualquiera de las proteínas descritas en la presente documentación, y la segunda proteína puede ser cualquiera de las otras proteínas descritas en la presente documentación distintas de la primera proteína. Se proporcionan ejemplos de secuencias de polinucleótidos en SEQ ID N° 13, SEQ ID
25 N° 15, SEQ ID N° 17 y SEQ ID N° 19.

Los promotores usados en la construcción del ADN recombinante de la presente invención deberían presentar la capacidad de dirigir la expresión de las secuencias de polinucleótidos que codifican los agentes insecticidas, cuando se los introduce en células vegetales. Los promotores que son útiles para expresar
30 las secuencias de polipéptidos en plantas pueden ser promotores inducibles, constitutivos, con especificidad tisular o con especificidad por una etapa del desarrollo, para usar en una planta monocotiledónea o dicotiledónea. En una realización, el promotor seleccionado para usar puede ser un promotor constitutivo, y para el propósito de la presente invención, el promotor puede
35 comprender específicamente un promotor del virus en mosaico de la coliflor (CaMV 35S) mejorado. En otra realización, el promotor seleccionado puede ser un

promotor con especificidad tisular, y para el propósito de la presente invención, el promotor puede comprender específicamente un promotor específico para raíz Rcc3 aislado de arroz (Solicitud de Patente de los EEUU con N° de Acta 11\075113).

5 Un vector o una construcción también puede incluir elementos que funcionen en la regulación del nivel y el cronograma de expresión del gen de interés al que están unidos, además de uno o más promotores. Por ejemplo, la construcción puede incluir la secuencia de un intrón. La secuencia de intrón empleada en la presente invención puede incluir un intrón de actina de arroz
10 (Patente de los EEUU N° 5641876). La construcción de ADN recombinante también puede tener una secuencia directriz de la traducción entre el promotor y la secuencia codificante. El vector o la construcción también puede incluir, dentro de la región codificante de interés, una secuencia de ácido nucleico que actúa, por completo o en parte, en la terminación de la transcripción de dicha región. En una
15 realización, la secuencia de poliadenilación de la presente invención puede ser de la región 3' no traducida de un gen de proteína de ataque calórico de trigo (tahsp17).

Una construcción de ADN recombinante también puede incluir otros elementos. Por ejemplo, la construcción puede contener segmentos de ADN que
20 proporcionen la función de replicación, y uno o más marcadores de selección para usar en células bacterianas. La construcción también puede comprender un marcador de análisis, un marcador de selección y otros elementos apropiados para seleccionar la planta o las células bacterianas con las construcciones de ADN recombinante de la invención. Las construcciones de ADN recombinante están
25 diseñadas con marcadores de selección apropiados, que pueden conferir tolerancia a antibióticos o herbicidas a la célula. Las secuencias de polinucleótidos de tolerancia a antibióticos incluyen, sin limitaciones, secuencias de polinucleótidos que codifican proteínas que participan en la tolerancia a kanamicina, neomicina, higromicina y otros antibióticos conocidos en la técnica. Es
30 posible reemplazar un gen de tolerancia a antibiótico en uno de estos vectores por un gen de tolerancia a herbicidas que codifica 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintetasa (EPSPS, descrita en las Patentes de los EEUU N° 5627061 y 5633435; Padgett et al. Herbicide Resistant Crops, Lewis Publishers, 53-85, 1996), u otros genes marcadores de selección y sus equivalentes, tales como tolerancia a basta,
35 tolerancia a bar, resistencia a metotrexato, glifosato oxidorreductasa, glifosato acetil transferasa, fosfonato acetilasa (*phnO* y alelos derivados de

Enterobacteriaceae), y genes de tolerancia a dicamba, y semejantes. Las plantas que expresan las propiedades de tolerancia a insectos de la presente invención, que están unidas con uno o más marcadores de selección de este tipo, son particularmente útiles para propósitos comerciales.

5 Las secuencias de polinucleótidos de la presente invención pueden usarse para transformar una célula vegetal, que puede regenerarse para producir una planta transgénica que presenta una resistencia a insectos mejorada, en comparación con la planta o la célula vegetal de la que deriva la planta transgénica. Es posible modificar las secuencias de polinucleótidos de la presente
10 invención para mejorar su expresión en la planta a la que pertenece la célula huésped. La expresión de las secuencias de polinucleótidos de la presente invención en la célula vegetal puede permitir obtener acumulaciones de las proteínas insecticidas en el citoplasma, o puede resultar en la acumulación de las proteínas insecticidas en una organela subcelular, tal como un cloroplasto, un
15 plástido o una mitocondria.

Para lograr lo anterior, se han mejorada las secuencias de polinucleótidos que codifican las proteínas de la presente invención, como se indica en SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 18 y SEQ ID N° 20 y SEQ ID N° 47, para expresarlas en plantas. Estas secuencias de polinucleótidos presentadas como
20 ejemplo en la presente documentación se detallan en SEQ ID N° 13 (TIC809), SEQ ID N° 15 (TIC810), SEQ ID N° 17 (ET37), SEQ ID N° 19 (TIC812) y SEQ ID N° 46 (TIC127), y además en las secuencias de cassettes de expresión detalladas en SEQ ID N° 28, SEQ ID N° 31, SEQ ID N° 34, SEQ ID N° 36, SEQ ID N° 38, SEQ ID N° 40 y SEQ ID N° 43. La co-expresión de al menos una proteína TIC810
25 o TIC812, junto con una o más proteínas insecticidas ET29, TIC809 o ET37, mejora (o contribuye, actúa como chaperona, estabiliza o interactúa de otro modo con la proteína insecticida como una proteína accesoria) la expresión y/o la acumulación de la proteína insecticida. La co-expresión en una planta transgénica resulta en la ausencia de niveles bajos de expresión y/o acumulación, y la
30 ausencia de efectos fitotóxicos observados cuando se expresa cada una de las proteínas insecticidas ET29, ET37 o TIC809 por separado.

Existen varios métodos para introducir la construcción de ADN recombinante, que comprende la combinación de las secuencias de polinucleótidos, en células, y se cree que los métodos apropiados incluyen
35 virtualmente cualquier método con el pueda introducirse ADN en una célula vegetal, tal como por medio de una infección de *Agrobacterium*, una

administración directa de ADN, tal como, por ejemplo, mediante una transformación de protoplastos mediada por PEG (Omirulleh et al., Plant Mol. Biol., 21:415-428, 1993), por desecación/asimilación de ADN mediada por inhibición, por electroporación, bombardeo de microproyectiles, y semejantes.

5 En lo referente al manejo de la resistencia de los insectos (IRM), las composiciones y los métodos de la presente invención son útiles para producir plantas transgénicas que expresan dos o más proteínas de *B. thuringiensis* tóxicas para la misma especie de insecto, y que confieren un nivel de manejo de resistencia apropiado para demorar el inicio de la resistencia de cualquier especie
10 de insecto susceptible a uno o más de los agentes insecticidas expresados dentro de la planta transgénica. Como alternativa, se desea la expresión de una proteína insecticida de *B. thuringiensis* tóxica parra un insecto plaga particular, en combinación con un agente proteináceo diferente, tóxico para el mismo insecto plaga, pero que confiere toxicidad a través de un medio diferente del que presenta
15 la toxina de *B. thuringiensis*. Estos agentes proteináceos diferentes adicionales pueden comprender cualquiera de las proteínas insecticidas Cry, las proteínas insecticidas Cyt, las proteínas insecticidas de *Xenorhabdus* sp. o *Photorhabdus* sp., las proteínas insecticidas vegetativas de *B. thuringiensis*, y semejantes. Un medio para obtener este resultado comprendería producir dos eventos
20 transgénicos diferentes, donde un evento expresa una combinación de las dos proteínas insecticidas de la presente invención, activas contra insectos coleópteros y hemípteros, y el otro expresa una tercera proteína insecticida, y cruzar los dos caracteres juntos en una planta híbrida. La tercera proteína insecticida podría ser una que presentara actividad insecticida contra coleópteros,
25 una que presentara actividad insecticida contra hemípteros, una que presentara actividad insecticida dirigida a coleópteros y hemípteros (y tal vez, también toxicidad a insectos de otros ordenes), o una que presentara actividad insecticida dirigida a uno o más órdenes de insectos adicionales distintos de los insectos coleópteros y hemípteros plaga, incluyendo, sin limitaciones, lepidópteros,
30 ortópteros, dípteros y semejantes.

Es posible introducir una cantidad plaguicida de las proteínas insecticidas de la presente invención en la dieta de un insecto plaga. Típicamente, la dieta consiste en una parte de planta con la que normalmente se alimenta el insecto, tal como un tejido vegetal o una célula vegetal, pero también puede incluir otras
35 composiciones, tales como una dieta artificial formulada para mejorar el desarrollo y la supervivencia de un insecto plaga particular. La proteína insecticida puede

introducirse en una composición que se aplica sobre la superficie de la dieta, o más preferiblemente, puede producirse con la maquinaria de síntesis de proteínas de la célula, y como se describió previamente, puede acumularse dentro de la célula vegetal, o puede secretarse fuera de la célula vegetal, siempre que la cantidad de la proteína tóxica proporcionada sea una cantidad insecticida suficiente para inhibir la alimentación subsiguiente del insecto plaga, o para inhibir el crecimiento y el desarrollo subsiguiente del insecto plaga, o para causar mortalidad al insecto plaga.

Las plantas transgénicas pueden auto-cruzarse (auto-polinizarse) para generar semillas que presenten un genotipo que sea homocigota respecto del transgen que codifica la proteína insecticida. Estas semillas producen plantas y semillas que solamente son homocigotas respecto del transgen que codifica la proteína insecticida. Comúnmente, las plantas transgénicas producidas se generan en variedades que no logran exhibir las cualidades agrícolas más deseables. Por consiguiente, es posible cruzar plantas homocigotas recombinantes con líneas endocriadas que presentan cualidades de importancia agrícola particulares.

La presente invención será particularmente útil para crear plantas transgénicas de interés comercial, incluyendo diversos pastos de decoración, trigo, maíz, arroz, cebada, avena, una variedad de plantas ornamentales y verduras, así como una cantidad de árboles y plantas que producen nueces y frutas. Específicamente, estas plantas pueden incluir maíz, trigo, centeno, cebada, avena, trigo sarraceno, sorgo, arroz, cebolla, pasto, girasol, canola, arveja, garbanzo, poroto, café, soja, algodón, lino, coliflor, espárrago, lechuga, mostaza de tabaco, remolacha, papa, batata, zanahoria, nabo, apio, tomate, berenjena, pepino, zapallito, manzana, albaricoque, durazno, pera, ciruela, naranja, zarzamora, grosella, frutilla, arándano agrio y limón. En general, la invención es útil en variedades de plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas. La planta transgénica se selecciona del grupo que consiste en una planta monocotiledónea y una planta dicotiledónea, que puede incluir monocotiledóneas, tales como maíz, trigo, centeno, cebada, avena, trigo sarraceno, sorgo, arroz, caña de azúcar, guisante, maní, cebolla, ajo, pasto, o dicotiledóneas, tales como girasol, canola, arveja, garbanzo, poroto, café, soja, algodón, lino, coliflor, espárrago, lechuga, tabaco, plantas productoras de especias (incluyendo curry, mostaza, salvia, perejil, pimienta, tomillo, cilantro, baya, comino, curcumina, nuez moscada, canela y semejantes), remolacha, papa, batata, zanahoria, nabo, apio, tomate, berenjena,

pepino, zapallito o melón, un árbol frutal (incluyendo manzana, albaricoque, durazno, pera, ciruela, naranja, limón, lima y semejantes), plantas productoras de bayas (incluyendo zarzamora, grosella, frutilla, arándano agrio y semejantes), un árbol productor de frutas secas (incluyendo bellota, nuez americana, Brasil, pecana, castaña, avellana y semejantes), plantas productoras de uvas, y plantas con flor.

La información de secuencia de ADN proporcionada en la presente documentación permite preparar secuencias de nucleótidos o sondas y/o cebadores que presentan la capacidad de hibridizar específicamente con las secuencias de nucleótidos descritas en la presente documentación, o con secuencias homólogas que codifican proteínas relacionadas con TIC810, TIC812, ET37 y ET29. La capacidad de estas sondas de ácidos nucleicos de hibridizar específicamente con una secuencia que codifica una toxina relacionada o una proteína accesoria/tipo chaperonina provee utilidad particular en una variedad de realizaciones. Más destacablemente, las sondas pueden usarse en una variedad de ensayos para detectar la presencia de secuencias complementarias en una muestra dada. La naturaleza del ambiente regulador bajo el cual se comercializan las plantas que contienen los genes de la presente invención proporciona una utilidad particular, debido a que son capaces de detectar la presencia de las secuencias que codifican las proteínas, y también las proteínas de la presente invención, en una muestra biológica, y proporciona un medio para detectar la violación de determinadas realizaciones reivindicadas en el término de cualquier patente que se presente sobre ellas.

En determinadas realizaciones, resulta ventajoso usar oligonucleótidos sonda, solos o en pares, u otros conjuntos de cebadores. La secuencia de estos cebadores se diseña usando un polinucleótido de la presente invención, que se empleará en la detección, la amplificación o la mutación de un segmento definido de una secuencia codificante de una toxina o una proteína accesoria/tipo chaperonina de *B. Thuringiensis* u otras fuentes, usando métodos de amplificación térmica. También es posible amplificar los segmentos de secuencias codificantes de toxinas o proteínas accesorias/tipo chaperonina relacionadas de otras especies.

También se contemplan los conjuntos de elementos para detectar secuencias de polinucleótidos o aminoácidos de la presente invención en una muestra biológica. Estos conjuntos de elementos contienen una o más secuencias de polinucleótidos, cada una para usar como sonda en la detección de la

presencia de una secuencia de polinucleótidos que codifica una proteína insecticida de la presente invención, o un fragmento de ésta. También o como alternativa, estos conjuntos de elementos contienen un anticuerpo específico para la unión de uno o más polipéptidos de las proteínas de la presente invención, así como reactivos para usar con la sonda o el anticuerpo, y los conjuntos de elementos también podrían contener muestras control para usar en la confirmación de que los nucleótidos o los péptidos identificados con la sonda y/o el anticuerpo y los reactivos funcionan de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Todos los reactivos necesarios para poner en práctica los métodos de identificación de las secuencias de nucleótidos o los péptidos se envasarán juntos en un conjunto de elementos, en combinación con instrucciones para usarlos. Un ejemplo de un conjunto de elementos podría contener una secuencia de polinucleótidos TIC810 o relacionada, que codificaría una proteína insecticida, junto con una muestra de los ejemplos de cebadores de amplificación de secuencias de nucleótidos pr375 y pr376, como se indica en SEQ ID N° 23 y SEQ ID N° 24, en combinación con los reactivos necesarios para efectuar la reacción de amplificación, todos envasados juntos en el conjunto de elementos.

Los anticuerpos que se unen específicamente a los epitopes presentados solamente por cualquiera de las proteínas ET37, TIC810 y TIC812, o sus homólogos, también pueden usarse para identificar la presencia de cualquiera de las proteínas ET37, TIC810 y TIC812, o sus homólogos, para purificar las proteínas o sus homólogos, para identificar una secuencia de nucleótidos a partir de la cual se expresa una proteína ET37, TIC810 o TIC812, o un homólogo, y para usar en los conjuntos de elementos diseñados para permitir la detección de una proteína ET37, TIC810 o TIC812 proteína, o un homólogo, o la detección de una secuencia de nucleótidos que expresa la proteína o su homólogo. Aquél entrenado en la técnica podrá apreciar fácilmente que estos anticuerpos también permiten identificar fusiones de estas proteínas, tales como TIC127 y semejantes.

Los productos y/o las composiciones de materia de importancia agrícola y comercial, incluyendo, sin limitaciones, alimentos para animales, los productos comerciales, y los productos y los subproductos de algodón, soja o maíz, que se pretende usar como alimentos para consumo humano o en composiciones que se desee utilizar para el consumo humano, incluyendo, sin limitaciones, composiciones de semillas de algodón, aceite de semilla de algodón, sólidos de semillas de algodón, y semejantes, alimento a base de soja, aceite de soja, harina de soja y semejantes, harina de maíz, alimento a base de maíz, jarabe de maíz,

aceite de maíz, almidón de maíz, pochoclo, tortas de maíz, cereales que contienen maíz o soja, y subproductos de maíz, y semejantes, se incluyen dentro del alcance de la presente invención si estos productos y estas composiciones de materia contienen cantidades detectables de las secuencias de nucleótidos indicadas en la presente documentación como útiles para el diagnóstico de la presencia de una
5 secuencia que codifica una proteína ET29, ET37, TIC809, TIC810, TIC812 o TIC127, o combinaciones de éstas, y semejantes. Los bienes sólidos secos obtenidos por destilación también se contemplan como un producto de importancia agrícola y comercial, especialmente si contienen cantidades detectables de una
10 secuencia de nucleótidos que codifica una o más de las proteínas de la presente invención, o cantidades detectables de una o más de las proteínas de la presente invención.

Las semillas que comprenden cantidades detectables de las secuencias de nucleótidos que codifican estas proteínas, o las semillas o las partes de plantas
15 que pueden procesarse en productos que contienen cantidades detectables de estas secuencias de nucleótidos o proteínas, están dentro del alcance de la presente invención.

A la luz de estos ejemplos, aquellos entrenados en la técnica deberían apreciar que es posible efectuar muchos cambios a la descripción precedente sin
20 apartarse del espíritu y el alcance de la invención descripta.

Habiendo ilustrado y descripto los principios de la presente invención, debería ser evidente para aquellos entrenados en la técnica que es posible modificar la disposición y el detalle de la invención sin apartarse de estos principios. Se reivindican todas las modificaciones que están dentro del espíritu y
25 el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Todas las publicaciones y los documentos de patentes publicadas citados en esta memoria descriptiva se incorporan en la presente documentación a modo de referencia, en la misma extensión que se indicó específicamente e individualmente que se los incorporaba a modo de referencia.

30 EJEMPLOS

Ejemplo 1

En este ejemplo se ilustra la construcción de una secuencia de nucleótidos que funciona para obtener la expresión de una proteína ET29 en células de plantas de maíz.

35 ET29 es una proteína derivada de *B. thuringiensis*, y de ella se había demostrado con anterioridad que presentaba actividad biológica insecticida contra

la oruga de la raíz del maíz cuando se la introducía en la dieta de larvas de la oruga de la raíz del maíz (Patentes de los EEUU N° 6093695, 6537756, 6686452). Se ha demostrado que las secuencias codificantes Bt nativas presentan niveles inaceptables de síntesis de proteínas cuando se las expresa en células vegetales (Patente de los EEUU N° 5500365). La expresión de la proteína ET29 en células de plantas de maíz, y específicamente en células de raíces de maíz, podría proporcionar plantas de maíz con protección del daño provocado por la alimentación de las orugas de la raíz del maíz. Por consiguiente, se construyó una secuencia de nucleótidos que codificaba una proteína insecticida ET29 de *B. thuringiensis*, de la que se anticipaba que se expresaría en mayor medida en plantas, para evitar determinadas secuencias de nucleótidos mimicas de las que se había demostrado con anterioridad que eran problemática, al tiempo que se mantenía una secuencia de nucleótidos que codificaba la proteína insecticida nativa con una excepción: la inclusión de un codón de alanina suplementario en la posición dos (2) de la secuencia codificante (SEQ ID N° 13) en la secuencia sintética para facilitar la clonación. La variante ALA2 de la secuencia de aminoácidos ET29 indicada en SEQ ID N° 14 se denominó TIC809, y en ensayos biológicos no presenta menos actividad biológica que la proteína ET29 nativa.

La región codificante TIC809 indicada en SEQ ID N° 13 se subclonó en un vector binario para transformar plantas. Los elementos río arriba de la región codificante TIC809 incluyeron un promotor CaMV 35S mejorado, una secuencia directriz 5' no traducida de la proteína unión a clorofila a/b mayor de trigo, un primer intrón del gen de actina 1 de arroz y una secuencia de una región directriz no traducida (UTL) circundante de un exón, y opcionalmente, una secuencia codificante de un péptido de tránsito a cloroplasto de la subunidad pequeña de la ribulosa 1,5-bisfosfato carboxilasa de maíz. La expresión *in planta* de una proteína de fusión que en el péptido de tránsito a cloroplasto (ctp), unido al extremo N de la proteína TIC809, permite dirigir la proteína TIC809 a los plástidos. Se incorporó una región 3' no traducida (UTR) hsp17 de trigo río abajo de TIC809 para obtener la terminación y la poliadenilación de los transcritos de ARNm.

Los vectores para transformar plantas contienen un marcador de selección de tolerancia a glifosato. El vector para transformar plantas pMON70513 provee la expresión de una proteína TIC809 soluble en el citoplasma, mientras que pMON70514 provee la expresión de una proteína TIC809 dirigida al plástido.

Ejemplo 2

En este ejemplo se ilustra la comparación de la expresión dirigida al plástido con la expresión no dirigida de TIC809 en ensayos en protoplastos transitorios de maíz, y el análisis subsiguiente de plantas transgénicas transformadas para que expresen la proteína TIC809 dirigida a plástidos de maíz.

Se compararon unos con otros ensayos de expresión transitoria usando protoplastos de maíz transformados con pMON70513 o pMON70514, y también se los comparó con ensayos realizados con un vector control vacío. Los resultados indicaron niveles bajos de expresión de la proteína TIC809 no dirigida, en comparación con la proteína TIC809 dirigida. Por consiguiente, solamente se continuó el análisis de pMON70514. Se produjeron eventos transgénicos de maíz después de la transformación mediada por *Agrobacterium* de protoplastos de maíz. En plantas de maíz regeneradas ("plantas R0") se analizó la tolerancia a glifosato y la cantidad de copias de la UTR 3' hsp17 (tahsp17) de trigo. Se analizaron muestras de raíces en etapa de seis hojas (V6) y muestras de hojas de cada evento transgénico de maíz para determinar la presencia y la cantidad de la proteína ET29, usando un método de ELISA.

Diecinueve (19) de los ochenta y siete (87) eventos transgénicos analizados por ELISA presentaron un fenotipo anormal distintivo, caracterizado por un tallo clorótico, y ocho (8) de éstos presentaron anomalías en la espiguilla o la espiga. El nivel de expresión promedio de TIC809 en tejido foliar y raíces de plantas que presentaban un fenotipo anormal fue de 2,2 y 2,0 partes por millón, respectivamente. Los niveles promedio de TIC809 en hojas y raíces de plantas con fenotipos normales fueron de 1,4 y 1,1 ppm, respectivamente. Estos resultados sugirieron que los mayores niveles de proteínas TIC809 podían correlacionarse con los fenotipos anormales observados.

Ejemplo 3

En este ejemplo se ilustra la clonación de un gen que codifica TIC810, una proteína expresada a partir de un operón en *Bacillus thuringiensis*, donde también reside el gen ET29 (*tic809*), y la identificación de la expresión de TIC810, que no presenta actividad biológica insecticida contra la oruga de la raíz del maíz.

et29 se clonó originalmente en un fragmento *EcoRI* de 7,1 kb, a partir de ADN obtenido a partir de la cepa de *B. thuringiensis* EG4096 (Patente de los EEUU N° 6686452), y se retuvo en el plásmido pEG1303, un vector de transporte capaz de replicarse en *B. thuringiensis* y *E. coli*. La cepa de *B. thuringiensis* EG11502, que contiene pEG1303, produce niveles bajos de la proteína cristalina

ET29 cuando se cultiva en medio C2 (Donovan et al, *Mol. Gen. Genet.* 214: 365-372, 1988).

La secuencia codificante ET29 se subclonó a partir del fragmento *EcoRI* grande, de 7,1 kb, en pEG1303, como un fragmento *KpnI-ClaI* de
5 aproximadamente 1,5 kb, en el vector de transporte con gran cantidad de copias pEG854.9 (Baum et al, (1996) *Appl. Env. Microbiol.* 62:4367-4373), donde se esperaba observar un incremento en el nivel de expresión de ET29 para el fragmento más pequeño. Se creyó que el plásmido resultante, pMON78402, contenía suficiente ADN nativo 5' y 3' de la región codificante ET29 para
10 incorporar cualquier elemento de expresión necesario, tal como un promotor dependiente de la epsorulación. Sorprendentemente, no se detectó la formación de cristales de proteína cuando se introdujo pMON78402 en la cepa huésped acristalífera de *B. thuringiensis* EG10650, lo que sugiere que la región 5' presente en pMON78402 podía no contener el promotor ET29 nativo, y que la transcripción
15 de ET29 a partir del clon en pEG1303 era dirigida por un promotor fortuito unido al vector. Además, la secuenciación del fragmento *EcoRI* de 7,1 kb en pEG1303 reveló la presencia de un marco abierto de lectura interrumpido inmediatamente río arriba de la región codificante ET29. La región codificante interrumpida contenía uno de los sitios *EcoRI* terminales usados para clonar el fragmento *EcoRI*
20 de 7,1 kb en pEG1303. Una búsqueda FASTX en bases de datos de proteínas no redundantes existentes, y también en una base de datos de secuencias de proteínas cristalinas de *B. thuringiensis*, sugirió que esta región codificante parcial codificaba una secuencia de aminoácidos que presentaba aproximadamente 36% de identidad de secuencia con aquella de la proteína ET29. Esta proteína
25 relacionada se denominó TIC810. Esto sugirió que el gen ET29 residía dentro de un operón no caracterizado, que incluía al menos el gen TIC810 río arriba, y que, como TIC810 probablemente se co-expresaba con ET29 también podía presentar actividad insecticida contra la oruga de la raíz del maíz.

La secuencia codificante ET29 nativa se indica en SEQ ID N° 9, desde la
30 posición 716 hasta la posición 1408. Hubo un único sitio *NheI* presente dentro de la secuencia codificante (nucleótidos 820-825, como se indica en SEQ ID N° 9). Se presenta la secuencia codificante TIC810 parcial en pEG1303, tal como se la indica en SEQ ID N° 9, que incluye los nucleótidos entre las posiciones 369 y 654. El sitio *EcoRI* que dividía la secuencia codificante TIC810 se indica en SEQ ID N°,
35 entre los 369 y 374. La digestión del ADN de EG4096 con *NheI*, o la digestión con *NheI* y enzimas de restricción compatibles, en combinación con PCR de unión e

inversa, permitió identificar la secuencia de nucleótidos del extremo 5' de la región codificante TIC810.

En un volumen de 50 µl, se digirió ADN genómico EG4096 (5 µg) con enzimas de restricción compatibles, en diversas combinaciones que incluyeron *NheI*, *NheI* + *BlnI*, *NheI* + *SpeI* y *NheI* + *XbaI*. Se mezclaron diez microlitros de las digestiones completas con 80 µl de agua estéril, 10 µl de amortiguador de ligasa 10X (New England BioLabs, Beverly, MA) y 2 µl de ligasa T4, y se incubó durante la noche a 4°C. Los productos de unión se usaron como moldes de amplificación térmica, usando un conjunto de elementos Elongase® de Invitrogen (Carlsbad, CA) y los cebadores divergentes pr370 y pr371 (como se indica en SEQ ID N° 21 y SEQ ID N° 22, respectivamente). SEQ ID N° 21 corresponde al complemento inverso de los nucleótidos 650-671, como se indica en SEQ ID N° 9, y SEQ ID N° 22 corresponde a los nucleótidos 744-764, como se indica en SEQ ID N° 9.

Las enzimas de restricción usadas para cada reacción produjeron extremos compatibles. El ADN de *B. thuringiensis* es rico en AT, por lo que se anticipó que las enzimas de restricción *SpeI* y *XbaI* proporcionarían productos de PCR menores que las enzimas de restricción *BlnI* y *NheI*. Solamente las combinaciones *SpeI-NheI* y *XbaI-NheI* proporcionaron fragmentos de ADN amplificados. Los fragmentos de ADN amplificados se clonaron y se secuenciaron, y se ensamblaron en el segmento *EcoRI-NheI*, que consistió en los nucleótidos 369-825 indicados en SEQ ID N° 9. Se identificó una secuencia ensamblada, de la que se predecía que codificaría TIC810, como se indica en SEQ ID N° 3. Luego se amplificó el gen TIC810 directamente a partir de ADN genómico EG4096, usando una polimerasa termoestable de alta fidelidad. Se usaron múltiples clones para confirmar la secuencia. Se predice que el gen TIC810 codificará una proteína de aproximadamente 25000 Dalton, como se indica en SEQ ID N° 4. La secuencia de aminoácidos TIC810 deducida presenta aproximadamente 33% de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos ET29, lo que sugiere que TIC810 también puede presentar actividad biológica insecticida.

Se examinó la expresión de TIC810 en una cepa acristalífera de *B. thuringiensis*. El gen TIC810 se amplificó usando los cebadores pr375 y pr376 (como se indica en SEQ ID N° 23 y SEQ ID N° 24, respectivamente), para producir un amplicón que codificaba una variante de la secuencia de aminoácidos TIC810, que contenía un codón de inicio de la transcripción ATG en reemplazo del codón nativo GTG. El cebador pr375 también incorpora un sitio *SpeI* 5' de la región codificante TIC810, mientras que el cebador pr376 incorpora un sitio *XhoI* 3' del

amplicón de la región codificante TIC810, lo que permite subclonar el amplicón en el vector de transporte para *B. thuringiensis*-*E. coli* pMON47407. En este vector se insertó el amplicón que codificaba TIC810, justamente río abajo de un promotor del vector-endógeno *cry1A*. Las secuencias localizadas río abajo del promotor *cry1A* presentan una expresión dependiente de la esporulación en *B. thuringiensis*. El plásmido recombinante resultante pMON78409, que contenía la secuencia que codificaba la proteína TIC810, se introdujo en la cepa huésped acristalífera de *B. thuringiensis* EG10650 por electroporación, con el fin de generar la cepa recombinante de *B. thuringiensis* SIC8116. La cepa SIC8116 produjo cuerpos de inclusión parasporales, que contenían la proteína TIC810 cuando se los cultivaba en medio de esporulación C2. No se observó actividad biológica insecticida cuando se expusieron larvas de la oruga de la raíz del maíz a un medio artificial recubierto con cultivos esporulados de SIC8116, lo que sugiere que la proteína TIC810 no presentó actividad biológica insecticida dirigida a la CRW.

15 **Ejemplo 4**

En este ejemplo se ilustra que la expresión de ET29 bajo el control de un promotor dependiente de la esporulación *cry1A* resulta en niveles de expresión pobres y en un comportamiento fisiológico aberrante de la célula huésped.

La cepa recombinante de *B. thuringiensis* EG11502, que contenía el plásmido pEG1303, produjo pequeñas cantidades de la proteína cristalina ET29. En un intento de incrementar la expresión de ET29 en *B. thuringiensis*, se insertó la secuencia codificante ET29 en el vector de transporte para *B. thuringiensis*-*E. coli* pMON47407. La secuencia codificante ET29 se amplificó a partir de ADN pEG1303 usando los cebadores pr365 y pr372 (SEQ ID N° 25 y SEQ ID N° 26, respectivamente). Una vez confirmada la secuencia, se insertó el fragmento amplificado del gen ET29 en el esqueleto del vector pMON47407, en una orientación efectiva para obtener la expresión de ET29 a partir del promotor endógeno del vector *cry1A*. Para evaluar la producción de la proteína ET29, se introdujo el plásmido recombinante resultante, pIC17507, en la cepa de *B. thuringiensis* EG10650, para producir la cepa recombinante SIC8114. La cepa SIC8114 produjo una menor cantidad de proteína ET29 que la cepa recombinante original de ET29 EG11502, y presentó una esporulación pobre en medio de esporulación C2. Este resultado sugirió que la sobreexpresión de ET29 podía ser perjudicial para la célula huésped, o que había algún otro factor presente en la cepa nativa EG4096, y no en la cepa recombinante, necesario para la expresión y/o la acumulación eficiente de ET29.

Ejemplo 5

En este ejemplo se ilustra la identificación de un operón que presenta homología con el operón TIC810/ET29.

En otras cepas de *Bt* se examinó la presencia de secuencias relacionadas con el operón TIC810/ET29 en EG4096 por análisis de Southern blot. Se descubrió un fragmento de restricción *Cla*I de 5,4 kb del ADN total de la cepa de *Bt* EG5078 que hibridizaba con una sonda de hibridización específica para ET29. Este fragmento *Cla*I de 5,4 kb se clonó en el vector de transporte para *B. thuringiensis*-*E. coli* pEG854 (Baum et al., (1990) Appl. Env. Microbiol. 56:3420-3428), y también en el vector para *E. coli* pBluescript IISK, para generar los plásmidos recombinantes pEG1325 y pEG1323, respectivamente. El análisis de secuencia del inserto de 5,4 kb reveló dos genes relacionados estrechamente, similares a los genes ET29 y TIC810 en la cepa de *B. thuringiensis* EG4096. La secuencia codificante proximal 5' se denominó *tic812* (como se indica en SEQ ID N° 5), y se predijo que codificaría un polipéptido TIC812 (como se indica en SEQ ID N° 6). TIC812 presenta aproximadamente 97% de identidad de secuencia de aminoácidos con la proteína TIC810. La secuencia codificante proximal 3' se denominó *et37* (SEQ ID N° 1), y se predijo que codificaría la secuencia de aminoácidos ET37, como se indica en SEQ ID N° 2. ET37 presenta más de aproximadamente 99% de identidad de secuencia de aminoácidos con la proteína ET29, ya que difieren solamente en una posición de aminoácido.

El vector de transporte pEG1325, que contenía los genes TIC812 y ET37, se introdujo en la cepa huésped acristalífera de *B. thuringiensis* EG10650 usando un procedimiento de electroporación. La cepa recombinante resultante, EG11541, produjo un nivel elevado de la proteína ET37 cuando se cultivó en medio de esporulación C2. Sin embargo, la cantidad de proteína TIC812 presente en las esporas fue solamente de aproximadamente 25% de la cantidad de proteína ET37. Se estableció que la mezcla de proteínas ET37/TIC812 producida por la cepa EG5078 era tóxica para larvas de la oruga de la raíz del maíz cuando se evaluó en un ensayo biológico.

Debido a la similitud entre los operones TIC810/ET29 y TIC812/ET37, y debido a que ET37 y ET29 difieren solamente en una posición de aminoácido, es improbable que las dos proteínas presenten propiedades insecticidas o citotóxicas con diferencias significativas. El nivel bajo de ET29 expresada sola, en comparación con el mayor nivel de proteína ET37 expresada a partir de su operón nativo, unido a la identidad sustancial entre las proteínas TIC810 y TIC812,

sugiere que las proteínas TIC810 y TIC812 pueden tener una participación en el incremento de los niveles o la estabilización de sus proteínas ET29 o ET37 respectivas. Por consiguiente, la co-expresión de TIC812 junto con la proteína ET37 puede ser la causa de la producción excesiva de ET37 observada en la cepa EG11541. También, la co-expresión de TIC810 y ET29 puede resultar del mismo modo en la producción excesiva de ET29.

Para evaluar esta hipótesis, las secuencias codificantes individuales ET29, ET37, TIC810 y TIC812 se amplificaron y se clonaron en el vector de expresión para *B. thuringiensis* pMON47407, descrito previamente, de modo que la expresión de cada una estuviera bajo el control del promotor endógeno para el vector *cry1A*. El codón GTG de ocurrencia natural en la posición 1 de la secuencia codificante TIC812 se modificó para obtener un codón ATG. Las secuencias codificantes en tandem TIC810-ET29 (SEQ ID N° 9) y las secuencias codificantes en tandem TIC812-ET37 (SEQ ID N° 10) se amplificaron a partir de ADN genómico, se clonaron en el vector de clonación TOPO pCR2.1-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA), y se confirmaron sus secuencias. Luego se clonaron los fragmentos de ADN amplificados en el vector pMON47407, de modo que las secuencias codificantes en tandem estuvieran bajo el control del promotor endógeno para el vector *cry1A*. Por consiguiente, cada inserto se clonó en pMON47407 en la misma orientación, y se empleó en el mismo promotor. Se usó la cepa acristalífera de *B. thuringiensis* EG10650 como cepa huésped para todos los estudios de expresión. Las construcciones plasmídicas y las cepas recombinantes de *B. thuringiensis* que contenían estos plásmidos se indican en la Tabla 2.

Tabla 2. Plásmidos contruidos para el análisis de expresión de TIC810/ET29 y TIC812/ET37

Cepa	Secuencia(s) codificante(s)	Plásmido	Par de cebadores ¹
EG10650	-	-	-
SIC8114	ET29	pIC17057	pr372-pr365
SIC8116	TIC810	pMON78409	pr375-pr376
SIC8130	ET37	pMON78404	pr372-pr365
SIC8131	TIC812	pMON78405	pr375-pr376
SIC8134	TIC810_ET29	pMON78406	pr421-pr365
SIC8135	TIC812_ET37	pMON78407	pr421-pr365

larvas sobrevivientes por tratamiento al final de los 5-7 días, dependiendo del experimento. Las larvas sobrevivientes se pesaron en una microbalanza (Cahn C-33). Los datos se analizaron usando el software estadístico JMP® 4 (SAS Institute, Cary, N. C., EEUU). Los datos del ensayo biológico se indican en la Tabla 3.

5 Los resultados sugieren que los cultivos esporulados de la cepa tipo salvaje de *B. thuringiensis* EG5078, que contenían una mezcla de ET37 y TIC812, eran tóxicos para larvas de la oruga de la raíz del maíz occidental, lo que provocó una reducción significativa de la masa de las larvas en comparación con el control. Una suspensión comparable de esporas 10X de la cepa huésped *cry-* de *B.*
10 *thuringiensis* EG10650 no presentó actividad contra las larvas de WCR en el ensayo biológico. Se incluyó una muestra que contenía 500 mg de la proteína insecticida contra la oruga de las raíces Cry3Bb como control positivo.

Tabla 3. Ensayo biológico con la oruga de la raíz del maíz occidental versus ET37/TIC812

Muestra	Concentració n ¹	N	Med ia	SD ²	SEM	LO 95%	UP 95%	P> t
UTC ³	0,250	6	0,36	0,05	0,02	0,31	0,41	
Cry3Bb	0,500	3	0,20	0,03	0,02	0,13	0,26	0,0003
TIC812- ET37	1,000	3	0,16	0,04	0,03	0,05	0,27	<0,0001
TIC812- ET37	0,500	3	0,19	0,08	0,05	-0,01	0,39	0,0002
TIC812- ET37	0,250	3	0,25	0,01	0,01	0,22	0,29	0,0084
TIC812- ET37	0,125	3	0,25	0,08	0,04	0,06	0,44	0,0073

15 1 – mg/ml; 2 – Desviación estándar; 3 – Verificación sin tratamiento;
Varianzas no iguales, método de Levene, P>F 0,0053;
Hay un efecto debido al tratamiento, SLS, P>F 0,0002; y
Las medias con un valor de P < 0,05 presentan diferencias significativas respecto de los contrastes planeados UTC.

20 **Ejemplo 6**

En este ejemplo se ilustra la co-expresión de proteínas TIC810 y TIC809 en protoplastos de maíz.

Se construyeron secuencias de nucleótidos sintéticas que codificaban las proteínas de *B. thuringiensis* TIC810 y ET29 (TIC809) para expresar en plantas. La secuencia sintética que codifica TIC809 se indica en SEQ ID N° 13, y la traducción de la secuencia de aminoácidos se indica en SEQ ID N° 14. La

5 secuencia sintética que codifica TIC810 se indica en SEQ ID N° 15, y la traducción de la secuencia de aminoácidos se indica en SEQ ID N° 16. Las secuencias codificantes sintéticas de TIC809 y TIC810 se clonaron en vectores de expresión para estudios de expresión transitoria con protoplastos de maíz. Los elementos genéticos alrededor de la o las regiones codificantes de las secuencias

10 codificantes TIC809 y TIC810 fueron idénticos, excepto por la adición del péptido de tránsito a cloroplasto (ctp), como se describe en el Ejemplo 1. Las construcciones plasmídicas se describen en parte en la siguiente Tabla 4.

Tabla 4. Construcciones plasmídicas para el ensayo de expresión transitoria de TIC810/TIC809

Plásmido	Proteína(s) codificada(s)	Cry	Localización de la proteína
pMON84202	TIC809		No dirigida
pMON84203	ctp-TIC809		Dirigida a los cloroplastos
pMON64134	TIC809, TIC810		No dirigida
pMON64135	ctp-TIC809, TIC810	ctp-	Dirigida a los cloroplastos
pMON64136	TIC809, ctp-TIC810		TIC809 no dirigida; TIC810 dirigida a los cloroplastos
pMON64137	ctp-TIC809, TIC810		TIC809 dirigida a los cloroplastos; TIC810 no dirigida

15 Los protoplastos se prepararon digiriendo tejido de maíz de 12 días en, manitol 0,6 M, MES 10 mM, pH 5,7, con 2% de celulasa RS, y 0,3% de macerozima R10 por 2 horas. Todas las transformaciones se realizaron usando 50 µg de ADN y 1,3 x 10⁶ células.

La expresión de TIC809 en los protoplastos se midió usando un ELISA con

20 anticuerpos policlonales dirigidos contra la proteína ET29. Los resultados se indican en la Tabla 5, y representan el promedio de tres muestras por duplicado.

Tabla 5. Expresión transitoria de TIC809 en protoplastos de maíz

Plásmido	Proteínas Cry	Media ²	Error estándar	Comparaciones ¹
pMON84202	TIC809	5,1	0,6	c
pMON64134	TIC809, TIC810	120,3	24,9	a
pMON64136	TIC809, ctpTIC810	29,2	3,0	bc
pMON84203	ctpTIC809	111,4	3,2	a
pMON64137	ctpTIC809, TIC810	90,2	18,0	ab
pMON64135	ctpTIC809, ctpTIC810	148,9	15,2	a

1 – Comparaciones para todos los pares usando Tukey-Kramer HSD, alfa = 0,05. Los tratamientos con la misma letra no presentan diferencias significativas unos respecto de otros.

2 - (ng ET29/mg de proteína total),

5 Los resultados indican que la proteína dirigida al cloroplasto TIC809 resultó en un incremento de la expresión de TIC809 en el sistema transitorio, en comparación con la expresión de TIC809 no dirigida. Al comparar la expresión a partir de pMON84203 con la expresión a partir de pMON84202, se observa que la expresión de la proteína TIC809 dirigida es aproximadamente 20 veces mayor que

10 la de la proteína TIC809 no dirigida. Sin embargo, la co-expresión de la proteína TIC810 no dirigida con la proteína TIC809 no dirigida también resulta en un incremento significativo de la expresión de la proteína TIC809 (compárese pMON64134 con pMON84202). En cinco de los seis experimentos, el direccionamiento de TIC810 y TIC809 al plástido resultó en niveles de expresión y

15 acumulación de TIC809 equivalentes o mayores, en comparación con la cantidad acumulada cuando se dirigió TIC809 al plástido sola. En cualquier caso, la co-expresión de TIC809 y TIC810 juntas en cualquier localización celular común resulta en niveles incrementados acumulación de TIC809, en comparación con los niveles de acumulación de TIC809, cuando se la expresó en dicho compartimiento

20 en ausencia de TIC810.

Se construyó pMON64136 y pMON64137 para evaluar el efecto de la expresión de TIC809, cuando se la localizó en un compartimiento subcelular diferente del de TIC810. El direccionamiento de TIC810 al plástido no tuvo un impacto significativo sobre la expresión de TIC809 no dirigida (compárese

25 pMON64136 con pMON84202). De forma similar, TIC810 no dirigida no tuvo un

impacto significativo sobre la acumulación de TIC809 dirigida (compárese pMON64137 con pMON84203). Sin embargo, TIC810 no dirigida incrementó o estabilizó la acumulación de TIC809 no dirigida. Estos resultados sugieren que la localización de las dos proteínas en el mismo espacio dentro de la célula resulta en una mayor acumulación de la proteína insecticida contra la oruga de las raíces TIC809, tal vez como resultado de alguna interacción entre las proteínas, lo que estabiliza la acumulación de la proteína TIC809. Estos resultados son consistentes con la observación de que la co-expresión de TIC810 y ET29, o la co-expresión de TIC812 y ET37, resulta en una expresión de alto nivel de ET29 o ET37, respectivamente, en *B. thuringiensis*.

Se incluyó un plásmido que contenía un gen de luciferasa (LUX) como control en los ensayos de expresión transitoria en protoplastos. Aunque la luciferasa generalmente se incluye en los ensayos transitorios como indicador de la eficiencia de transformación, se observó que los niveles de expresión de luciferasa variaban ampliamente dependiendo de la construcción plasmídica evaluada, presumiblemente debido a los efectos fitotóxicos de las proteínas Bt acumuladas. La baja acumulación de TIC809 se correlacionó con bajos niveles de luciferasa. En cada caso, excepto cuando TIC809 se localiza en el cloroplasto, la co-expresión de TIC810 dirigida en el mismo compartimiento con TIC809 resultó en un incremento dramático de los niveles de expresión de luciferasa y TIC809 (compárese pMON64134 con pMON84202). Los datos de la luciferasa se indican en la Tabla 6.

Tabla 6. Niveles de luciferasa en el experimento de expresión transitoria

Plásmidos	Proteína(s) codificada(s)	Cry	Conteos por segundo	Error estándar de la media	Comparaciones ¹
pMON84202	TIC809		67,4	1,7	B
pMON64134	TIC809, TIC810		518,6	135,7	A
pMON64136	TIC809, ctpTIC810		70,8	2,3	B
pMON84203	ctpTIC809		408,0	84,7	A
pMON64137	ctpTIC809, TIC810		277,2	2,6	Ab
pMON64135	ctpTIC809, ctpTIC810		284,9	32,8	Ab

¹ Comparaciones para todos los pares usando Tukey-Kramer HSD, alfa = 0,05. Los tratamientos con la misma letra no presentan diferencias significativas unos respecto de otros.

Ejemplo 7

En este ejemplo se ilustran los resultados de la co-expresión de TIC810 y TIC809 en maíz transgénico.

Se introdujeron los cassettes de expresión TIC809, ctp-TIC809, TIC809-
5 TIC810 y ctpTIC809-ctpTIC810 en vectores binarios para transformar plantas, apropiados para usar en la transformación de maíz. Aparte de las secuencias que codifican las proteínas Bt, las construcciones difieren unas de otras solamente respecto de la presencia o la ausencia de la secuencia codificante del péptido de direccionamiento al cloroplasto. Se usó un gen que confería tolerancia a glifosato
10 como marcador de selección para la transformación mediada por *Agrobacterium*.

pMON64138 contiene un cassette para la expresión *in planta* de TIC809 y TIC810. pMON64139 contiene un cassette para la expresión *in planta* de TIC809 dirigida al cloroplasto y TIC810 dirigida al cloroplasto. pMON70513 contiene un cassette para la expresión *in planta* de TIC809. pMON70514 contiene un cassette
15 para la expresión *in planta* de TIC809 dirigida al cloroplasto. Las plantas de maíz transgénicas regeneradas obtenidas después de la transformación, usando estos cuatro plásmidos y selección con glifosato, se analizaron usando un ensayo TaqMan®, para determinar la presencia del gen marcador de selección con glifosato y la presencia de la o las secuencias tahsp17 3'. Se usó un ensayo de
20 punto terminal por PCR para confirmar la presencia de las secuencias codificantes de TIC809 y/o TIC810, cuando fuera relevante, en cada evento. Se esperó que los eventos transformados con las construcciones que contenían TIC809 y TIC810 presentaran dos copias de la secuencia tahsp17 3', ya que cada secuencia codificante estaba rodeada en su extremo 3' por el elemento tahsp17 3'. Las
25 plantas transgénicas y control que contenían seis hojas (etapas V6) y raíces se evaluaron usando un ELISA para ET29 para determinar el nivel de acumulación de TIC809.

Las plantas regeneradas después de la transformación con pMON70513, que solamente contenían la secuencia codificante de TIC809 dirigida al
30 citoplasma, se comportaron como se indicó previamente en los ejemplos 1 y 2. Las plantas presentaron fenotipos y características sustancialmente anormales, típicamente caracterizadas visualmente por un tallo clorótico, entre otras anormalidades. Los niveles de expresión y/o acumulación de TIC809 presentaron un promedio no superior a aproximadamente 2,0 ppm en tejido radicular.

35 Se evaluaron quince plantas R0 transformadas con pMON64138 para determinar la presencia del gen marcador de selección por tolerancia a glifosato y

la presencia y la cantidad de copias de los elementos *hsp17 3'*, así como la presencia de *OriV* para detectar cualquier esqueleto de vector, y la presencia y el carácter intacto de los genes que codificaban las proteínas TIC809 y TIC810 dirigidas al citoplasma. Un evento no contenía una secuencia codificante de TIC809 completa, y también se determinó que no presentaba niveles detectables de la proteína TIC809. Los 14 eventos restantes presentaron un promedio de aproximadamente 12 ppm de TIC809 (peso fresco) en tejido foliar o tejido radicular. Los niveles de TIC809 en tejido radicular variaron entre aproximadamente 0,2 ppm en una planta y aproximadamente 45 ppm en la planta que presentaba el mayor nivel de expresión y/o acumulación. Este resultado sugirió que la co-expresión de TIC810 junto con TIC809 en los tejidos vegetales provee niveles mejorados de expresión y/o acumulación de la proteína TIC809. Más significativamente, no se observaron fenotipos anormales en las plantas que expresaban TIC809 y TIC810 en el citoplasma. El nivel de expresión de TIC809 fue más uniforme en tejido radicular que en tejido foliar, y más plantas presentaron mayores niveles de expresión de TIC809 en las raíces que en las hojas.

Se regeneraron quince plantas R0 a partir de células vegetales transformadas usando pMON64139, que contenía las secuencias codificantes de TIC809 y TIC810 dirigidas al cloroplasto. En los análisis de búsqueda, se identificó un evento que no contenía el cassette de expresión de TIC809 completo, y que tampoco presentaba niveles detectables de la proteína TIC809. Los 14 eventos restantes presentaron un promedio de aproximadamente 4,4 ppm y aproximadamente 8.6 ppm de proteína TIC809 en tejido foliar y radicular, respectivamente. Los niveles de TIC809 en raíces variaron entre aproximadamente 0,2 ppm y aproximadamente 45 ppm. Las plantas de maíz transformadas con pMON70514, que contenían el gen *ctpTIC809*, solamente presentaron en promedio aproximadamente 1,7 ppm de proteína TIC809 en tejido foliar, y aproximadamente 6,3 ppm de proteína TIC809 en tejido radicular. Por consiguiente, la co-expresión de TIC810 no dirigida junto con TIC809 dirigida resultó en mayores niveles de expresión y/o acumulación de TIC809 que los obtenidos con la proteína TIC809 dirigida al cloroplasto. Además, las plantas R0 que produjeron niveles elevados de proteína TIC809 no presentaron clorosis en el tallo u otras manifestaciones de fitotoxicidad asociadas con la expresión *in planta* de la proteína TIC809 sola. La co-expresión de la proteína TIC810 dirigida al cloroplasto junto con la proteína TIC809 dirigida al cloroplasto también resultó en

mayores niveles de acumulación de TIC809, en comparación con los niveles de proteína TIC809 dirigida al cloroplasto expresada en ausencia de TIC810.

Dieciocho plantas R0 transformadas para que co-expresaran las proteínas TIC809 y TIC810 dirigidas para determinar la presencia del gen marcador de selección por tolerancia a glifosato, la cantidad de copias de *hsp17 3'*, la presencia de OriV (esqueleto) y el carácter intacto de las secuencias codificantes de TIC809 y TIC810. Un evento no contenía una secuencia codificante de TIC809 intacta, y no presentó niveles detectables de la proteína TIC809. Las 17 plantas restantes presentaron en promedio 8,6 y 4,4 ppm de TIC809 en hojas y raíces, respectivamente. La expresión de la proteína TIC809 en raíz varió entre aproximadamente 1 ppm y aproximadamente 9 ppm. Los eventos que presentaban expresión de las proteínas TIC809 y TIC810 dirigidas al cloroplasto no presentaron clorosis en el tallo u otras manifestaciones de fitotoxicidad asociadas con la expresión *in planta* de la proteína TIC809 sola.

15 **Ejemplo 8**

En este ejemplo se ilustra la expresión mejorada de la proteína TIC809 dirigida al plástido en raíces de maíz.

Se construyó pMON64144 de modo que contuviera una proteína TIC809 dirigida al cloroplasto, bajo el control operativo de un promotor de raíz RCc3 (Solicitud de Patente de los EEUU con N° de Acta11\075113), rodeada 5' de la secuencia codificante de CTP por un intrón de una proteína de ataque calórico de maíz, y 3' de la secuencia codificante de TIC809, por una secuencia 3' de terminación de la transcripción y poliadenilación *hsp17*. La secuencia del cassette de expresión se indica en SEQ ID N° 38.

25 Se generaron plantas de maíz después de la transformación mediada por *Agrobacterium* de tejido de maíz con el vector pMON64144. Las plantas de maíz regeneradas se analizaron usando un ensayo TaqMan®, para determinar la presencia del marcador de selección por glifosato y la secuencia circundante 3' de trigo. La presencia de la secuencia codificante TIC809 intacta se confirmó con un ensayo de punto terminal por PCR. Se analizaron muestras de raíces y hojas de 30 23 plantas de maíz R0 en la etapa de seis hojas usando un ELISA para ET29.

El nivel promedio de TIC809 acumulado en tejido radicular fue de 0,4 ppm. No se detectó la proteína TIC809 en las hojas, lo que sugiere que la actividad del promotor RCc3 está potenciada en las células de la raíz. 8 de las 23 plantas R0 35 presentaron una concentración de proteína TIC809 en la raíz menor que el nivel de detección. Ninguna de las plantas evaluadas presentó niveles mayores que

aproximadamente 1 ppm de TIC809. En contraste, una construcción similar bajo el control de un promotor e35S presentó en promedio aproximadamente 1,4 ppm de proteína TIC809 en tejido radicular y aproximadamente 1,7 ppm en las hojas (n = 87).

5 **Ejemplo 9**

En este ejemplo se ilustra la co-expresión *in planta* de TIC809 y TIC810, cada una bajo el control de distintos promotores.

En el Ejemplo 7, se expresaron los genes TIC809 y TIC810 *in planta* a partir de cassettes de expresión separados, donde la expresión de cada secuencia
10 codificante fue dirigida a partir de promotores e35S separados pero idénticos. En este ejemplo, se diseñaron cassettes de expresión para que la expresión de TIC809 se localizara sustancialmente en el tejido de la raíz usando un promotor RCc3, mientras que la expresión de TIC810 estuvo bajo el control de un promotor e35S.

15 pMON64150 contiene dos cassettes de expresión. Un cassette (SEQ ID N° 40) contenía una secuencia codificante dirigida al cloroplasto TIC809, unida operativamente en su extremo 5' con un promotor RCc3 de arroz y un intrón de la proteína de ataque calórico de maíz HSP70, y en su extremo 3', con una secuencia 3' de terminación de la transcripción y poliadenilación hsp17. El otro
20 cassette (SEQ ID N° 40) contenía una secuencia codificante dirigida al cloroplasto TIC810, unida operativamente en su extremo 5' con un promotor e35S y una secuencia de intrón de actina de arroz, y en su extremo 3', con una secuencia 3' de terminación de la transcripción y poliadenilación hsp17.

pMON64151 es idéntico a pMON64150, excepto que las secuencias
25 codificantes en los dos cassettes de expresión carecen de la secuencia codificante del péptido de tránsito a cloroplastos (SEQ ID N° 43 y SEQ ID N° 40, respectivamente).

Se evaluaron plantas regeneradas a partir de tejido de maíz transformado con pMON64150 o pMON64151 para confirmar la presencia y el carácter intacto
30 de las secuencias codificantes TIC809 y TIC810. Se evaluaron hojas y raíces de estos eventos en la etapa de 6 hojas, usando un ELISA para ET29 para determinar los niveles de acumulación de proteínas TIC809. Las plantas transformadas con pMON64150 presentaron en promedio aproximadamente 1,5 ppm de TIC809 por planta, mientras que las plantas transformadas con
35 pMON64151 presentaron en promedio aproximadamente 0,4 pm de TIC809 por planta. Las plantas pMON64150 presentaron niveles de acumulación de TIC809

en raíz de entre aproximadamente 0,4 y aproximadamente 6 ppm, y más de dos tercios de los eventos presentaron niveles de TIC809 de al menos aproximadamente 1 ppm. De forma consistente, el tejido foliar presentó niveles de acumulación de TIC809 inferiores a los límites de detección del ensayo.

5 La acumulación promedio de TIC809 en las raíces fue mayor en los eventos pMON64151 que en los eventos generados usando los cassettes de expresión dirigidos al cloroplasto pMON64150 (pMON64151, 6,6 ppm, versus pMON64150, 1,4 ppm). Estos resultados son consistentes con los resultados obtenidos usando construcciones en las que se expresó TIC809 a partir del promotor e35S
10 (pMON64138 y pMON64139). La mayor diferencia entre las plantas que expresaban TIC809 a partir del promotor RCc3 versus e35S fue la falta de acumulación de TIC809 en las hojas cuando la expresión fue controlada por el promotor RCc3. Los eventos pMON64150 y pMON64151 presentaron fenotipos normales.

15 **Ejemplo 10**

En este ejemplo se ilustra la actividad biológica insecticida contra especies de hemípteros de composiciones que comprenden TIC 809 y TIC 810, y homólogos de éstas, como se describe en la presente documentación.

En la presente documentación se han descrito las composiciones que
20 comprenden ET29 y/o TIC809 o ET37 como insecticidas para insectos plaga pertenecientes a especies de coleópteros. No se ha demostrado la actividad biológica insecticida de TIC810 y TIC812 sobre especies de insectos coleópteros, pero como se describe en la presente documentación, estas proteínas son útiles para facilitar el nivel de expresión elevado y la estabilidad de ET29 y/o TIC809 y
25 ET37. También se había demostrado con anterioridad la actividad biológica insecticida de ET29 dirigida contra especies de *Ctenocephalides*, y se anticipa que ET37 también demostrará actividad sobre esta especie. Se especuló que TIC810 y/o TIC812 también presentarían actividad biológica insecticida, por lo que estas proteínas se evaluaron en ensayos biológicos contra otras plagas de plantas, por
30 ejemplo, contra especies de insectos plaga Hemipteros, tales como *Lygus hesperus* (chinche vegetal manchada occidental; WTPB).

La WTPB es un insecto fitófago perforador-succionador que ataca numerosas malezas y cultivos. La WTPB daña los cultivos agrícolas, incluyendo el algodón, debido al daño por alimentación directa. Un ensayo para analizar
35 composiciones insecticidas usando esta clase de insectos debe permitir el comportamiento de alimentación natural del insecto. El ensayo de alimentación

empleado se basa en un formato de placa de microtitulación de 96 cavidades, usando un sistema de saché como se describe en Habibi et al., (*Archives of Insect Biochem. And Phys.* 50: 62-74 (2002)). La dieta artificial para la WTPB es proporcionada por Bio-Serv® (Bio-Serv® Diet F9644B, Frenchtown, NJ).

5 Se combinan quinientos dieciocho mililitros de agua autoclavada sometida a ebullición con 156,3 gramos de dieta Bio-Serv® F9644B en una mezcladora esterilizada en forma superficial. Se agregan los contenidos de cuatro huevos de pollo esterilizados de forma superficial, y se agita la mezcla hasta que está suave, luego se ajusta el volumen total en un litro y se deja enfriar. Se preparan muestras
10 de toxinas mezclando veinte microlitros de la muestra en la concentración deseada con doscientos microlitros de dieta combinada (1:10). Dependiendo de la cantidad de muestras individuales deseadas para la evaluación, es posible escalar esta cantidad positiva o negativamente.

Se coloca una lámina de Parafilm® (Pechiney Plastic Packing, Chicago, IL)
15 sobre un múltiple al vacío diseñado para un formato de 96 cavidades (Analytical Research Systems, Gainesville, FL), y se aplica un vacío de aproximadamente 20 milímetros de mercurio, que es suficiente para provocar la extrusión del Parafilm® en las cavidades. Se agregan cuarenta microlitros de muestra de prueba a las cavidades con Parafilm®. Luego se coloca una lámina de película Mylar (Clear
20 Lam Packaging, Inc., Elk Grove Village, IL) sobre el Parafilm®, y se la sella suavemente con un hierro de costura (Bienfang Sealector II, Hunt Corporation, Philadelphia, PA). Los sachés de Parafilm® se colocan posteriormente sobre una placa de fondo plano de 96 cavidades, que contenía huevos de WTPB suspendidos en agarosa. Al eclosionar, las ninfas de WTPB se alimentarán
25 perforando el saché presentado sobre ellas. La digestión extraoral como resultado de la extrusión de las secreciones orales de las WTPB en el saché puede resultar en la proteólisis y la degradación del contenido de la dieta antes de que sea ingerido por el insecto. Para asegurar la presentación de la proteína intacta al insecto en su dieta, se reemplazan los sachés cada dos días. Esta mejora permite
30 presentar el contenido de la dieta intacto por más tiempo durante el ensayo de alimentación. Los sachés con dietas para insectos se reemplazan los días dos, cuatro y seis. Las calificaciones de impedimento y mortalidad se determinan el día 8 y se comparan con el control sin tratar (UTC).

Se evaluó la toxicidad de las proteínas ET29 (o TIC809), TIC810, ET37 y
35 TIC812 (Solicitud de Patente de los EEUU N° 60\713111) contra la WTPB en forma individual y en combinaciones tales como, por ejemplo, TIC809 más

TIC810. Las proteínas cristalinas se expresaron en la cepa acristalífera de *Bacillus thuringiensis* EG10650, y se purificaron sobre gradientes por pasos con sacarosa para eliminar las esporas y los restos celulares. Se prepararon gradientes por pasos con sacarosa (10 ml de 55, 70 y 79% de sacarosa en Tris-HCl 10 mM, EDTA 0,1 mM, 0,005% de Triton X-100, pH 7,5) en tubos de centrifuga Ultra-Clear de 25 por 89 mm (Beckman Instruments, Inc., Palo Alto, CA). Se aplicaron suspensiones de esporas-cristales por capas sobre los gradientes, y se centrifugó a 18000 rpm (4°C) por 4-18 horas en una ultracentrifuga equipada con un rotor SW28. Se recuperaron cristales proteicos a partir de la interfase de 55-70% o 70-79% de sacarosa, y se los suspendió en Tris-HCl 25 mM, pH 7,5. Los ensayos biológicos iniciales contenían las proteínas insecticidas Bt purificadas a una concentración final de 200 partes por millón (ppm). Se incluyó la toxina específica para coleópteros Cry3Bb1 (Donovan et al., Appl. Environ. Microbiol. 58: 3921-3927 (1992)), toxina específica para lepidópteros Cry1Ac (Baum et al., Appl. Environ. Microbiol. 56:3420-3428 (1990) y toxina específica para lepidópteros Cry1Bb1 (Patente de los EEUU N° 5322687) como controles negativos en el ensayo de alimentación. Sorprendentemente, las ninfas de WTPB resultaron impedidas y presentaron mortalidad cuando fueron expuestas a la combinación de las proteínas TIC810 más ET29, y según se esperaba, no hubo impedimento alguno no mortalidad cuando solamente se las expuso a ET29, o a cualquiera de las otras proteínas Bt Cry3Bb1, Cry1Ac o Cry1Bb1, ninguna de las cuales presentó diferencias significativas en comparación con el control sin tratar.

Los ensayos biológicos con *Lygus* se expandieron para incluir preparaciones cristalinas individuales de TIC810 y TIC812, y una mezcla de TIC812 y ET37. De forma similar a los resultados descriptos previamente, solamente la combinación de las dos proteínas presentó una actividad insecticida significativa. TIC810 más ET29 y TIC812 más ET37 presentaron una mortalidad significativa y una reducción en masa en comparación con los controles sin tratar o los ensayos biológicos en los que se usaron solamente las proteínas individuales. Sin embargo, las combinaciones de TIC810 más ET29 (o TIC809) presentaron una mayor mortalidad y reducción de masa que la combinación de TIC812 más ET37.

Los resultados de estos ensayos biológicos indicaron que ni TIC810 ni TIC812 solas son tóxicas para la WTPB, y que una mezcla de TIC810 y ET29, o de TIC812 y ET37 es tóxica para la WTPB, lo que coincide con los resultados

observados cuando se realizó la evaluación contra larvas de la oruga de la raíz del maíz.

Ejemplo 11

En este ejemplo se ilustra la construcción de cassettes para expresar
5 TIC809 y/o TIC810, y homólogos de éstas.

Se construyen vectores para transformar plantas de modo que se obtenga un nivel de expresión elevado de proteínas tóxicas para la oruga de las raíces TIC809 y/o ET37 en plantas. Pueden usarse vectores que contienen secuencias codificantes TIC812 y ET37 para co-expresar las proteínas TIC812 y ET37, con lo
10 que se obtienen plantas con protección contra insectos que presentan niveles elevados de producción de la proteína ET37 *in planta*. La co-expresión de TIC810 junto con ET37 es suficiente para obtener niveles elevados estables de acumulación de ET37 en una célula huésped. De forma similar, la co-expresión de TIC812 junto con ET29 o aún TIC809 es suficiente para obtener niveles elevados
15 estables de acumulación de ET29 o TIC809 en una célula huésped, como se indicó previamente en la presente documentación.

Se anticipa que las proteínas de la clase Cyt1 y Cyt2 que presentan entre aproximadamente 15 y aproximadamente 100 por ciento de similitud de secuencia de aminoácidos con ET29 y/o ET37 presentarán una expresión y/o una
20 acumulación mejorada cuando se expresen en una célula huésped junto con TIC810, TIC812, o una proteína ortóloga u homóloga que tenga una secuencia de aminoácidos que presente entre aproximadamente 50 y aproximadamente 100% de similitud de secuencia de aminoácidos con TIC810 o TIC812, y que cualquier efecto fenotípico negativo provocado por la expresión de esta proteína Cyt será
25 mejorado por la co-expresión de dicha proteína Cyt con TIC810, TIC812 o variantes de éstas.

En la memoria descriptiva anterior se describen realizaciones preferidas de la presente invención. Aquellos entrenados en la técnica comprenderán que, sin apartarse del alcance y el espíritu de la presente invención, y sin
30 experimentaciones innecesarias, es posible poner en práctica la presente invención dentro de un rango amplio de parámetros equivalentes. Si bien se ha descrito la presente invención en conexión con sus realizaciones específicas, se comprenderá que pueden realizarse modificaciones adicionales. En la presente invención se incluye cualquier uso, variación o adaptación de acuerdo con los
35 principios de la invención en general. Son posibles diversas permutaciones y

combinaciones de los elementos proporcionados en las reivindicaciones, y éstas quedan dentro del alcance de esta invención.

Todas las publicaciones, las patentes y las solicitudes de patentes publicadas citadas en esta memoria descriptiva se incorporan en la presente
5 documentación a modo de referencia, en la misma extensión en que se indicó que se incorporaba cada publicación o patente individual especialmente e individualmente modo de referencia.

REIVINDICACIONES:

1. Una secuencia de nucleótidos aislada y purificada que codifica una proteína insecticida, donde dicha proteína se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 12 y
5 SEQ ID N° 47.
2. La secuencia de nucleótidos aislada y purificada de la reivindicación 1, que se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 9, SEQ ID N° 11 y SEQ ID N° 46.
3. Una proteína insecticida aislada y purificada que se selecciona del grupo
10 que consiste en una ET29, una ET37, una TIC810, una TIC812, una TIC809 y una TIC127.
4. Una célula vegetal transformada con una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína insecticida, donde dicha proteína se selecciona del grupo que consiste en una ET29, una ET37, una TIC810, una TIC812, una TIC809 y una
15 TIC127.
5. Progenie de la planta de la reivindicación 4, donde dicha progenie comprende dicha secuencia de nucleótidos.
6. Un vector que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína seleccionada del grupo que consiste en ET29, ET37, TIC810, TIC812,
20 TIC809 y TIC127.
7. Un método para mejorar la acumulación de una primera proteína insecticida en una célula huésped, donde dicho método comprende expresar de forma contemporánea dicha primera proteína seleccionada del grupo que consiste en ET29, TIC809 y ET37, con una segunda proteína insecticida seleccionada del
25 grupo que consiste en TIC810 y TIC812, donde dicha expresión contemporánea mejora la acumulación de la primera proteína, en comparación con la acumulación de dicha primera proteína, expresada en ausencia de dicha segunda proteína.
8. Una composición que presenta actividad insecticida, que comprende una primera proteína seleccionada del grupo que consiste en ET29, ET37 y TIC809, y
30 un segunda proteína seleccionada del grupo que consiste en TIC810 y TIC812.
9. La composición de la reivindicación 8, donde dicha primera proteína es TIC809 y dicha segunda proteína es TIC810.
10. La composición de la reivindicación 8 donde la relación entre dicha primera proteína y dicha segunda proteína es de entre aproximadamente 1:1 y
35 aproximadamente 2:1.

11. La composición de la reivindicación 8, proporcionada en la dieta de un coleóptero o un hemíptero que es plaga de plantas, en una formulación aceptable para el uso agrícola.
12. La composición de la reivindicación 11, donde dicha formulación consiste en ambas proteínas expresadas en una célula vegetal.
13. La composición de la reivindicación 11, donde dicho coleóptero plaga es una oruga de la raíz, y dicho hemíptero plaga es una chinche *Lygus*.
14. Un producto comercial que comprende una cantidad detectable de una primera proteína seleccionada del grupo que consiste en ET29, ET37 y TIC809, y una cantidad detectable de una segunda proteína seleccionada del grupo que consiste en TIC810 y TIC812.
15. Un producto comercial que comprende una cantidad detectable de (1) una primera secuencia de nucleótidos que codifica una primera proteína seleccionada del grupo que consiste en ET29, ET37 y TIC809, y una segunda secuencia de nucleótidos que codifica una segunda proteína seleccionada del grupo que consiste en TIC810 y TIC812; (2) una primera proteína seleccionada del grupo que consiste en ET29, ET37 y TIC809, y una segunda proteína seleccionada del grupo que consiste en TIC810 y TIC812; (3) ambos (1) y (2); o (4) cualquier combinación de (1) y (2).
16. El producto comercial de cualquiera de las reivindicaciones 14-15, seleccionado del grupo que consiste en semillas de algodón, aceite de semilla de algodón, alimentos a base de semillas de algodón, semillas de soja, aceite de soja, alimentos a base de soja, harina de soja, bienes sólidos secos obtenidos por destilación, semillas de maíz, harina de maíz, alimentos a base de maíz, jarabe de maíz, aceite de maíz, almidón de maíz, y cereales manufacturados por completo o en parte, que contienen soja y/o subproductos de soja.
17. Un método para preparar una célula vegetal resistente a coleópteros y hemípteros plaga, que comprende transformar dicha célula vegetal para que exprese una cantidad efectiva como insecticida de una composición de toxinas, donde dicha composición de toxinas comprende una primera proteína seleccionada del grupo que consiste en ET29, ET37 y TIC809, y una segunda proteína seleccionada del grupo que consiste en TIC810 y TIC812.
18. El método de la reivindicación 17, donde dicha célula vegetal se regenera en una planta transgénica fértil.

19. El método de la reivindicación 17, donde dicha célula vegetal se selecciona del grupo que consiste en una célula de una planta monocotiledónea y una célula de una planta dicotiledónea.
20. El método de la reivindicación 19, donde (1) dicha célula de planta monocotiledónea se selecciona del grupo que consiste en una célula de una planta de maíz, trigo, avena, arroz, sorgo, mijo, trigo sarraceno, centeno, pasto (festuca, Timothy, bromo, vergel, San Agustín, Bermuda, pasto curvo) y cebada, y (2) dicha célula de planta dicotiledónea se selecciona del grupo que consiste en una célula de una planta de alfalfa, manzana, albaricoque, espárrago, poroto, baya, zarzamora, grosella, canola, zanahoria, coliflor, apio, cereza, garbanzo, árboles de cítricos, algodón, judía, arándano agrio, pepino, cucúrbita, berenjena, árboles frutales, uva, limón, lechuga, lino, melón, mostaza, árboles productores de nueces, okra, naranja, arveja, durazno, maní, pera, ciruela, papa, soja, zapallito, frutilla, remolacha, girasol, batata, tomate, nabo y verduras.
21. El método de la reivindicación 18, donde se producen células de plantas de la progenie a partir de dicha planta transgénica, y donde dichas células de plantas de la progenie comprenden dichas primera y segunda proteínas.
22. Una célula huésped que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína cyt, donde dicha proteína se selecciona del grupo que consiste en una TIC809, una ET37, una TIC810, una TIC812 y una TIC127.
23. La célula huésped de la reivindicación 22, seleccionada del grupo que consiste en una célula vegetal, una célula fúngica y una célula bacteriana.
24. La célula huésped de la reivindicación 23, donde dicha célula vegetal se selecciona del grupo que consiste en una célula de una planta monocotiledónea y una célula de una planta dicotiledónea.
25. La célula huésped de la reivindicación 24, donde (1) dicha célula de planta monocotiledónea se selecciona del grupo que consiste en una célula de una planta de maíz, trigo, avena, arroz, sorgo, mijo, trigo sarraceno, centeno, pasto (festuca, Timothy, bromo, vergel, San Agustín, Bermuda, pasto curvo) y cebada, y (2) dicha célula de planta dicotiledónea se selecciona del grupo que consiste en una célula de una planta de alfalfa, manzana, albaricoque, espárrago, poroto, baya, zarzamora, grosella, canola, zanahoria, coliflor, apio, cereza, garbanzo, árboles de cítricos, algodón, judía, arándano agrio, pepino, cucúrbita, berenjena, árboles frutales, uva, limón, lechuga, lino, melón, mostaza, árboles productores de nueces, okra, naranja, arveja, durazno, maní, pera, ciruela, papa, soja, zapallito, frutilla, remolacha, girasol, batata, tomate, nabo y verduras.

26. Un cassette de expresión para usar en la expresión de una proteína insecticida en una célula huésped, donde dicho cassette de expresión comprende una secuencia promotora funcional en dicha célula huésped, unida operativamente a una secuencia de nucleótidos que codifica dicha proteína, donde dicha proteína se selecciona del grupo que consiste en TIC809, TIC810, TIC812, ET37 y TIC127.
27. El cassette de expresión de la reivindicación 26, donde dicha célula huésped se selecciona del grupo que consiste en una célula bacteriana, una célula fúngica, una célula de mamífero y una célula vegetal.
28. El cassette de expresión de la reivindicación 27 donde
- 10 (a) dicha célula bacteriana se selecciona del grupo que consiste en una célula de una especie de *Bacillus*, una célula de una especie de *Enterobacteriaceae*, una célula de una especie de *Pseudomonas*, una célula de una especie de *Clostridium* y una célula de una especie de *Rhizobium*, y una célula de una especie de *Agrobacterium*; y
- 15 (b) dicha célula vegetal se selecciona del grupo de plantas que consiste en una planta dicotiledónea y una planta monocotiledónea, donde dicha planta dicotiledónea se selecciona adicionalmente del grupo que consiste en alfalfa, manzana, albaricoque, espárrago, poroto, baya, zarzamora, grosella, canola, zanahoria, coliflor, apio, cereza, garbanzo, árboles de
- 20 cítricos, algodón, judía, arándano agrio, pepino, cucúrbita, berenjena, árboles frutales, uva, limón, lechuga, lino, melón, mostaza, árboles productores de nueces, okra, naranja, arveja, durazno, maní, pera, ciruela, papa, soja, zapallito, frutilla, remolacha, girasol, batata, tomate, nabo y verduras, y dicha planta monocotiledónea se selecciona adicionalmente del
- 25 grupo que consiste en maíz, trigo, avena, arroz, sorgo, mijo, trigo sarraceno, centeno, pasto (festuca, Timothy, broma, vergel, San Agustín, Bermuda, pasto curvo) y cebada.
29. El cassette de expresión de la reivindicación 26, donde dicha célula huésped es una célula vegetal y dicho cassette de expresión comprende
- 30 adicionalmente, unidas operativamente, una secuencia seleccionada del grupo que consiste en una secuencia potenciadora de la expresión, una secuencia directriz no traducida, una secuencia de un intrón, una secuencia que codifica un péptido de tránsito al cloroplasto, y una secuencia de terminación de la transcripción y poliadenilación.
- 35 30. Un vector que comprende el cassette de expresión de cualquiera de las reivindicaciones 26 a 29.

31. Una célula vegetal transgénica resistente a infestaciones de insectos, que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una primera toxina cyt, seleccionada del grupo que consiste en ET29, TIC809 y ET37, y una segunda toxina cyt, seleccionada del grupo que consiste en TIC810 y TIC812.
- 5 32. La célula vegetal transgénica de la reivindicación 31, donde dicha célula vegetal transgénica se selecciona del grupo que consiste en una célula de una planta dicotiledónea y una célula de una planta monocotiledónea, donde dicha célula de planta dicotiledónea se selecciona del grupo que consiste en alfalfa, manzana, albaricoque, espárrago, poroto, baya, zarzamora, grosella, canola, 10 zanahoria, coliflor, apio, cereza, garbanzo, árboles de cítricos, algodón, judía, arándano agrio, pepino, cucúrbita, berenjena, árboles frutales, uva, limón, lechuga, lino, melón, mostaza, árboles productores de nueces, okra, naranja, arveja, durazno, maní, pera, ciruela, papa, soja, zapallito, frutilla, remolacha, girasol, batata, tomate, nabo y verduras, y dicha célula de planta monocotiledónea se 15 selecciona del grupo que consiste en maíz, trigo, avena, arroz, sorgo, mijo, trigo sarraceno, centeno, pasto (festuca, Timothy, bromo, vergel, San Agustín, Bermuda, pasto curvo) y cebada.
33. La célula vegetal transgénica de la reivindicación 32, resistente a (1) infestaciones de insectos coleópteros, donde dicho insecto coleóptero se 20 selecciona del grupo que consiste en un miembro de las familias Chrysomelidae, Cucujidae, Scarabaeidae, Trogositidae, Tenebrionidae, Curculionidae, Elateridae y Bruchidae, y (2) infestaciones de insectos hemípteros, donde dicho hemíptero se seleccionan entre los subórdenes Heteroptera y Homoptera.
34. La célula vegetal transgénica de la reivindicación 33, donde dicho miembro 25 de la familia Chrysomelidae pertenece a una especie de *Diabrotica* seleccionada del grupo que consiste en *D. virgifera* (oruga de la raíz del maíz occidental), *D. undecempunctata* (oruga de la raíz del maíz del sur), *D. barberi* (oruga de la raíz del maíz del norte), *D. virgifera zea* (oruga de la raíz del maíz mexicana), *D. balteata* (oruga de la raíz del maíz del Brasil) y complejo de la oruga de la raíz del 30 maíz del Brasil (BCR), que comprende además *D. viridula* y *D. speciosa*.
35. Progenie de la célula vegetal transgénica de la reivindicación 33, donde dicha progenie comprende dicha secuencia de nucleótidos.
36. Un método para controlar una infestación de insectos en una planta, que comprende introducir en la dieta del insecto una o más células vegetales 35 transformadas con una secuencia de ácido nucleico, que comprende un promotor funcional en plantas unido operativamente a una secuencia de nucleótidos que

codifica una proteína de fusión, donde dicha proteína de fusión comprende una primera secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 8 y SEQ ID N° 14, y una segunda secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID N° 4 y SEQ ID N° 6.

- 5 37. Un método para proteger un cultivo en un campo de una infestación de insectos, que comprende cultivar una planta de cultivo, que comprende una cantidad efectiva como insecticida una primera proteína y una segunda proteína, donde dicha primera proteína se selecciona del grupo que consiste en una ET37, una ET29 y una TIC809, y dicha segunda proteína se selecciona del grupo que
10 consiste en TIC810 y TIC812, y proporcionar las proteínas juntas en la dieta del insecto, para inhibir la supervivencia del insecto en dicha planta de cultivo transgénica.

38. El método de la reivindicación 37, donde dicho insecto se selecciona del grupo que consiste en un insecto coleóptero y un insecto hemíptero.

- 15 39. El método de la reivindicación 37, donde dicha planta de cultivo transgénica comprende además un adicional, tóxico para el mismo insecto que la primera y la segunda proteína, donde dicho agente insecticida adicional se selecciona del grupo que consiste en una toxina de *Bacillus*, una toxina de *Xenorhabdus*, una toxina de *Photorhabdus* y un ARNs específico para suprimir uno o más genes
20 esenciales en dicho insecto.

40. El método de la reivindicación 37-39, donde se mejora el rendimiento de dicho cultivo, en comparación con el rendimiento de un cultivo isogénico que carece de dichas proteínas insecticidas.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Monsanto Technology LLC
 Anderson, Heather M
 5 Baum, James A
 Chay, Catherine A
 Roberts, James K
 Zhang, Bei

10 <120> COMPOSICIONES INSECTICIDAS Y MÉTODOS PARA CREAR PLANTAS
 TRANSGÉNICAS RESISTENTES A INSECTOS

<130> 38-21 (53327) B

15 <150> 60/713,111
 <151> 2005-08-31

<160> 47

20 <170> PatentIn version 3.3

<210> 1
 <211> 696
 <212> ADN

25 <213> Bacillus thuringiensis

<220>
 <221> CDS

30 <222> (1)..(696)
 <223> ET37

<400> . 1

	atg ttc ttt aat cgc gtt att aca tta aca gta cca tct tca gat gtg	48
35	Met Phe Phe Asn Arg Val Ile Thr Leu Thr Val Pro Ser Ser Asp Val	
	1 5 10 15	
	gtt aat tat agt gaa att tat cag gta gct cca caa tat gtg aat caa	96
	Val Asn Tyr Ser Glu Ile Tyr Gln Val Ala Pro Gln Tyr Val Asn Gln	
40	20 25 30	
	gct ctt acg cta gct aaa tat ttc caa gga gca att gat ggt tca aca	144
	Ala Leu Thr Leu Ala Lys Tyr Phe Gln Gly Ala Ile Asp Gly Ser Thr	
	35 40 45	

	tta cgt ttt gat ttt gaa aaa gcc tta caa att gca aat gat att cca	192
	Leu Arg Phe Asp Phe Glu Lys Ala Leu Gln Ile Ala Asn Asp Ile Pro	
	50 55 60	
5	cag gca gca gtg gta aac act tta aat caa act gtg cag caa ggt aca	240
	Gln Ala Ala Val Val Asn Thr Leu Asn Gln Thr Val Gln Gln Gly Thr	
	65 70 75 80	
	gtc caa gta tca gtg atg ata gac aag att gta gac att atg aag aat	288
10	Val Gln Val Ser Val Met Ile Asp Lys Ile Val Asp Ile Met Lys Asn	
	85 90 95	
	gta tta tct att gta att gat aac aaa aag ttt tgg gat cag gta aca	336
	Val Leu Ser Ile Val Ile Asp Asn Lys Lys Phe Trp Asp Gln Val Thr	
15	100 105 110	
	gct gct att aca aat aca ttc aca aat cta aat tcg caa gaa agc gaa	384
	Ala Ala Ile Thr Asn Thr Phe Thr Asn Leu Asn Ser Gln Glu Ser Glu	
	115 120 125	
20	gca tgg att ttt tat tac aaa gaa gat gca cat aaa act agt tac tat	432
	Ala Trp Ile Phe Tyr Tyr Lys Glu Asp Ala His Lys Thr Ser Tyr Tyr	
	130 135 140	
25	tat aat atc tta ttt gct ata cag gat gag gaa aca ggt ggg gta atg	480
	Tyr Asn Ile Leu Phe Ala Ile Gln Asp Glu Glu Thr Gly Gly Val Met	
	145 150 155 160	
	gcg aca tta ccg att gca ttt gat att agt gta gat att gaa aaa gaa	528
30	Ala Thr Leu Pro Ile Ala Phe Asp Ile Ser Val Asp Ile Glu Lys Glu	
	165 170 175	
	aag gtt cta ttt gtt act atc aag gat act gaa aat tat gct gtt aca	576
	Lys Val Leu Phe Val Thr Ile Lys Asp Thr Glu Asn Tyr Ala Val Thr	
35	180 185 190	
	gta aaa gct att aat gta gta caa gca ctt caa tct tcc cga gat tca	624
	Val Lys Ala Ile Asn Val Val Gln Ala Leu Gln Ser Ser Arg Asp Ser	
	195 200 205	
40	aaa gtt gta gat gct ttt aaa tcg cca cgt cac tta cct aga aaa aga	672
	Lys Val Val Asp Ala Phe Lys Ser Pro Arg His Leu Pro Arg Lys Arg	
	210 215 220	

cat aca att tgt agt aac tct taa
His Thr Ile Cys Ser Asn Ser
225 230

5
<210> 2
<211> 231
<212> PRT
<213> Bacillus thuringiensis

10
<400> 2

Met Phe Phe Asn Arg Val Ile Thr Leu Thr Val Pro Ser Ser Asp Val
1 5 10 15

15
Val Asn Tyr Ser Glu Ile Tyr Gln Val Ala Pro Gln Tyr Val Asn Gln
20 25 30

20
Ala Leu Thr Leu Ala Lys Tyr Phe Gln Gly Ala Ile Asp Gly Ser Thr
35 40 45

25
Leu Arg Phe Asp Phe Glu Lys Ala Leu Gln Ile Ala Asn Asp Ile Pro
50 55 60

30
Gln Ala Ala Val Val Asn Thr Leu Asn Gln Thr Val Gln Gln Gly Thr
65 70 75 80

35
Val Gln Val Ser Val Met Ile Asp Lys Ile Val Asp Ile Met Lys Asn
85 90 95

40
Val Leu Ser Ile Val Ile Asp Asn Lys Lys Phe Trp Asp Gln Val Thr
100 105 110

Ala Ala Ile Thr Asn Thr Phe Thr Asn Leu Asn Ser Gln Glu Ser Glu
115 120 125

Ala Trp Ile Phe Tyr Tyr Lys Glu Asp Ala His Lys Thr Ser Tyr Tyr
 130 135 140

5 Tyr Asn Ile Leu Phe Ala Ile Gln Asp Glu Glu Thr Gly Gly Val Met
 145 150 155 160

Ala Thr Leu Pro Ile Ala Phe Asp Ile Ser Val Asp Ile Glu Lys Glu
 10 165 170 175

Lys Val Leu Phe Val Thr Ile Lys Asp Thr Glu Asn Tyr Ala Val Thr
 15 180 185 190

Val Lys Ala Ile Asn Val Val Gln Ala Leu Gln Ser Ser Arg Asp Ser
 195 200 205

20 Lys Val Val Asp Ala Phe Lys Ser Pro Arg His Leu Pro Arg Lys Arg
 210 215 220

25 His Thr Ile Cys Ser Asn Ser
 225 230

30 <210> 3
 <211> 657
 <212> ADN
 <213> Bacillus thuringiensis

35 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(657)
 <223> TIC810

40 <400> 3
 gtg agt aaa gaa att cgt tta aat ttg agt aga gaa tca ggg gca gat 48
 Val Ser Lys Glu Ile Arg Leu Asn Leu Ser Arg Glu Ser Gly Ala Asp
 1 5 10 15

	tta tat tta aaa ata ctt gct ttt gta aaa cct gag cat ttt ttt caa	96
	Leu Tyr Leu Lys Ile Leu Ala Phe Val Lys Pro Glu His Phe Phe Gln	
	20 25 30	
5	gca tat tta tta tgt aga gaa ttt gag tct atc gta gat cct aca aca	144
	Ala Tyr Leu Leu Cys Arg Glu Phe Glu Ser Ile Val Asp Pro Thr Thr	
	35 40 45	
10	aga gaa tcg gat ttt gac aaa aca ctt acc att gta aag agt gat tca	192
	Arg Glu Ser Asp Phe Asp Lys Thr Leu Thr Ile Val Lys Ser Asp Ser	
	50 55 60	
15	act tta gtt acg gtt ggt aca atg aat act aaa ctt gtg aat agt caa	240
	Thr Leu Val Thr Val Gly Thr Met Asn Thr Lys Leu Val Asn Ser Gln	
	65 70 75 80	
20	gaa att cta gtt agt gat ttg att acg caa gtt gga agt cag ata gct	288
	Glu Ile Leu Val Ser Asp Leu Ile Thr Gln Val Gly Ser Gln Ile Ala	
	85 90 95	
25	gat acc tta ggt att aca gac att gat gca aat aca cag caa caa tta	336
	Asp Thr Leu Gly Ile Thr Asp Ile Asp Ala Asn Thr Gln Gln Gln Leu	
	100 105 110	
30	aca gaa tta att gga aat tta ttt gtg aat ctg aat tct caa gtt caa	384
	Thr Glu Leu Ile Gly Asn Leu Phe Val Asn Leu Asn Ser Gln Val Gln	
	115 120 125	
35	gaa tat att tat ttt tat gag gaa aaa gaa aag caa aca agt tat cgc	432
	Glu Tyr Ile Tyr Phe Tyr Glu Glu Lys Glu Lys Gln Thr Ser Tyr Arg	
	130 135 140	
40	tat aac atc ctt ttc gtt ttt gaa aaa gag tct ttt atc acc att tta	480
	Tyr Asn Ile Leu Phe Val Phe Glu Lys Glu Ser Phe Ile Thr Ile Leu	
	145 150 155 160	
45	cca atg gga ttc gat gtg act gtg aac act aat aaa gaa gcg gtt ctt	528
	Pro Met Gly Phe Asp Val Thr Val Asn Thr Asn Lys Glu Ala Val Leu	
	165 170 175	
50	aag tta aca cct aaa gat aaa gtc act tat ggt cat gta tca gta aaa	576
	Lys Leu Thr Pro Lys Asp Lys Val Thr Tyr Gly His Val Ser Val Lys	
	180 185 190	

gct tta aat att att caa ctt atc aca gaa gat aaa ttt aac ttt ctt 624
Ala Leu Asn Ile Ile Gln Leu Ile Thr Glu Asp Lys Phe Asn Phe Leu
195 200 205

5 gct acg tta aaa aag gca cta aaa act cta taa 657
Ala Thr Leu Lys Lys Ala Leu Lys Thr Leu
210 215

```
10  <210>  4
    <211>  218
    <212>  PRT
    <213>  Bacillus thuringiensis
```

15 <400> 4

Val Ser Lys Glu Ile Arg Leu Asn Leu Ser Arg Glu Ser Gly Ala Asp
1 5 10 15

20
Leu Tyr Leu Lys Ile Leu Ala Phe Val Lys Pro Glu His Phe Phe Gln
20 25 30

25 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
30 50 55 60

Thr Leu Val Thr Val Gly Thr Met Asn Thr Lys Leu Val Asn Ser Gln
65 70 75 80

35

Glu Ile Leu Val Ser Asp Leu Ile Thr Gln Val Gly Ser Gln Ile Ala

85 90 95

40
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

5 Glu Tyr Ile Tyr Phe Tyr Glu Glu Lys Glu Lys Gln Thr Ser Tyr Arg
 130 135 140

10 Tyr Asn Ile Leu Phe Val Phe Glu Lys Glu Ser Phe Ile Thr Ile Leu
 145 150 155 160

15 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

20 Ala Leu Asn Ile Ile Gln Leu Ile Thr Glu Asp Lys Phe Asn Phe Leu
 195 200 205

25 Ala Thr Leu Lys Lys Ala Leu Lys Thr Leu
 210 215

30 <210> 5
 <211> 657
 <212> ADN
 <213> Bacillus thuringiensis

35 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(657)
 <223> TIC812

40 <400> 5
 gtg agt aaa gaa att cgt tta aat ttg agt aga gaa tca ggg gca gat 48
 Val Ser Lys Glu Ile Arg Leu Asn Leu Ser Arg Glu Ser Gly Ala Asp
 1 5 10 15

	tta tat tta aaa ata ctt gct ttt gta aaa cct gag cat ttt ttt caa	96
	Leu Tyr Leu Lys Ile Leu Ala Phe Val Lys Pro Glu His Phe Phe Gln	
	20 25 30	
5	gca tat tta tta tgt aga gaa ttt gag tct atc gta gat cct aca aca	144
	Ala Tyr Leu Leu Cys Arg Glu Phe Glu Ser Ile Val Asp Pro Thr Thr	
	35 40 45	
	aga gaa ttg gat ttt gac aaa acg ctt acc att gta aag agt gat tca	192
10	Arg Glu Leu Asp Phe Asp Lys Thr Leu Thr Ile Val Lys Ser Asp Ser	
	50 55 60	
	act tta gtt acg gtt ggt aca atg aat act aaa ctt gtg aat agt caa	240
	Thr Leu Val Thr Val Gly Thr Met Asn Thr Lys Leu Val Asn Ser Gln	
15	65 70 75 80	
	gaa att cta gtt agt gat ttg att aag caa gtt gga agt cag ata gct	288
	Glu Ile Leu Val Ser Asp Leu Ile Lys Gln Val Gly Ser Gln Ile Ala	
	85 90 95	
20	gat acc tta ggt att aca gac att gat gca aat aca cag caa cga tta	336
	Asp Thr Leu Gly Ile Thr Asp Ile Asp Ala Asn Thr Gln Gln Arg Leu	
	100 105 110	
25	acg gaa tta att gaa aat tta ttt gtg aat ctg aat tct caa gtt caa	384
	Thr Glu Leu Ile Glu Asn Leu Phe Val Asn Leu Asn Ser Gln Val Gln	
	115 120 125	
	gac tat att tat ttt tat gag gaa aaa gaa aag caa aca agt tat cgc	432
30	Asp Tyr Ile Tyr Phe Tyr Glu Glu Lys Glu Lys Gln Thr Ser Tyr Arg	
	130 135 140	
	tat aac atc ctt ttc gtt ttt gaa aaa gag tct ttt atc acc att tta	480
	Tyr Asn Ile Leu Phe Val Phe Glu Lys Glu Ser Phe Ile Thr Ile Leu	
35	145 150 155 160	
	cca atg gga ttc gat gtg act gtg aac act aat aaa gaa gcg gtt ctt	528
	Pro Met Gly Phe Asp Val Thr Val Asn Thr Asn Lys Glu Ala Val Leu	
	165 170 175	
40	aag tta aca cct aaa gat aaa gtc act tat ggt cat gta tca gta aaa	576
	Lys Leu Thr Pro Lys Asp Lys Val Thr Tyr Gly His Val Ser Val Lys	
	180 185 190	

gct tta aat att att caa ttt atc aca gaa gat aaa ttg aac ttt ctt 624
Ala Leu Asn Ile Ile Gln Phe Ile Thr Glu Asp Lys Leu Asn Phe Leu
195 200 205

5 gct aca tta aaa aag gca cta aaa act cta taa 657
Ala Thr Leu Lys Lys Ala Leu Lys Thr Leu
210 215

10 <210> 6
<211> 218
<212> PRT
<213> Bacillus thuringiensis

15 <400> 6

Val Ser Lys Glu Ile Arg Leu Asn Leu Ser Arg Glu Ser Gly Ala Asp
1 5 10 15

20
Leu Tyr Leu Lys Ile Leu Ala Phe Val Lys Pro Glu His Phe Phe Gln
20 25 30

25 Ala Tyr Leu Leu Cys Arg Glu Phe Glu Ser Ile Val Asp Pro Thr Thr
35 40 45

Arg Glu Leu Asp Phe Asp Lys Thr Leu Thr Ile Val Lys Ser Asp Ser
30 50 55 60

Thr Leu Val Thr Val Gly Thr Met Asn Thr Lys Leu Val Asn Ser Gln
65 70 75 80

35
Glu Ile Leu Val Ser Asp Leu Ile Lys Gln Val Gly Ser Gln Ile Ala
85 90 95

40
Asp Thr Leu Gly Ile Thr Asp Ile Asp Ala Asn Thr Gln Gln Arg Leu
100 105 110

Thr Glu Leu Ile Glu Asn Leu Phe Val Asn Leu Asn Ser Gln Val Gln
115 120 125

5 Asp 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
10 145 150 155 160

Pro Met Gly Phe Asp Val Thr Val Asn Thr Asn Lys Glu Ala Val Leu
15 165 170 175

Lys Leu Thr Pro Lys Asp Lys Val Thr Tyr Gly His Val Ser Val Lys
180 185 190

20 Ala Leu Asn Ile Ile Gln Phe Ile Thr Glu Asp Lys Leu Asn Phe Leu
195 200 205

25 Ala Thr Leu Lys Lys Ala Leu Lys Thr Leu
210 215

<210> 7

30 <211> 696
<212> ADN
<213> Bacillus thuringiensis

35 <220>
<221> CDS
<222> (1)..(696)
<223> ET29

40 <400> 7
atg ttc ttt aat cgc gtt att aca tta aca gta cca tct tca gat gtg 48
Met Phe Phe Asn Arg Val Ile Thr Leu Thr Val Pro Ser Ser Asp Val
1 5 10 15

	ggt aat tat agt gaa att tat cag gta gct cca caa tat gtg aat caa	96
	Val Asn Tyr Ser Glu Ile Tyr Gln Val Ala Pro Gln Tyr Val Asn Gln	
	20 25 30	
5	gct ctt acg cta gct aaa tat ttc caa gga gca att gat ggt tca aca	144
	Ala Leu Thr Leu Ala Lys Tyr Phe Gln Gly Ala Ile Asp Gly Ser Thr	
	35 40 45	
	tta cgt ttt gat ttt gaa aaa gcc tta caa att gca aat gat att cca	192
10	Leu Arg Phe Asp Phe Glu Lys Ala Leu Gln Ile Ala Asn Asp Ile Pro	
	50 55 60	
	cag gca gca gtg gta aac act tta aat caa act gtg cag caa ggt aca	240
	Gln Ala Ala Val Val Asn Thr Leu Asn Gln Thr Val Gln Gln Gly Thr	
15	65 70 75 80	
	gtc caa gta tca gtg atg ata gac aag att gta gac att atg aag aat	288
	Val Gln Val Ser Val Met Ile Asp Lys Ile Val Asp Ile Met Lys Asn	
	85 90 95	
20	gta tta tct att gta att gat aac aaa aag ttt tgg gat cag gta aca	336
	Val Leu Ser Ile Val Ile Asp Asn Lys Lys Phe Trp Asp Gln Val Thr	
	100 105 110	
25	gct gct att aca aat aca ttc aca aat cta aat tcg caa gaa agc gaa	384
	Ala Ala Ile Thr Asn Thr Phe Thr Asn Leu Asn Ser Gln Glu Ser Glu	
	115 120 125	
	gca tgg att ttt tat tac aaa gaa gat gca cat aaa act agt tac tat	432
30	Ala Trp Ile Phe Tyr Tyr Lys Glu Asp Ala His Lys Thr Ser Tyr Tyr	
	130 135 140	
	tat aat atc tta ttt gct ata cag gat gag gaa aca ggt ggg gta atg	480
	Tyr Asn Ile Leu Phe Ala Ile Gln Asp Glu Glu Thr Gly Gly Val Met	
35	145 150 155 160	
	gcg aca tta ccg att gca ttt gat att agt gta gat att gaa aaa gaa	528
	Ala Thr Leu Pro Ile Ala Phe Asp Ile Ser Val Asp Ile Glu Lys Glu	
	165 170 175	
40	aag gtt cta ttt gtt act atc aag gat act gaa aat tat gcg gtt aca	576
	Lys Val Leu Phe Val Thr Ile Lys Asp Thr Glu Asn Tyr Ala Val Thr	
	180 185 190	

gta aaa gct att aat gta gta caa gca ctt caa tct tcc cga gat tca 624
Val Lys Ala Ile Asn Val Val Gln Ala Leu Gln Ser Ser Arg Asp Ser
195 200 205

5 aaa gtt gta gat gct ttt aaa tcg cca cgt cac tta cct aga aaa aga 672
Lys Val Val Asp Ala Phe Lys Ser Pro Arg His Leu Pro Arg Lys Arg
210 215 220

cat aaa att tgt agt aac tct taa 696
10 His Lys Ile Cys Ser Asn Ser
225 230

<210> 8
15 <211> 231
<212> PRT
<213> Bacillus thuringiensis

<400> 8
20
Met Phe Phe Asn Arg Val Ile Thr Leu Thr Val Pro Ser Ser Asp Val
1 5 10 15

25 Val Asn Tyr Ser Glu Ile Tyr Gln Val Ala Pro Gln Tyr Val Asn Gln
20 25 30

Ala Leu Thr Leu Ala Lys Tyr Phe Gln Gly Ala Ile Asp Gly Ser Thr
30 35 40 45

Leu Arg Phe Asp Phe Glu Lys Ala Leu Gln Ile Ala Asn Asp Ile Pro
50 55 60
35

Gln Ala Ala Val Val Asn Thr Leu Asn Gln Thr Val Gln Gln Gly Thr
65 70 75 80

40
Val Gln Val Ser Val Met Ile Asp Lys Ile Val Asp Ile Met Lys Asn
85 90 95

Val Leu Ser Ile Val Ile Asp Asn Lys Lys Phe Trp Asp Gln Val Thr
 100 105 110

5 Ala Ala Ile Thr Asn Thr Phe Thr Asn Leu Asn Ser Gln Glu Ser Glu
 115 120 125

10 Ala Trp Ile Phe Tyr Tyr Lys Glu Asp Ala His Lys Thr Ser Tyr Tyr
 130 135 140

15 Tyr Asn Ile Leu Phe Ala Ile Gln Asp Glu Glu Thr Gly Gly Val Met
 145 150 155 160

Ala Thr Leu Pro Ile Ala Phe Asp Ile Ser Val Asp Ile Glu Lys Glu
 165 170 175

20 Lys Val Leu Phe Val Thr Ile Lys Asp Thr Glu Asn Tyr Ala Val Thr
 180 185 190

25 Val Lys Ala Ile Asn Val Val Gln Ala Leu Gln Ser Ser Arg Asp Ser
 195 200 205

30 Lys Val Val Asp Ala Phe Lys Ser Pro Arg His Leu Pro Arg Lys Arg
 210 215 220

35 His Lys Ile Cys Ser Asn Ser
 225 230

<210> 9
 <211> 1411
 <212> ADN
 40 <213> Bacillus thuringiensis

<220>
 <221> característica_misc

<222> (1)..(1411)

<223> TIC810 ORF 1-657; ET29 ORF 716-1411

<400> 9

5	atgagtaaag aaattcgttt aaatttgagt agagaatcag gggcagattt atatttaaaa	60
	atacttgott ttgtaaaacc tgagcatttt ttccaagcat atttattatg tagagaattt	120
	gagtctatcg tagatcctac aacaagagaa tcggattttg acaaaacaact taccattgta	180
10	aagagtgatt caactttagt tacggttggt acaatgaata ctaaacttgt gaatagtcaa	240
	gaaattctag ttagtgattt gattacgcaa gttggaagtc agatagctga taccttaggt	300
15	attacagaca ttgatgcaaa tacacagcaa caattaacag aattaattgg aaatttattt	360
	gtgaatctga attctcaagt tcaagaatat atttattttt atgaggaaaa agaaaagcaa	420
	acaagttatc gctataacat ccttttcggt ttgaaaaag agtcttttat caccatttta	480
20	ccaatgggat tcgatgtgac tgtgaacaact aataaagaag cggttcttaa gttaacacct	540
	aaagataaag tcacttatgg tcatgtatca gtaaaagctt taaatattat tcaacttalc	600
25	acagaagata aatttaactt tottgotaca ttaaaaaagg cactaaaaac tctataagcg	660
	ggttaagtag gtaaaataga attaaaatga aacagtatga aaggggtaat tttatatggt	720
	ctttaatcgc gttattacat taacagtacc atcttcagat gtgggttaatt atagtgaat	780
30	ttatcaggta gctccacaat atgtgaatca agctcttaag ctagctaaat atttccaagg	840
	agcaattgat ggttcaacat taogttttga ttttgaaaaa gccttacaaa ttgcaaatga	900
35	tattccapag gcagcagtgg taaacacttt aaatcaaact gtgcagcaag gtacagtcca	960
	agtatcagtg atgatagaca agattgtaga cattatgaag aatgtattat ctattgtaat	1020
	tgataacaaa aagttttggg atcaggtaac agctgctatt acaaatacat tcacaaatct	1080
40	aaattcgcaa gaaagcgaag catggatttt ttattacaaa gaagatgcac ataaaactag	1140
	ttactattat aatatcttat ttgctataca ggatgaggaa acaggtgggg taatggcgac	1200

attaccogatt gcatttgata ttagtgtaga tattgaaaaa gaaaagggtc tatttggtac 1260
 tatcaaggat actgaaaatt atgcgggtac agtaaaagct attaatgtag tacaagcact 1320
 5 tcaatcttcc cgagattcaa aagttgtaga tgctttttaa tegccacgct acttacctag 1380
 aaaaagacat aaaatttgta gtaactctta a 1411

10 <210> 10
 <211> 1411
 <212> ADN
 <213> Bacillus thuringiensis

15 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (1)..(1411)
 <223> TIC812 ORF 1-657; ET37 ORF 716-1411

20 <400> 10
 atgagtaaag aaattcgttt aaatttgagt agagaatcag gggcagattt atatttaaa 60
 atacttgctt ttgtaaaacc tgagcatttt tttcaagcat atttattatg tagagaattt 120
 25 gagtctatcg tagatcctac aacaagagaa ttggattttg acaaaacgct taccattgta 180
 aagagtgatt caactttagt tacggttggt acaatgaata ctaaacttgt gaatagtcaa 240
 30 gaaattctag ttagtgattt gattaagcaa gttggaagtc agatagctga taccttaggt 300
 attacagaca ttgatgcaaa tacacagcaa cgattaacgg aattaattga aaattttatt 360
 gtgaatctga attctcaagt tcaagactat atttattttt atgaggaaaa agaaaagcaa 420
 35 acaagttatc gctataacat ccttttcggt ttgaaaaag agtcttttat caccatttta 480
 ccaatgggat tcgatgtgac tgtgaacact aataaagaag cggttcttaa gtaaacacct 540
 40 aaagataaag tcaattatgg tcatgtatca gtaaaagctt taaatattat tcaatttatc 600
 acagaagata aattgaactt tcttgctaca ttaaaaaagg cactaaaaac tctataagtg 660
 ggtaagtag gtaaaataga attaaaatga aacagtatga aaggggtaat tttatatgtt 720

ctttaatcgc gttattacat taacagtacc atcttcagat gtggttaatt atagtgaaat 780

ttatcaggta gctccacaat atgtgaatca agctcttaag ctagctaaat atttccaagg 840

5 agcaattgat ggttcaacat tacgttttga ttttgaaaaa gocttacaaa ttgcaaatga 900

tattccacag gcagcagtgg taaacacttt aaatcaaact gtgcagcaag gtacagtcca 960

agtatcagtg atgatagaca agattgtaga cattatgaag aatgtattat ctattgtaat 1020

10 tgataacaaa aagttttggg atcaggtaac agctgtattt acaaatacat tcacaaatct 1080

aaattcgcaa gaaagcgaag catggatttt ttattacaaa gaagatgcac ataaaactag 1140

15 ttactattat aatctcttat ttgctataca ggatgaggaa acaggtgggg taatggcgac 1200

attaccgatt gcatttgata ttagtgtaga tattgaaaaa gaaaagggtt tatttggtac 1260

tatcaaggat actgaaaatt atgctgttac agtaaaagct attaattgtag tacaagcact 1320

20 tcaatcttcc cgagattcaa aagttgtaga tgcttttaaa tggccacgtc acttacctag 1380

aaaaagacat acaatttgta gtaactctta a 1411

25

<210> 11

<211> 1531

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> ORF TIC810 1-657; ORF ET37 716 - 1411

35

<220>

<221> caracteristica_misc

<222> (1)..(1531)

<223> TIC810 ORF 1-657; ET37 ORF 716-1411

40

<400> 11

gaattcgccc ttgcctaggt atgagtaaag aaattcgttt aaatttgagt agagaatcag 60

gggcagattt atatttaaaa ataacttgctt ttgtaaaacc tgagcatttt ttccaagcat 120

	atttattatg tagagaattt gagtctatcg tagatcctac aacaagagaa tcggattttg	180
	acaaaacact taccattgta aagagtgatt caacttttagt tacggttggg acaatgaata	240
5	ctaaaacttgt gaatagtcaa gaaattctag ttagtgattt gattaogcaa gttggaagtc	300
	agatagctga taccttaggt attacagaca ttgatgcaaa tacacagcaa caattaacag	360
	aattaattgg aaattttatt gtgaatctga attctcaagt tcaagaatat atttattttt	420
10	atgaggaaaa agaaaagcaa acaagttatc gotataacat ccttttcggt ttgaaaaag	480
	agtcttttat caccatttta ccaatgggat tcgatgtgac tgtgaacact aataaagaag	540
15	cggttcttaa gttaacacct aaagataaag tcacttatgg tcatgtatca gtaaaagctt	600
	taaatattat tcaacttato acagaagata aatttaactt tcttgctaca ttaaaaaagg	660
	cactaaaaac totataagcg gggttaagtag gtaaaataga attaaatga aacagtatga	720
20	aaggggtaat tttatatggt ctttaatcgc gttattacat taacagtacc atcttcagat	780
	gtgggttaatt atagtgaat ttatcaggta gctocacaat atgtgaatca agctcttacg	840
25	ctagctaaat atttccaagg agcaattgat gggtcaacat tacgttttga ttttgaaaaa	900
	gccttacaaa ttgcaaatga tattccacag gcagcagtg taaacacttt aaatcaaact	960
	gtgcagcaag gtacagtcca agtatcagtg atgatagaca agattgtaga cattatgaag	1020
30	aatgtattat ctattgtaat tgataacaaa aagttttggg atcaggtaac agctgctatt	1080
	acaaatacat tcacaaatct aaattcgcaa gaaagcgaag catggatttt ttattacaaa	1140
35	gaagatgcac ataaaactag ttactattat aatatcttat ttgctataca ggatgaggaa	1200
	acagggtggg taatggogao attacogatt gcatttgata ttagtgtaga tattgaaaaa	1260
	gaaaagggtc tatttggtac tatcaaggat actgaaaatt atgctgttac agtaaaagct	1320
40	attaatgtag tacaagcact tcaatcttcc cgagattcaa aagttgtaga tgcttttaaa	1380
	tcgcccagtc acttacctag aaaaagacat acaatttgta gtaactotta agaagaccga	1440

caataagata aaatcttatt gcctatcttc ttagaataac aaatggctgt tatggggaag 1500

cactaaatgg actogagtta agggcgaatt c 1531

5

<210> 12

<211> 1531

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> ORF TIC812 1-657; ORF ET29 716-1411

15

<220>

<221> característica_misc

<222> (1)..(1531)

<223> TIC812 ORF 1-657; ET29 ORF 716-1411

20

<400> 12

gaattcgccc ttgcttaggt atgagtaaag aaattcgttt aaatttgagt agagaatcag 60

gggcagattt atatttaaaa atacttgctt ttgtaaaacc tgagcatttt tttcaagcat 120

25

atttattatg tagagaattt gagtctatcg tagatctac aacaagagaa ttggattttg 180

acaaaacgct taccattgta aagagtgatt caactttagt tacggtttgt acaatgaata 240

ctaaacttgt gaatagtcaa gaaattctag ttagtgattt gattaagcaa gttggaagtc 300

30

agatagctga taccttaggt attacagaca ttgatgcaaa tacacagcaa cgattaacgg 360

aattaattga aaatttattt gtgaatctga attctcaagt tcaagactat atttattttt 420

35

atgaggaaaa agaaaagcaa acaagttatc gctataacat ccttttcggt ttgaaaaag 480

agtcttttat caccatttta ccaatgggat tcatgtgac tgtgaacact aataaagaag 540

cggttcttaa gttaacacct aaagataaag tcaattatgg tcatgtatca gtaaaagctt 600

40

taaatattat tcaatttato acagaagata aattgaactt tottgctaca ttaaaaaagg 660

cactaaaaac totataagtg ggttaagtag gtaaaataga attaaaatga aacagtatga 720

	aaggggtaat tttatatgtt ctttaatogo gttattacat taacagtacc atcttcagat	780
	gtgggttaatt atagtgaat ttatcaggta gotccacaat atgtgaatca agctcttacg	840
5	ctagctaaat atttccaagg agcaattgat ggttcaacat tacgttttga ttttgaaaaa	900
	gccttacaaa ttgcaaatga tattccacag gcagcagtg taaacacttt aaatcaaact	960
	gtgcagcaag gtacagtcca agtatcagtg atgatagaca agattgtaga cattatgaag	1020
10	aatgtattat ctattgtaat tgataacaaa aagttttggg atcaggtaac agctgctatt	1080
	acaaatacat tcacaaatct aaattcgcaa gaaagcgaag catggatttt ttattacaaa	1140
15	gaagatgcac ataaaactag ttactattat aatatcttat ttgctataca ggatgaggaa	1200
	acaggtgggg taatggcgac attaccgatt goatttgata ttagtgtaga tattgaaaaa	1260
	gaaaagggtc tatttgttac tatcaaggat actgaaaatt atgcgggttac agtaaaagct	1320
20	attaatgtag tacaagcact tcaatcttcc cgagattcaa aagttgtaga tgctttttaa	1380
	tcgccacgtc acttaactag aaaaagacat aaaatttgta gtaactctta agaagaccga	1440
25	caataagata aaatcttatt gtctatcttc ttagaataac aaatggctgt tatggggaag	1500
	cactaaatgg actcgagtta agggcgaatt c	1531
30	<210> 13	
	<211> 702	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> secuencia sintética para usar en la expresión de TIC809 (ET29 MET-ALA) en plantas	
40	<220>	
	<221> CDS	
	<222> (1)..(702)	
	<223> TIC809	

<400> 13		
	atg gcc ttc ttc aac cgg gtg atc acc ctc acg gtg ccg tcg tca gac	48
	Met Ala Phe Phe Asn Arg Val Ile Thr Leu Thr Val Pro Ser Ser Asp	
	1 5 10 15	
5		
	gtg gtc aac tac tcg gag atc tac cag gtg gct cct cag tat gtc aac	96
	Val Val Asn Tyr Ser Glu Ile Tyr Gln Val Ala Pro Gln Tyr Val Asn	
	20 25 30	
10		
	cag gcc ctg acc ctg gcc aag tac ttc cag ggc gcc atc gac ggc agc	144
	Gln Ala Leu Thr Leu Ala Lys Tyr Phe Gln Gly Ala Ile Asp Gly Ser	
	35 40 45	
	acc ctg agg ttc gac ttc gag aag gcg tta cag atc gcc aac gac atc	192
15	Thr Leu Arg Phe Asp Phe Glu Lys Ala Leu Gln Ile Ala Asn Asp Ile	
	50 55 60	
	ccg cag gcc gcg gtg gtc aac acc ctg aac cag acc gtc cag cag ggc	240
	Pro Gln Ala Ala Val Val Asn Thr Leu Asn Gln Thr Val Gln Gln Gly	
20	65 70 75 80	
	acc gtc cag gtc agc gtc atg atc gac aag atc gtg gac atc atg aag	288
	Thr Val Gln Val Ser Val Met Ile Asp Lys Ile Val Asp Ile Met Lys	
	85 90 95	
25		
	aat gtc ctg tcc atc gtg ata gac aac aag aag ttt tgg gat cag gtc	336
	Asn Val Leu Ser Ile Val Ile Asp Asn Lys Lys Phe Trp Asp Gln Val	
	100 105 110	
30		
	acg gct gcc atc acc aac acc ttc acg aac ctg aac agc cag gag tcg	384
	Thr Ala Ala Ile Thr Asn Thr Phe Thr Asn Leu Asn Ser Gln Glu Ser	
	115 120 125	
	gag gcc tgg atc ttc tat tac aag gag gac gcc cac aag acg tcc tac	432
35	Glu Ala Trp Ile Phe Tyr Tyr Lys Glu Asp Ala His Lys Thr Ser Tyr	
	130 135 140	
	tat tac aac atc ctc ttc gcc atc cag gac gaa gag acg ggt ggc gtg	480
	Tyr Tyr Asn Ile Leu Phe Ala Ile Gln Asp Glu Glu Thr Gly Gly Val	
40	145 150 155 160	
	atg gcc acg ctg ccc atc gcc ttc gac atc agt gtg gac atc gag aag	528
	Met Ala Thr Leu Pro Ile Ala Phe Asp Ile Ser Val Asp Ile Glu Lys	
	165 170 175	

gag aag gtc ctg ttc gtg acc atc aag gac act gag aat tac gcc gtc 576
Glu Lys Val Leu Phe Val Thr Ile Lys Asp Thr Glu Asn Tyr Ala Val
180 185 190

5 acc gtc aag gcg atc aac gtg gtc cag gca ctc cag tct agc agg gat 624
Thr Val Lys Ala Ile Asn Val Val Gln Ala Leu Gln Ser Ser Arg Asp
195 200 205

tct aag gtg gtt gat gcg ttc aaa tcg cca cgg cac tta ccc cgg aag 672
10 Ser Lys Val Val Asp Ala Phe Lys Ser Pro Arg His Leu Pro Arg Lys
210 215 220

agg cat aag att tgc tct aac tcg tga tga 702
Arg His Lys Ile Cys Ser Asn Ser
15 225 230

<210> 14
<211> 232
20 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Construcción sintética
25 <400> 14

Met Ala Phe Phe Asn Arg Val Ile Thr Leu Thr Val Pro Ser Ser Asp
1 5 10 15
30

Val Val Asn Tyr Ser Glu Ile Tyr Gln Val Ala Pro Gln Tyr Val Asn
20 25 30

35 Gln Ala Leu Thr Leu Ala Lys Tyr Phe Gln Gly Ala Ile Asp Gly Ser
35 40 45

40 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						
5		85		90		95	
	Asn Val Leu Ser Ile Val Ile Asp Asn Lys Lys Phe Trp Asp Gln Val						
10		100		105		110	
	Thr Ala Ala Ile Thr Asn Thr Phe Thr Asn Leu Asn Ser Gln Glu Ser						
15		115		120		125	
	Glu Ala Trp Ile Phe Tyr Tyr Lys Glu Asp Ala His Lys Thr Ser Tyr						
	130		135		140		
20	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						
25		165		170		175	
	Glu Lys Val Leu Phe Val Thr Ile Lys Asp Thr Glu Asn Tyr Ala Val						
30		180		185		190	
	Thr Val Lys Ala Ile Asn Val Val Gln Ala Leu Gln Ser Ser Arg Asp						
35		195		200		205	
	Ser Lys Val Val Asp Ala Phe Lys Ser Pro Arg His Leu Pro Arg Lys						
	210		215		220		
40	Arg His Lys Ile Cys Ser Asn Ser						
	225		230				

<210> 15

<211> 666
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> secuencia sintética para usar en la expresión de TIC810 en plantas

<220>
10 <221> CDS
<222> (1)..(666)
<223> TIC810

<400> 15

15 atg agc aaa gaa atc agg ctc aac ctt tct cgt gag agc ggc gcc gac 48
Met Ser Lys Glu Ile Arg Leu Asn Leu Ser Arg Glu Ser Gly Ala Asp
1 5 10 15

ctg tac ctc aag atc ctc gcc ttc gtg aag ccc gag cac ttc ttt cag 96
20 Leu Tyr Leu Lys Ile Leu Ala Phe Val Lys Pro Glu His Phe Phe Gln
20 25 30

gcg tac ctc ctg tgc cgc gag ttc gag agc atc gtg gat cct aca acc 144
Ala Tyr Leu Leu Cys Arg Glu Phe Glu Ser Ile Val Asp Pro Thr Thr
25 35 40 45

cgc gag tct gac ttc gac aag acg ctg acc atc gtg aag tcg gac tcc 192
Arg Glu Ser Asp Phe Asp Lys Thr Leu Thr Ile Val Lys Ser Asp Ser
50 55 60

30 acc ctc gtg acc gtg ggc acg atg aac acc aag ctg gtc aat agc caa 240
Thr Leu Val Thr Val Gly Thr Met Asn Thr Lys Leu Val Asn Ser Gln
65 70 75 80

35 gag atc ctc gtg tcg gac ttg atc act caa gtc ggt tcc cag atc gcc 288
Glu Ile Leu Val Ser Asp Leu Ile Thr Gln Val Gly Ser Gln Ile Ala
85 90 95

gat acc ctc ggc atc acg gac atc gac gcc aac acc cag caa cag ctc 336
40 Asp Thr Leu Gly Ile Thr Asp Ile Asp Ala Asn Thr Gln Gln Gln Leu
100 105 110

acg gag ctg atc ggc aac ctc ttc gtg aac ctc aat tcc caa gtt cag 384
Thr Glu Leu Ile Gly Asn Leu Phe Val Asn Leu Asn Ser Gln Val Gln

	115	120	125	
	gag tac atc tac ttc tac gag gag aag gag aag cag acc tcc tac cgc			432
	Glu Tyr Ile Tyr Phe Tyr Glu Glu Lys Glu Lys Gln Thr Ser Tyr Arg			
5	130	135	140	
	tac aac atc ctc ttc gtg ttc gaa aag gag tcg ttc atc acc att ctg			480
	Tyr Asn Ile Leu Phe Val Phe Glu Lys Glu Ser Phe Ile Thr Ile Leu			
	145	150	155	160
10	cca atg ggc ttc gac gtg acc gtg aac acg aac aag gag gcc gtc ctg			528
	Pro Met Gly Phe Asp Val Thr Val Asn Thr Asn Lys Glu Ala Val Leu			
	165	170	175	
15	aag ctg acc ccg aag gac aag gtt acc tac ggc cac gtc agc gtc aag			576
	Lys Leu Thr Pro Lys Asp Lys Val Thr Tyr Gly His Val Ser Val Lys			
	180	185	190	
	gcc ctc aac atc atc cag ctc att acg gag gac aag ttc aac ttc ctc			624
20	Ala Leu Asn Ile Ile Gln Leu Ile Thr Glu Asp Lys Phe Asn Phe Leu			
	195	200	205	
	gca acc ctc aag aag gct ctc aag acc ctg tga tga gaa ttc			666
	Ala Thr Leu Lys Lys Ala Leu Lys Thr Leu Glu Phe			
25	210	215	220	
	<210> 16			
	<211> 218			
30	<212> PRT			
	<213> Secuencia artificial			
	<220>			
	<223> Construcción sintética			
35	<400> 16			
	Met Ser Lys Glu Ile Arg Leu Asn Leu Ser Arg Glu Ser Gly Ala Asp			
	1	5	10	15
40	Leu Tyr Leu Lys Ile Leu Ala Phe Val Lys Pro Glu His Phe Phe Gln			
	20	25	30	

[illegible]

	Ala Thr Leu Lys Lys Ala Leu Lys Thr Leu	
	210	215
5	<210> 17	
	<211> 699	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
10	<220>	
	<223> secuencia sintética para la expresión de ET37 en plantas	
	<220>	
15	<221> CDS	
	<222> (1)..(699)	
	<223> ET37	
	<400> 17	
20	atg ttc ttc aac cgg gtg atc acc ctc acg gtg ccg tcg tca gac gtg	48
	Met Phe Phe Asn Arg Val Ile Thr Leu Thr Val Pro Ser Ser Asp Val	
	1 5 10 15	
	gtc aac tac tcg gag atc tac cag gtg gct cct cag tat gtc aac cag	96
25	Val Asn Tyr Ser Glu Ile Tyr Gln Val Ala Pro Gln Tyr Val Asn Gln	
	20 25 30	
	gcc ctg acc ctg gcc aag tac ttc cag ggc gcc atc gac ggc agc acc	144
	Ala Leu Thr Leu Ala Lys Tyr Phe Gln Gly Ala Ile Asp Gly Ser Thr	
30	35 40 45	
	ctg agg ttc gac ttc gag aag gcg tta cag atc gcc aac gac atc ccg	192
	Leu Arg Phe Asp Phe Glu Lys Ala Leu Gln Ile Ala Asn Asp Ile Pro	
	50 55 60	
35	cag gcc gcg gtg gtc aac acc ctg aac cag acc gtc cag cag ggg acc	240
	Gln Ala Ala Val Val Asn Thr Leu Asn Gln Thr Val Gln Gln Gly Thr	
	65 70 75 80	
40	gtc cag gtc agc gtc atg atc gac aag atc gtg gac atc atg aag aat	288
	Val Gln Val Ser Val Met Ile Asp Lys Ile Val Asp Ile Met Lys Asn	
	85 90 95	
	gtc ctg tcc atc gtg ata gac aac aag aag ttt tgg gat cag gtc acg	336

	<210>	18
	<211>	231
	<212>	PRT
40	<213>	Secuencia artificial
	<220>	
	<223>	Construcción sintética

<400> 18

Met Phe Phe Asn Arg Val Ile Thr Leu Thr Val Pro Ser Ser Asp Val
 1 5 10 15

5

Val Asn Tyr Ser Glu Ile Tyr Gln Val Ala Pro Gln Tyr Val Asn Gln
 20 25 30

10

Ala Leu Thr Leu Ala Lys Tyr Phe Gln Gly Ala Ile Asp Gly Ser Thr
 35 40 45

15

Leu Arg Phe Asp Phe Glu Lys Ala Leu Gln Ile Ala Asn Asp Ile Pro
 50 55 60

20

Gln Ala Ala Val Val Asn Thr Leu Asn Gln Thr Val Gln Gln Gly Thr
 65 70 75 80

25

Val Gln Val Ser Val Met Ile Asp Lys Ile Val Asp Ile Met Lys Asn
 85 90 95

30

Val Leu Ser Ile Val Ile Asp Asn Lys Lys Phe Trp Asp Gln Val Thr
 100 105 110

Ala Ala Ile Thr Asn Thr Phe Thr Asn Leu Asn Ser Gln Glu Ser Glu
 115 120 125

35

Ala Trp Ile Phe Tyr Tyr Lys Glu Asp Ala His Lys Thr Ser Tyr Tyr
 130 135 140

40

Tyr Asn Ile Leu Phe Ala Ile Gln Asp Glu Glu Thr Gly Gly Val Met
 145 150 155 160

Ala Thr Leu Pro Ile Ala Phe Asp Ile Ser Val Asp Ile Glu Lys Glu
 165 170 175

Lys Val Leu Phe Val Thr Ile Lys Asp Thr Glu Asn Tyr Ala Val Thr
180 185 190

5 Val Lys Ala Ile Asn Val Val Gln Ala Leu Gln Ser Ser Arg Asp Ser
195 200 205

Lys Val Val Asp Ala Phe Lys Ser Pro Arg His Leu Pro Arg Lys Arg
10 210 215 220

His Thr Ile Cys Ser Asn Ser
225 230

15

<210> 19
<211> 657
<212> ADN
20 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia sintética para la expresión de TIC812 en plantas

25

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(657)
<223> TIC812

30

<400> 19
atg agc aaa gaa atc agg ctc aac ctt tct cgt gag agc ggc gcc gac 48
Met Ser Lys Glu Ile Arg Leu Asn Leu Ser Arg Glu Ser Gly Ala Asp
1 5 10 15

35

ctg tac ctc aag atc ctc gcc ttc gtg aag ccc gag cac ttc ttt cag 96
Leu Tyr Leu Lys Ile Leu Ala Phe Val Lys Pro Glu His Phe Phe Gln
20 25 30

40

gcg tac ctc ctg tgc cgc gag ttc gag agc atc gtg gat cct aca acc 144
Ala Tyr Leu Leu Cys Arg Glu Phe Glu Ser Ile Val Asp Pro Thr Thr
35 40 45

cgc gag ctg gac ttc gac aag acg ctg acc atc gtg aag tcg gac tcc 192

	Arg	Glu	Leu	Asp	Phe	Asp	Lys	Thr	Leu	Thr	Ile	Val	Lys	Ser	Asp	Ser		
	50						55					60						
	acc	ctc	gtg	acc	gtg	ggc	acg	atg	aac	acc	aag	ctg	gtc	aat	agc	caa	240	
5	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Gly	Thr	Met	Asn	Thr	Lys	Leu	Val	Asn	Ser	Gln		
	65					70					75					80		
	gag	atc	ctc	gtg	tcg	gac	ttg	atc	aag	caa	gtc	ggt	tcg	cag	atc	gcc	288	
	Glu	Ile	Leu	Val	Ser	Asp	Leu	Ile	Lys	Gln	Val	Gly	Ser	Gln	Ile	Ala		
10					85					90					95			
	gat	acc	ctc	ggc	atc	acg	gac	atc	gac	gcc	aac	acc	cag	caa	agg	ctc	336	
	Asp	Thr	Leu	Gly	Ile	Thr	Asp	Ile	Asp	Ala	Asn	Thr	Gln	Gln	Arg	Leu		
				100					105					110				
15																		
	acg	gag	ctg	atc	gag	aac	ctc	ttc	gtg	aac	ctc	aat	tcg	caa	gtt	cag	384	
	Thr	Glu	Leu	Ile	Glu	Asn	Leu	Phe	Val	Asn	Leu	Asn	Ser	Gln	Val	Gln		
		115						120					125					
20																		
	gac	tac	atc	tac	ttc	tac	gag	gag	aag	gag	aag	cag	acc	tcg	tac	cgc	432	
	Asp	Tyr	Ile	Tyr	Phe	Tyr	Glu	Glu	Lys	Glu	Lys	Gln	Thr	Ser	Tyr	Arg		
		130					135					140						
	tac	aac	atc	ctc	ttc	gtg	ttc	gaa	aag	gag	tcg	ttc	atc	acc	att	ctg	480	
25	Tyr	Asn	Ile	Leu	Phe	Val	Phe	Glu	Lys	Glu	Ser	Phe	Ile	Thr	Ile	Leu		
	145					150					155					160		
	cca	atg	ggc	ttc	gac	gtg	acc	gtg	aac	acg	aac	aag	gag	gcc	gtc	ctg	528	
	Pro	Met	Gly	Phe	Asp	Val	Thr	Val	Asn	Thr	Asn	Lys	Glu	Ala	Val	Leu		
30					165					170					175			
	aag	ctg	acc	ccg	aag	gac	aag	gtt	acc	tac	ggc	cac	gtc	agc	gtc	aag	576	
	Lys	Leu	Thr	Pro	Lys	Asp	Lys	Val	Thr	Tyr	Gly	His	Val	Ser	Val	Lys		
				180					185				190					
35																		
	gcc	ctc	aac	atc	atc	cag	ttc	att	acg	gag	gac	aag	ctc	aac	ttc	ctc	624	
	Ala	Leu	Asn	Ile	Ile	Gln	Phe	Ile	Thr	Glu	Asp	Lys	Leu	Asn	Phe	Leu		
		195						200					205					
40																		
	gca	acc	ctc	aag	aag	gct	ctc	aag	acc	ctg	tga						657	
	Ala	Thr	Leu															

<210> 20
<211> 218
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
5
<220>
<223> Construcción sintética

<400> 20
10
Met Ser Lys Glu Ile Arg Leu Asn Leu Ser Arg Glu Ser Gly Ala Asp
1 5 10 15

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
20 35 40 45

Arg Glu Leu Asp Phe Asp Lys Thr Leu Thr Ile Val Lys Ser Asp Ser
50 55 60
25

Thr Leu Val Thr Val Gly Thr Met Asn Thr Lys Leu Val Asn Ser Gln
65 70 75 80

30
Glu Ile Leu Val Ser Asp Leu Ile Lys Gln Val Gly Ser Gln Ile Ala
85 90 95

35 Asp Thr Leu Gly Ile Thr Asp Ile Asp Ala Asn Thr Gln Gln Arg Leu
100 105 110

Thr Glu Leu Ile Glu Asn Leu Phe Val Asn Leu Asn Ser Gln Val Gln
40 115 120 125

Asp Tyr Ile Tyr Phe Tyr Glu Glu Lys Glu Lys Gln Thr Ser Tyr Arg
130 135 140

<220>

<223> secuencia sintética; cebador de amplificación térmica

<220>

5 <221> característica_misc
<222> (1)..(21)
<223> cebador de amplificación térmica; pr371

<400> 22

10 cagtaccatc ttcagatgtg g 21

<210> 23
<211> 49

15 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia sintética; cebador de amplificación térmica

20

<220>

<221> característica_misc
<222> (1)..(49)

25 <223> cebador de amplificación térmica; pr375

<400> 23

gactagtaat gagtaaagaa attcgtttaa atttgagtag agaatcagg 49

30

<210> 24
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> secuencia sintética; cebador de amplificación térmica

40 <220>

<221> característica_misc
<222> (1)..(30)
<223> cebador de amplificación térmica; pr376

<400> 24
aactcgagcc tacttaaccc gcttatagag 30

5 <210> 25
<211> 35
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> secuencia sintética; cebador de amplificación térmica

<220>
15 <221> característica_misc
<222> (1)..(35)
<223> cebador de amplificación térmica; pr365

<400> 25
20 aactcgagtc catttagtgc ttccccataa cagcc 35

<210> 26
<211> 43
25 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
30 <223> secuencia sintética; cebador de amplificación térmica

<220>
<221> característica_misc
<222> (1)..(43)
35 <223> cebador de amplificación térmica; pr372

<400> 26
aacctaggat gttctttaat cgogttatta cattaacagt acc 43

40 <210> 27
<211> 49
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia sintética; cebador de amplificación térmica

5 <220>
<221> característica_misc
<222> (1)..(49)
<223> cebador de amplificación térmica; pr421

10 <400> 27
gcctaggtat gagtaaagaa attcgttttaa atttgagtag agaatcagg 49

<210> 28
15 <211> 4257
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
20 <223> secuencia sintética; cassettes de expresión pMON64138 que
codifican TIC89 y TIC810

<220>
25 <221> característica_misc
<223> primer y segundo cassette de expresión en plantas pMON64138

<220>
<221> promotor
30 <222> (1)..(614)
<223> e35S

<220>
<221> 5'UTR
35 <222> (650)..(710)
<223> Directriz CAB de trigo

<220>
<221> Intrón
40 <222> (727)..(1206)
<223> actina de arroz

<220>
<221> CDS

```

<222> (1216)..(1917)
<223> TIC809

<220>
5 <221> terminador
  <222> (1921)..(2130)
  <223> Hsp17 de trigo

<220>
10 <221> promotor
   <222> (2168)..(2781)
   <223> CaMV 35S enh

<220>
15 <221> 5'UTR
   <222> (2817)..(2877)
   <223> Directriz CAB de trigo

<220>
20 <221> Intrón
   <222> (2894)..(3373)
   <223> actina de arroz

<220>
25 <221> CDS
   <222> (3383)..(4042)
   <223> TIC810

<220>
30 <221> terminador
   <222> (4048)..(4257)
   <223> Hsp17 de trigo

<400> 28
35 ggtccgatgt gagacttttc aacaaagggt aatatccgga aacctcctcg gattccattg      60

   cccagctatc tgtcacttta ttgtgaagat agtggaaaag gaaggtggct cctacaaatg      120

   ccatcattgc gataaaggaa aggccatcgt tgaagatgcc tctgccgaca gtgggtcccaa      180
40 agatggaccc ccaccacga ggagcatcgt ggaaaaagaa gacgttccaa ccacgtcttc      240

   aaagcaagtg gattgatgtg atggtccgat gtgagacttt tcaacaaagg gtaatatccg      300

```

gaaacctcct cggattccat tgcccagcta tctgtcactt tattgtgaag atagtggaaa . 360
 aggaaggtgg ctctacaaa tgccatcatt gcgataaagg aaaggccatc gttgaagatg 420
 5 cctctgccga cagtgggtccc aaagatggac cccacccac gaggagcatc gtggaaaaag 480
 aagacgttcc aaccacgtct tcaaagcaag tggattgatg tgatatctcc actgacgtaa 540
 gggatgacgc acaatcccac tatecttcgc aagacccttc ctctatataa ggaagttcat 600
 10 ttcatttggg gaggacacgc tgacaagctg actctagcag atcctctaga accatcttcc 660
 acacactcaa gccacactat tggagaacac acagggacaa cacaccataa gatccaaggg 720
 15 aggcctccgc cgccgccggt aaccaccccg cccctctcct ctttctttct ccgttttttt 780
 ttccgtctcg gtctcgatct ttggccttgg tagtttgggt gggcgagagg cggcttcgtg 840
 cgcgcccaga tcggtgcgcg ggaggggagc gatctcgcgc ctggggctct cgccggcgtg 900
 20 gatccggccc ggatctcgcg gggaatgggg ctctcggatg tagatctgcg atccgccgtt 960
 gttgggggag atgatggggg gtttaaaatt tccgccgtgc taaacaagat caggaagagg 1020
 25 ggaaaagggc actatggttt atatttttat atatttctgc tgcttcgtca ggcttagatg 1080
 tgctagatct ttctttcttc ttttctggg tagaatttga atccctcagc attgttcac 1140
 ggtagttttt cttttcatga tttgtgacaa atgcagcctc gtgcggagct ttttctagg 1200
 30 tagaagtgat caacc atg gcc ttc ttc aac cgg gtg atc acc ctc acg gtg 1251
 Met Ala Phe Phe Asn Arg Val Ile Thr Leu Thr Val.
 1 5 10
 35 ccg tcg tca gac gtg gtc aac tac tcg gag atc tac cag gtg gct cct 1299
 Pro Ser Ser Asp Val Val Asn Tyr Ser Glu Ile Tyr Gln Val Ala Pro
 15 20 25
 cag tat gtc aac cag gcc ctg acc ctg gcc aag tac ttc cag gcc gcc 1347
 40 Gln Tyr Val Asn Gln Ala Leu Thr Leu Ala Lys Tyr Phe Gln Gly Ala
 30 35 40
 atc gac gcc agc acc ctg agg ttc gac ttc gag aag gcg tta cag atc 1395
 Ile Asp Gly Ser Thr Leu Arg Phe Asp Phe Glu Lys Ala Leu Gln Ile

	45	50	55	60	
	gcc aac gac atc ccg cag gcc gcg gtg gtc aac acc ctg aac cag acc				1443
	Ala Asn Asp Ile Pro Gln Ala Ala Val Val Asn Thr Leu Asn Gln Thr				
5		65	70	75	
	gtc cag cag ggg acc gtc cag gtc agc gtc atg atc gac aag atc gtg				1491
	Val Gln Gln Gly Thr Val Gln Val Ser Val Met Ile Asp Lys Ile Val				
		80	85	90	
10	gac atc atg aag aat gtc ctg tcc atc gtg ata gac aac aag aag ttt				1539
	Asp Ile Met Lys Asn Val Leu Ser Ile Val Ile Asp Asn Lys Lys Phe				
		95	100	105	
15	tgg gat cag gtc acg gct gcc atc acc aac acc ttc acg aac ctg aac				1587
	Trp Asp Gln Val Thr Ala Ala Ile Thr Asn Thr Phe Thr Asn Leu Asn				
		110	115	120	
	agc cag gag tcg gag gcc tgg atc ttc tat tac aag gag gac gcc cac				1635
20	Ser Gln Glu Ser Glu Ala Trp Ile Phe Tyr Tyr Lys Glu Asp Ala His				
		125	130	135	140
	aag acg tcc tac tat tac aac atc ctc ttc gcc atc cag gac gaa gag				1683
	Lys Thr Ser Tyr Tyr Tyr Asn Ile Leu Phe Ala Ile Gln Asp Glu Glu				
25		145	150	155	
	acg ggt ggc gtg atg gcc acg ctg ccc atc gcc ttc gac atc agt gtg				1731
	Thr Gly Gly Val Met Ala Thr Leu Pro Ile Ala Phe Asp Ile Ser Val				
		160	165	170	
30	gac atc gag aag gag aag gtc ctg ttc gtg acc atc aag gac act gag				1779
	Asp Ile Glu Lys Glu Lys Val Leu Phe Val Thr Ile Lys Asp Thr Glu				
		175	180	185	
35	aat tac gcc gtc acc gtc aag gcg atc aac gtg gtc cag gca ctc cag				1827
	Asn Tyr Ala Val Thr Val Lys Ala Ile Asn Val Val Gln Ala Leu Gln				
		190	195	200	
	tct agc agg gat tct aag gtg gtt gat gcg ttc aaa tcg cca cgg cac				1875
40	Ser Ser Arg Asp Ser Lys Val Val Asp Ala Phe Lys Ser Pro Arg His				
		205	210	215	220
	tta ccc cgg aag agg cat aag att tgc tct aac tcg tga tga				1917
	Leu Pro Arg Lys Arg His Lys Ile Cys Ser Asn Ser				

	225	230	
	attctgcatg cgtttgacg tatgctcatt caggttggag ccaatttggt tgatgtgtgt	1977	
5	gcgagttctt gcgagtctga tgagacatct ctgtattgtg tttctttccc cagtgttttc	2037	
	tgtacttgtg taatcggcta atcgccaaca gattcggcga tgaataaatg agaaataaat	2097	
	tgttctgatt ttgagtgcaa aaaaaagga attagatctg tgtgtgtttt ttggatcccc	2157	
10	agcttctgca ggtccgatgt gagacttttc aacaaaggt aatatccgga aacctcctcg	2217	
	gattccattg cccagctatc tgtcacttta ttgtgaagat agtggaagga gaaggtggct	2277	
15	cctacaaatg ccatcattgc gataaaggaa aggccatcgt tgaagatgcc tctgccgaca	2337	
	gtggtcccaa agatggaccc ccaccacga ggagcatcgt ggaaaaagaa gacgttccaa	2397	
	ccacgtcttc aaagcaagtg gattgatgtg atggtccgat gtgagacttt tcaacaaagg	2457	
20	gtaatatccg gaaacctcct cggattccat tgcccagcta tctgtcactt tattgtgaag	2517	
	atagtggaaa aggaaggtgg ctctacaaa tgccatcatt gcgataaagg aaaggccatc	2577	
25	gttgaagatg cctctgccga cagtgggtccc aaagatggac cccacccac gaggagcatc	2637	
	gtggaaaaag aagacgttcc aaccacgtct tcaaagcaag tggattgatg tgatatctcc	2697	
	actgacgtaa gggatgacgc acaatcccac tatccttcgc aagacccttc ctctatataa	2757	
30	ggaagttcat ttcatttggg gaggacacgc tgacaagctg actctagcag atcctctaga	2817	
	accatcttcc acacactcaa gccacactat tggagaacac acagggacaa cacaccataa	2877	
35	gatccaaggg aggcctccgc cgccgccggt aaccaccccg cccctctcct ctttctttct	2937	
	ccgttttttt ttccgtctcg gtctcgatct ttggccttgg tagtttgggt gggcgagagg	2997	
	cggcttcgtg cgcgccaga tcggtgcgcg ggaggggcgg gatctcgcgg ctggggctct	3057	
40	cgccggcgtg gatccggccc ggatctcgcg gggaatgggg ctctcggatg tagatctgcg	3117	
	atccgccgtt gttgggggag atgatggggg gtttaaaatt tccgccgtgc taaacaagat	3177	

	caggaagagg ggaaaagggc actatggttt atatatttat atatttctgc tgcttcgtca	3237
	ggcttagatg tgctagatct ttctttcttc tttttgtggg tagaatttga atccctcagc	3297
5	attgttcacg ggtagttttt cttttcatga tttgtgacaa atgcagcctc gtgcggagct	3357
	tttttgtagg tagaagtgat caacc atg agc aaa gaa atc agg ctc aac ctt	3409
	Met Ser Lys Glu Ile Arg Leu Asn Leu	
	235 240	
10	tct cgt gag agc ggc gcc gac ctg tac ctc aag atc ctc gcc ttc gtg	3457
	Ser Arg Glu Ser Gly Ala Asp Leu Tyr Leu Lys Ile Leu Ala Phe Val	
	245 250 255	
15	aag ccc gag cac ttc ttt cag gcg tac ctc ctg tgc cgc gag ttc gag	3505
	Lys Pro Glu His Phe Phe Gln Ala Tyr Leu Leu Cys Arg Glu Phe Glu	
	260 265 270	
	agc atc gtg gat cct aca acc cgc gag tct gac ttc gac aag acg ctg	3553
20	Ser Ile Val Asp Pro Thr Thr Arg Glu Ser Asp Phe Asp Lys Thr Leu	
	275 280 285	
	acc atc gtg aag tcg gac tcc acc ctc gtg acc gtg ggc acg atg aac	3601
	Thr Ile Val Lys Ser Asp Ser Thr Leu Val Thr Val Gly Thr Met Asn	
25	290 295 300 305	
	acc aag ctg gtc aat agc caa gag atc ctc gtg tcg gac ttg atc act	3649
	Thr Lys Leu Val Asn Ser Gln Glu Ile Leu Val Ser Asp Leu Ile Thr	
	310 315 320	
30	caa gtc ggt tcc cag atc gcc gat acc ctc ggc atc acg gac atc gac	3697
	Gln Val Gly Ser Gln Ile Ala Asp Thr Leu Gly Ile Thr Asp Ile Asp	
	325 330 335	
35	gcc aac acc cag caa cag ctc acg gag ctg atc ggc aac ctc ttc gtg	3745
	Ala Asn Thr Gln Gln Gln Leu Thr Glu Leu Ile Gly Asn Leu Phe Val	
	340 345 350	
	aac ctc aat tcc caa gtt cag gag tac atc tac ttc tac gag gag aag	3793
40	Asn Leu Asn Ser Gln Val Gln Glu Tyr Ile Tyr Phe Tyr Glu Glu Lys	
	355 360 365	
	gag aag cag acc tcc tac cgc tac aac atc ctc ttc gtg ttc gaa aag	3841
	Glu Lys Gln Thr Ser Tyr Arg Tyr Asn Ile Leu Phe Val Phe Glu Lys	

	370	375	380	385	
	gag tcg ttc atc acc att ctg cca atg ggc ttc gac gtg acc gtg aac				3889
	Glu Ser Phe Ile Thr Ile Leu Pro Met Gly Phe Asp Val Thr Val Asn				
5		390	395	400	
	acg aac aag gag gcc gtc ctg aag ctg acc ccg aag gac aag gtt acc				3937
	Thr Asn Lys Glu Ala Val Leu Lys Leu Thr Pro Lys Asp Lys Val Thr				
		405	410	415	
10	tac ggc cac gtc agc gtc aag gcc ctc aac atc atc cag ctc att acg				3985
	Tyr Gly His Val Ser Val Lys Ala Leu Asn Ile Ile Gln Leu Ile Thr				
		420	425	430	
15	gag gac aag ttc aac ttc ctc gca acc ctc aag aag gct ctc aag acc				4033
	Glu Asp Lys Phe Asn Phe Leu Ala Thr Leu Lys Lys Ala Leu Lys Thr				
		435	440	445	
	ctg tga tga gaattctgca tgcgtttgga cgtatgctca ttcaggttgg				4082
20	Leu				
		450			
	agccaatttg gttgatgtgt gtgcgagttc ttgcgagtct gatgagacat ctctgtattg				4142
25	tgtttctttc ccagtggtt tctgtacttg tgtaatcggc taatcgccaa cagattcggc				4202
	gatgaataaaa tgagaaataa attgttctga ttttgagtgc aaaaaaaaaag gaatt				4257
30	<210> 29				
	<211> 232				
	<212> PRT				
	<213> Secuencia artificial				
35	<220>				
	<223> Construcción sintética				
	<400> 29				
40	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		
5	35	40	45
	Thr Leu Arg Phe Asp Phe Glu Lys Ala Leu Gln Ile Ala Asn Asp Ile		
10	50	55	60
	Pro Gln Ala Ala Val Val Asn Thr Leu Asn Gln Thr Val Gln Gln Gly		
15	65	70	75 80
	Thr Val Gln Val Ser Val Met Ile Asp Lys Ile Val Asp Ile Met Lys		
	85	90	95
20	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		
25	115	120	125
	Glu Ala Trp Ile Phe Tyr Tyr Lys Glu Asp Ala His Lys Thr Ser Tyr		
30	130	135	140
	Tyr Tyr Asn Ile Leu Phe Ala Ile Gln Asp Glu Glu Thr Gly Gly Val		
	145	150	155 160
35	Met Ala Thr Leu Pro Ile Ala Phe Asp Ile Ser Val Asp Ile Glu Lys		
	165	170	175
40	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		
5	210	215	220
	Arg His Lys Ile Cys Ser Asn Ser		
10	225	230	
	<210> 30		
	<211> 218		
	<212> PRT		
15	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Construcción sintética		
20	<400> 30		
	Met Ser Lys Glu Ile Arg Leu Asn Leu Ser Arg Glu Ser Gly Ala Asp		
	1	5	10 15
25	Leu Tyr Leu Lys Ile Leu Ala Phe Val Lys Pro Glu His Phe Phe Gln		
	20	25	30
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		
35	50	55	60
	Thr Leu Val Thr Val Gly Thr Met Asn Thr Lys Leu Val Asn Ser Gln		
	65	70	75 80
40	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

5 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
10 130 135 140

Tyr Asn Ile Leu Phe Val Phe Glu Lys Glu Ser Phe Ile Thr Ile Leu
145 150 155 160
15

Pro Met Gly Phe Asp Val Thr Val Asn Thr Asn Lys Glu Ala Val Leu
165 170 175

20 Lys Leu Thr Pro Lys Asp Lys Val Thr Tyr Gly His Val Ser Val Lys
180 185 190

25 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
30 210 215

<210> 31
<211> 5079
35 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia sintética; cassettes de expresión que codifican TIC809
40 and
TIC810 in pMON64139

<220>

<221> característica_misc
<223> pMON64139

<220>
5 <221> promotor
<222> (1)..(614)
<223> e35S

<220>
10 <221> 5'UTR
<222> (650)..(710)
<223> Directriz CAB de trigo

<220>
15 <221> Intrón
<222> (727)..(1206)
<223> actina de arroz (Exón 727-738; intrón 739-1199; Exón 1200-1206)

<220>
20 <221> péptido_de_tránsito
<222> (1230)..(1370)
<223> Señal SSU de maíz

<220>
25 <221> Intrón
<222> (1231)..(1539)
<223> Zm RbcS

<220>
30 <221> péptido_de_tránsito
<222> (1540)..(1626)
<223> Zm RbcS

<220>
35 <221> CDS
<222> (1627)..(2328)
<223> TIC809

<220>
40 <221> terminador
<222> (2332)..(2541)
<223> Hsp17 de trigo

<220>

<221> promotor
<222> (2579)..(3192)
<223> CaMV 35S enh

5 <220>
<221> 5'UTR
<222> (3228)..(3288)
<223> Directriz CAB de trigo

10 <220>
<221> Intrón
<222> (3305)..(3784)
<223> Actina de arroz (Exón 3305-3316; intrón 3317-3777; Exón 3778-3784)

15 <220>
<221> péptido_de_tránsito
<222> (3808)..(3948)
<223> Señal SSU de maíz

20 <220>
<221> Intrón
<222> (3949)..(4117)
<223> Zm RbcS

25 <220>
<221> péptido_de_tránsito
<222> (4118)..(4204)
<223> Zm RbcS

30 <220>
<221> CDS
<222> (4205)..(4864)
<223> TIC810

35 <220>
<221> terminador
<222> (4870)..(5079)
<223> Hspl7 de trigo

40 <400> 31
gggtccgatgt gagacttttc aacaaagggt aatatccgga aacctcctcg gattccattg 60

cccagctatc tgtcacttta ttgtgaagat agtggaaaag gaaggtggct cctacaaatg 120

	ccatcattgc gataaaggaa aggccatcgt tgaagatgcc tctgccgaca gtggtcccaa	180
	agatggaccc ccacccacga ggagcatcgt ggaaaaagaa gacgttccaa ccacgtcttc	240
5	aaagcaagtg gattgatgtg atgggtccgat gtgagacttt tcaacaaagg gtaatatccg	300
	gaaacctcct cggattccat tgcccagcta tctgtcactt tattgtgaag atagtggaaa	360
	aggaaggtgg ctctacaaa tgccatcatt gcgataaagg aaaggccatc gttgaagatg	420
10	cctctgccga cagtgggtccc aaagatggac cccacccac gaggagcatc gtggaaaaag	480
	aagacgttcc aaccacgtct tcaaagcaag tggattgatg tgatatctcc actgacgtaa	540
15	gggatgaagc acaatcccac tatecttcgc aagacccttc ctctatataa ggaagttcat	600
	ttcatttgga gaggacacgc tgacaagctg actctagcag atcctctaga accatcttcc	660
	acacactcaa gccacactat tggagaacac acagggacaa cacaccataa gatccaaggg	720
20	aggcctccgc cgccgcgggt aaccaccccg cccctctcct ctttctttct ccgttttttt	780
	ttccgtctcg gtctcgatct ttggccttgg tagtttgggt gggcgagagg cggcttcgtg	840
25	cgcgcccaga tcggtgcgcg ggaggggcg gatctcgcg ctggggctct cgccggcggtg	900
	gatccggccc ggatctcgcg gggaatgggg ctctcggatg tagatctgcg atccgccgtt	960
	gttgggggag atgatggggg gtttaaaatt tccgccgtgc taaacaagat caggaagagg	1020
30	ggaaaagggc actatggttt atatttttat atatttctgc tgcttcgtca ggcttagatg	1080
	tgotagatct ttctttcttc tttttgtgg tagaatttga atccctcagc attgttcac	1140
35	ggtagttttt cttttcatga tttgtgacaa atgcagcctc gtgcggagct tttttgtagg	1200
	tagaagtgat caacctctag aggatcagca tggcgccac cgtgatgatg gcctcgtcgg	1260
	ccaccgcgt cgctccgttc ctggggctca agtccaccgc cagcctcccc gtcgcccgc	1320
40	gctctccag aagcctcggc aacgtcagca acggcggaag gatccggtgc atgcaggtaa	1380
	caaatgcac ctagctagta gttctttgca ttgcagcagc tgcagctagc gagttagtaa	1440

taggaaggga actgatgac catgcatgga ctgatgtgtg ttgcccaccc catcccaccc 1500
 catttcccaa acgaaccgaa aacaccgtac tacgtgcagg tgtggcccta cggcaacaag 1560
 5 aagttcgaga cgctgtcgta cctgccgccg ctgtcgaccg gcgggcgcat ccgctgcatg 1620
 caggcc atg gcc ttc ttc aac cgg gtg atc acc ctc acg gtg ccg tcg 1668
 Met Ala Phe Phe Asn Arg Val Ile Thr Leu Thr Val Pro Ser
 1 5 10
 10 tca gac gtg gtc aac tac tcg gag atc tac cag gtg gct cct cag tat 1716
 Ser Asp Val Val Asn Tyr Ser Glu Ile Tyr Gln Val Ala Pro Gln Tyr
 15 20 25 30
 15 gtc aac cag gcc ctg acc ctg gcc aag tac ttc cag ggc gcc atc gac 1764
 Val Asn Gln Ala Leu Thr Leu Ala Lys Tyr Phe Gln Gly Ala Ile Asp
 35 40 45
 ggc agc acc ctg agg ttc gac ttc gag aag gcg tta cag atc gcc aac 1812
 20 Gly Ser Thr Leu Arg Phe Asp Phe Glu Lys Ala Leu Gln Ile Ala Asn
 50 55 60
 gac atc ccg cag gcc gcg gtg gtc aac acc ctg aac cag acc gtc cag 1860
 Asp Ile Pro Gln Ala Ala Val Val Asn Thr Leu Asn Gln Thr Val Gln
 25 65 70 75
 cag ggg acc gtc cag gtc agc gtc atg atc gac aag atc gtg gac atc 1908
 Gln Gly Thr Val Gln Val Ser Val Met Ile Asp Lys Ile Val Asp Ile
 80 85 90
 30 atg aag aat gtc ctg tcc atc gtg ata gac aac aag aag ttt tgg gat 1956
 Met Lys Asn Val Leu Ser Ile Val Ile Asp Asn Lys Lys Phe Trp Asp
 95 100 105 110
 35 cag gtc acg gct gcc atc acc aac acc ttc acg aac ctg aac agc cag 2004
 Gln Val Thr Ala Ala Ile Thr Asn Thr Phe Thr Asn Leu Asn Ser Gln
 115 120 125
 gag tcg gag gcc tgg atc ttc tat tac aag gag gac gcc cac aag acg 2052
 40 Glu Ser Glu Ala Trp Ile Phe Tyr Tyr Lys Glu Asp Ala His Lys Thr
 130 135 140
 tcc tac tat tac aac atc ctc ttc gcc atc cag gac gaa gag acg ggt 2100
 Ser Tyr Tyr Tyr Asn Ile Leu Phe Ala Ile Gln Asp Glu Glu Thr Gly

	145	150	155	
	ggc gtg atg gcc acg ctg ccc atc gcc ttc gac atc agt gtg gac atc			2148
	Gly Val Met Ala Thr Leu Pro Ile Ala Phe Asp Ile Ser Val Asp Ile			
5	160	165	170	
	gag aag gag aag gtc ctg ttc gtg acc atc aag gac act gag aat tac			2196
	Glu Lys Glu Lys Val Leu Phe Val Thr Ile Lys Asp Thr Glu Asn Tyr			
	175	180	185	190
10				
	gcc gtc acc gtc aag gcg atc aac gtg gtc cag gca ctc cag tct agc			2244
	Ala Val Thr Val Lys Ala Ile Asn Val Val Gln Ala Leu Gln Ser Ser			
	195	200	205	
15				
	agg gat tct aag gtg gtt gat gcg ttc aaa tcg cca cgg cac tta ccc			2292
	Arg Asp Ser Lys Val Val Asp Ala Phe Lys Ser Pro Arg His Leu Pro			
	210	215	220	
	cgg aag agg cat aag att tgc tct aac tcg tga tga attctgcatg			2338
20	Arg Lys Arg His Lys Ile Cys Ser Asn Ser			
	225	230		
	cgtttggacg tatgtctcatt caggttggag ccaatttggg tgaatgtgtgt gcgagttctt			2398
25				
	gcgagttctga tgagacatct ctgtattgtg tttctttccc cagtgttttc tgtacttgtg			2458
	taatcggcta atcgccaaca gattcggcga tgaataaatg agaaataaat tgttctgatt			2518
	ttgagtgcaa aaaaaaagga attagatctg tgttgttttt ttggatcccc agcttctgca			2578
30				
	ggtccgatgt gagacttttc aacaaagggt aatatccgga aacctcctcg gattccattg			2638
	cccagctatc tgtcacttta ttgtgaagat agtggaaaag gaaggtggct cctacaaatg			2698
35				
	ccatcattgc gataaaggaa aggccatcgt tgaagatgcc tctgccgaca gtggtcccaa			2758
	agatggaccc ccacccacga ggagcatcgt ggaaaaagaa gacgttccaa ccacgtcttc			2818
	aaagcaagtg gattgatgtg atggtccgat gtgagacttt tcaacaaagg gtaatatccg			2878
40				
	gaaacctcct cggattccat tgcccagcta tctgtcactt tattgtgaag atagtggaaa			2938
	aggaaggtgg ctctacaaa tgccatcatt gcgataaagg aaaggccatc gttgaagatg			2998

	cctctgccga cagtgggtccc aaagatggac cccacccac gaggagcatc gtggaaaaag	3058
	aagacgttcc aaccacgtct tcaaagcaag tggattgatg tgatatctcc actgacgtaa	3118
5	gggatgacgc acaatcccac tatecttcgc aagacccttc ctctatataa ggaagtcat	3178
	ttcatttgga gaggacacgc tgacaagctg actctagcag atcctctaga accatcttcc	3238
	acacactcaa gccacactat tggagaacac acagggacaa cacaccataa gatccaaggg	3298
10	aggcctccgc cgccgcgggt aaccaccccg cccctctcct ctttctttct ccgttttttt	3358
	ttccgtctcg gtctcgatct ttggccttgg tagtttggtt gggcgagagg cggcttcgtg	3418
15	cgcgcccaga tcggtgcgcg ggaggggcgg gatctcgcgg ctggggctct cgccggcgtg	3478
	gatccggccc ggatctcgcg gggaatgggg ctctcggatg tagatctgcg atccgccgtt	3538
	gttgggggag atgatggggg gtttaaaatt tccgccgtgc taaacaagat caggaagagg	3598
20	ggaaaagggc actatggttt atatttttat atatttctgc tgcttcgtca ggcttagatg	3658
	tgctagatct ttctttcttc tttttgtggg tagaatttga atccctcagc attgttcac	3718
25	ggtagttttt cttttcatga tttgtgacaa atgcagcctc gtgcggagct tttttgtagg	3778
	tagaagtgat caacctctag aggatcagca tggcgccac cgtgatgatg gcctcgtcgg	3838
	ccaccgccgt cgctccgttc ctggggctca agtccaccgc cagcctcccc gtcgcccgc	3898
30	gctcctccag aagcctcggc aacgtcagca acggcggaag gatccggtgc atgcaggtaa	3958
	caaatgcac ctagctagta gttctttgca ttgcagcagc tgcagctagc gagttagtaa	4018
35	taggaagggg actgatgatc catgcatgga ctgatgtgtg ttgcccatcc catcccatcc	4078
	catttcccaa acgaaccgaa aacaccgtac tacgtgcagg tgtggcccta cggcaacaag	4138
	aagttcgaga cgctgtcgta cctgccgcg ctgtcgaccg gcgggcgcat ccgctgcatg	4198
40	caggcc atg agc aaa gaa atc agg ctc aac ctt tct cgt gag agc ggc	4246
	Met Ser Lys Glu Ile Arg Leu Asn Leu Ser Arg Glu Ser Gly	
	235 240 245	

	gcc gac ctg tac ctc aag atc ctc gcc ttc gtg aag ccc gag cac ttc	4294
	Ala Asp Leu Tyr Leu Lys Ile Leu Ala Phe Val Lys Pro Glu His Phe	
	250 255 260	
5	ttt cag gcg tac ctc ctg tgc cgc gag ttc gag agc atc gtg gat cct	4342
	Phe Gln Ala Tyr Leu Leu Cys Arg Glu Phe Glu Ser Ile Val Asp Pro	
	265 270 275	
	aca acc cgc gag tct gac ttc gac aag acg ctg acc atc gtg aag tcg	4390
10	Thr Thr Arg Glu Ser Asp Phe Asp Lys Thr Leu Thr Ile Val Lys Ser	
	280 285 290	
	gac tcc acc ctc gtg acc gtg ggc acg atg aac acc aag ctg gtc aat	4438
	Asp Ser Thr Leu Val Thr Val Gly Thr Met Asn Thr Lys Leu Val Asn	
15	295 300 305 310	
	agc caa gag atc ctc gtg tcg gac ttg atc act caa gtc ggt tcc cag	4486
	Ser Gln Glu Ile Leu Val Ser Asp Leu Ile Thr Gln Val Gly Ser Gln	
	315 320 325	
20	atc gcc gat acc ctc ggc atc acg gac atc gac gcc aac acc cag caa	4534
	Ile Ala Asp Thr Leu Gly Ile Thr Asp Ile Asp Ala Asn Thr Gln Gln	
	330 335 340	
25	cag ctc acg gag ctg atc ggc aac ctc ttc gtg aac ctc aat tcc caa	4582
	Gln Leu Thr Glu Leu Ile Gly Asn Leu Phe Val Asn Leu Asn Ser Gln	
	345 350 355	
	gtt cag gag tac atc tac ttc tac gag gag aag gag aag cag acc tcc	4630
30	Val Gln Glu Tyr Ile Tyr Phe Tyr Glu Glu Lys Glu Lys Gln Thr Ser	
	360 365 370	
	tac cgc tac aac atc ctc ttc gtg ttc gaa aag gag tcg ttc atc acc	4678
	Tyr Arg Tyr Asn Ile Leu Phe Val Phe Glu Lys Glu Ser Phe Ile Thr	
35	375 380 385 390	
	att ctg cca atg ggc ttc gac gtg acc gtg aac acg aac aag gag gcc	4726
	Ile Leu Pro Met Gly Phe Asp Val Thr Val Asn Thr Asn Lys Glu Ala	
	395 400 405	
40	gtc ctg aag ctg acc ccg aag gac aag gtt acc tac ggc cac gtc agc	4774
	Val Leu Lys Leu Thr Pro Lys Asp Lys Val Thr Tyr Gly His Val Ser	
	410 415 420	

gtc aag gcc ctc aac atc atc cag ctc att acg gag gac aag ttc aac 4822
Val Lys Ala Leu Asn Ile Ile Gln Leu Ile Thr Glu Asp Lys Phe Asn
425 430 435

5 ttc ctc gca acc ctc aag aag gct ctc aag acc ctg tga tga 4864
Phe Leu Ala Thr Leu Lys Lys Ala Leu Lys Thr Leu
440 445 450

10 gaattctgca tgcgtttgga cgtatgctca ttcaggttgg agccaatttg gttgatgtgt 4924
gtgcgagttc ttgcgagtct gatgagacat ctctgtattg tgtttctttc cccagtgttt 4984
tctgtacttg tgtaatcggc taatcgccaa cagattcggc gatgaataaa tgagaaataa 5044

15 attgttctga ttttgagtgc aaaaaaaaaag gaatt 5079

<210> 32
<211> 232
20 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Construcción sintética
25
<400> 32

Met Ala Phe Phe Asn Arg Val Ile Thr Leu Thr Val Pro Ser Ser Asp
1 5 10 15

30 Val Val Asn Tyr Ser Glu Ile Tyr Gln Val Ala Pro Gln Tyr Val Asn
20 25 30

35 Gln Ala Leu Thr Leu Ala Lys Tyr Phe Gln Gly Ala Ile Asp Gly Ser
35 40 45

40 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
5					85					90					95	
	Asn	Val	Leu	Ser	Ile	Val	Ile	Asp	Asn	Lys	Lys	Phe	Trp	Asp	Gln	Val
10				100					105					110		
	Thr	Ala	Ala	Ile	Thr	Asn	Thr	Phe	Thr	Asn	Leu	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser
15				115				120					125			
	Glu	Ala	Trp	Ile	Phe	Tyr	Tyr	Lys	Glu	Asp	Ala	His	Lys	Thr	Ser	Tyr
	130						135					140				
20	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
25					165						170				175	
	Glu	Lys	Val	Leu	Phe	Val	Thr	Ile	Lys	Asp	Thr	Glu	Asn	Tyr	Ala	Val
30				180						185				190		
	Thr	Val	Lys	Ala	Ile	Asn	Val	Val	Gln	Ala	Leu	Gln	Ser	Ser	Arg	Asp
35				195					200				205			
	Ser	Lys	Val	Val	Asp	Ala	Phe	Lys	Ser	Pro	Arg	His	Leu	Pro	Arg	Lys
	210						215					220				
40	Arg	His	Lys	Ile	Cys	Ser	Asn	Ser								
	225						230									

<211> 218
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Construcción sintética

<400> 33

10 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
15 20 25 30

Ala Tyr Leu Leu Cys Arg Glu Phe Glu Ser Ile Val Asp Pro Thr Thr
35 40 45

20 Arg Glu Ser Asp Phe Asp Lys Thr Leu Thr Ile Val Lys Ser Asp Ser
50 55 60

25 Thr Leu Val Thr Val Gly Thr Met Asn Thr Lys Leu Val Asn Ser Gln
65 70 75 80

30 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
35 100 105 110

Thr Glu Leu Ile Gly Asn Leu Phe Val Asn Leu Asn Ser Gln Val Gln
115 120 125

40 Glu Tyr Ile Tyr Phe Tyr Glu Glu Lys Glu Lys Gln Thr Ser Tyr Arg
130 135 140

```
<220>
<221> 5'UTR
<222> (650)..(710)
<223> Directriz CAB de trigo
```

```

<220>
<221>  Intrón
<222>  (727)..(1206)
<223>  actina de arroz
5
<220>
<221>  CDS
<222>  (1216)..(1917)
<223>  TIC809
10
<220>
<221>  terminador
<222>  (1939)..(2148)
<223>  Hsp17 de trigo
15
<400>  34
gggtccgatgt gagacttttc aacaaagggt aatatccgga aacctcctcg gattccattg      60

cccagctatc tgtcacttta ttgtgaagat agtggaaaag gaagggtggct cctacaaatg      120
20
ccatcattgc gataaaggaa aggccatcgt tgaagatgcc tctgccgaca gtgggtcccaa      180

agatggaccc ccacccacga ggagcatcgt ggaaaaagaa gacgttccaa ccacgtcttc      240

aaagcaagtg gattgatgtg atgggtccgat gtgagacttt tcaacaaagg gtaatatccg      300

gaaacctcct cggattccat tgcccagcta tctgtcactt tattgtgaag atagtggaaa      360

aggaaggtgg ctectacaaa tgccatcatt gcgataaagg aaaggccatc gttgaagatg      420
30
cctctgccga cagtgggtccc aaagatggac cccacccac gaggagcatc gtggaaaaag      480

aagacgttcc aaccacgtct tcaaagcaag tggattgatg tgatatctcc actgacgtaa      540

gggatgacgc acaatcccac tatccttcgc aagacccttc ctctatataa ggaagtccat      600
35
ttcatttgga gaggacacgc tgacaagctg actctagcag atcctctaga accatcttcc      660

acacactcaa gccacactat tggagaacac acagggacaa cacaccataa gatccaaggg      720
40
aggcctccgc cgccgccggt aaccaccccg cccctctcct ctttctttct ccgttttttt      780

ttccgtctcg gtctcgatct ttggccttgg tagtttgggt gggcgagagg cggcttcgtg      840

```

	cgcgcccaga	tcggtgcgcg	ggaggggagg	gatctcgcg	ctggggctct	cgccggcgtg	900
	gatccggccc	ggatctcgcg	gggaatgggg	ctctcggatg	tagatctgcg	atccgcggtt	960
5	gttgggggag	atgatggggg	gtttaaatt	tccgccgtgc	taaacaagat	caggaagagg	1020
	ggaaaagggc	actatggttt	atatttttat	atatttctgc	tgcttcgtca	ggcttagatg	1080
10	tgctagatct	ttctttcttc	ttttgtggg	tagaatttga	atccctcagc	attgttcac	1140
	ggtagttttt	cttttcatga	tttgtgacaa	atgcagcctc	gtgcggagct	ttttttagg	1200
	tagaagtgat	caacc	atg gcc ttc ttc aac	cgg gtg atc acc	ctc acg gtg		1251
			Met Ala Phe Phe Asn Arg Val Ile Thr Leu Thr Val				
15		1		5		10	
	ccg tgc tca	gac gtg gtc	aac tac tgc	gag atc tac	cag gtg gct	cct	1299
	Pro Ser Ser	Asp Val Val	Asn Tyr Ser	Glu Ile Tyr	Gln Val Ala	Pro	
		15		20		25	
20	cag tat gtc	aac cag gcc	ctg acc ctg	gcc aag tac	ttc cag ggc	gcc	1347
	Gln Tyr Val	Asn Gln Ala	Leu Thr Leu	Ala Lys Tyr	Phe Gln Gly	Ala	
		30		35		40	
25	atc gac ggc	agc acc ctg	agg ttc gac	ttc gag aag	gcg tta cag	atc	1395
	Ile Asp Gly	Ser Thr Leu	Arg Phe Asp	Phe Glu Lys	Ala Leu Gln	Ile	
	45		50		55	60	
	gcc aac gac	atc ccg cag	gcc gcg gtg	gtc aac acc	ctg aac cag	acc	1443
30	Ala Asn Asp	Ile Pro Gln	Ala Ala Val	Val Asn Thr	Leu Asn Gln	Thr	
		65		70		75	
	gtc cag cag	ggg acc gtc	cag gtc agc	gtc atg atc	gac aag atc	gtg	1491
	Val Gln Gln	Gly Thr Val	Gln Val Ser	Val Met Ile	Asp Lys Ile	Val	
35		80		85		90	
	gac atc atg	aag aat gtc	ctg tcc atc	gtg ata gac	aac aag aag	ttt	1539
	Asp Ile Met	Lys Asn Val	Leu Ser Ile	Val Ile Asp	Asn Lys Lys	Phe	
		95		100		105	
40	tgg gat cag	gtc acg gct	gcc atc acc	aac acc ttc	acg aac ctg	aac	1587
	Trp Asp Gln	Val Thr Ala	Ala Ala Ile	Thr Asn Thr	Phe Thr Asn	Leu Asn	
		110		115		120	

	agc cag gag tcg gag gcc tgg atc ttc tat tac aag gag gac gcc cac	1635
	Ser Gln Glu Ser Glu Ala Trp Ile Phe Tyr Tyr Lys Glu Asp Ala His	
	125 130 135 140	
5	aag acg tcc tac tat tac aac atc ctc ttc gcc atc cag gac gaa gag	1683
	Lys Thr Ser Tyr Tyr Tyr Asn Ile Leu Phe Ala Ile Gln Asp Glu Glu	
	145 150 155	
	acg ggt ggc gtg atg gcc acg ctg ccc atc gcc ttc gac atc agt gtg	1731
10	Thr Gly Gly Val Met Ala Thr Leu Pro Ile Ala Phe Asp Ile Ser Val	
	160 165 170	
	gac atc gag aag gag aag gtc ctg ttc gtg acc atc aag gac act gag	1779
	Asp Ile Glu Lys Glu Lys Val Leu Phe Val Thr Ile Lys Asp Thr Glu	
15	175 180 185	
	aat tac gcc gtc acc gtc aag gcg atc aac gtg gtc cag gca ctc cag	1827
	Asn Tyr Ala Val Thr Val Lys Ala Ile Asn Val Val Gln Ala Leu Gln	
	190 195 200	
20	tct agc agg gat tct aag gtg gtt gat gcg ttc aaa tcg cca cgg cac	1875
	Ser Ser Arg Asp Ser Lys Val Val Asp Ala Phe Lys Ser Pro Arg His	
	205 210 215 220	
25	tta ccc cgg aag agg cat aag att tgc tct aac tcg tga tga	1917
	Leu Pro Arg Lys Arg His Lys Ile Cys Ser Asn Ser	
	225 230	
	attcggatcc aagggcgaat tctgcatgcg tttggacgta tgctcattca gggttgagcc	1977
30	aatttggttg atgtgtgtgc gagttcttgc gagtctgatg agacatctct gtattgtgtt	2037
	tctttcccca gtgttttctg tacttgtgta atcggctaata cgccaacaga ttccggcgatg	2097
35	aataaatgag aaataaattg ttctgatttt gagtgcaaaa aaaaaggaat t	2148
	<210> 35	
	<211> 232	
40	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Construcción sintética	

<400> 35

Met Ala Phe Phe Asn Arg Val Ile Thr Leu Thr Val Pro Ser Ser Asp
 1 5 10 15
 5

Val Val Asn Tyr Ser Glu Ile Tyr Gln Val Ala Pro Gln Tyr Val Asn
 20 25 30
 10

Gln Ala Leu Thr Leu Ala Lys Tyr Phe Gln Gly Ala Ile Asp Gly Ser
 35 40 45

15 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
 20 65 70 75 80

Thr Val Gln Val Ser Val Met Ile Asp Lys Ile Val Asp Ile Met Lys
 85 90 95
 25

Asn Val Leu Ser Ile Val Ile Asp Asn Lys Lys Phe Trp Asp Gln Val
 100 105 110

30 Thr Ala Ala Ile Thr Asn Thr Phe Thr Asn Leu Asn Ser Gln Glu Ser
 115 120 125

35 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
 40 145 150 155 160

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

5 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
10 210 215 220

Arg His Lys Ile Cys Ser Asn Ser
15 225 230

<210> 36
<211> 2541
<212> ADN
20 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia sintética; cassette de expresión en pMON70514 que
codifica TIC809
25

<220>
<221> característica_misc
<223> cassette de expresión en plantas pMON70514
30

<220>
<221> promotor
<222> (1)..(614)
<223> e35S
35

<220>
<221> 5'UTR
<222> (650)..(710)
<223> Directriz CAB de trigo
40

<220>
<221> Intrón
<222> (727)..(1206)
<223> actina de arroz

<220>
<221> péptido_de_tránsito
<222> (1230)..(1270)
<223> Zm RbcS

5

<220>
<221> Intrón
<222> (1371)..(1539)
<223> Zm RbcS

10

<220>
<221> péptido_de_tránsito
<222> (1540)..(1626)
<223> Zm RbcS

15

<220>
<221> CDS
<222> (1627)..(2328)
<223> TIC809

20

<220>
<221> terminador
<222> (2332)..(2541)
<223> Hspl7 de trigo

25

<400> 36

gggtccgatgt gagacttttc aacaaagggt aatatccgga aacctcctcg gattccattg 60

cccagctatc tgtcacttta ttgtgaagat agtggaaaag gaaggtggct cctacaaatg 120

30 ccatcattgc gataaaggaa aggccatcgt tgaagatgcc tctgccgaca gtgggtccaa 180

agatggaccc ccaccacga ggagcatcgt ggaaaaagaa gacgttccaa ccacgtcttc 240

35 aaagcaagtg gattgatgtg atggtccgat gtgagacttt tcaacaaagg gtaatatccg 300

gaaacctcct cggattccat tgcccagcta cctgtcactt tattgtgaag atagtggaaa 360

aggaagggtgg ctccctacaaa tgccatcatt gcgataaagg aaaggccatc gttgaagatg 420

40 cctctgccga cagtgggtccc aaagatggac cccacccac gaggagcatc gtggaaaaag 480

aagacgttcc aaccacgtct tcaaagcaag tggattgatg tgatatctcc actgacgtaa 540

	gggatgacgc acaatcccac tacccttcgc aagacccttc ctctatataa ggaagtccat	600
	ttcatttgga gaggacacgc tgacaagctg actctagcag atcctctaga accatcttcc	660
5	acacactcaa gccacactat tggagaacac acagggacaa cacaccataa gatccaaggg	720
	aggcctccgc cgccgccggt aaccaccccg cccctctcct ctttctttct ccgttttttt	780
	ttccgtctcg gtctcgatct ttggccttgg tagtttgggt gggcgagagg cggcttcgtg	840
10	cgcgcccaga tcggtgcgcg ggaggggagg gatctcgagg ctggggctct cgccggcgtg	900
	gatccggccc ggatctcgcg gggaatgggg ctctcggatg tagatctgcg atccgccgtt	960
15	gttgggggag atgatggggg gtttaaaatt tccgccgtgc taaacaagat caggaagagg	1020
	ggaaaagggc actatggttt atatttttat atatttctgc tgcttcgtca ggcttagatg	1080
	tgctagatct ttctttcttc tttttgtggg tagaatttga atccctcagg attgttcac	1140
20	ggtagttttt cttttcatga tttgtgacaa atgcagcctc gtgcggagct tttttgtagg	1200
	tagaagtgat caacctctag aggatcagca tggcgccac cgtgatgatg gcctcgtcgg	1260
25	ccaccgccgt cgctccgttc ctggggctca agtccaccgc cagcctcccc gtcgcccgcc	1320
	gctcctccag aagcctcggc aacgtcagca acggcggaag gatccggtgc atgcaggtaa	1380
	caaatgcac ctagctagta gttctttgca ttgcagcagc tgcagctagc gagttagtaa	1440
30	taggaagggg actgatgatc catgcatgga ctgatgtgtg ttgcccaccc catcccatcc	1500
	catttcccaa acgaaccgaa aacaccgtac tacgtgcagg tgtggcccta cggcaacaag	1560
35	aagttcgaga cgctgtcgta cctgccgccg ctgtcgaccg gcggggcgcat ccgctgcacg	1620
	caggcc atg gcc ttc ttc aac cgg gtg atc acc ctc acg gtg ccg tcg	1668
	Met Ala Phe Phe Asn Arg Val Ile Thr Leu Thr Val Pro Ser	
	1 5 10	
40	tca gac gtg gtc aac tac tcg gag atc tac cag gtg gct cct cag tat	1716
	Ser Asp Val Val Asn Tyr Ser Glu Ile Tyr Gln Val Ala Pro Gln Tyr	
	15 20 25 30	

	gtc aac cag gcc ctg acc ctg gcc aag tac ttc cag ggc gcc atc gac	1764
	Val Asn Gln Ala Leu Thr Leu Ala Lys Tyr Phe Gln Gly Ala Ile Asp	
	35 40 45	
5	ggc agc acc ctg agg ttc gac ttc gag aag gcg tta cag atc gcc aac	1812
	Gly Ser Thr Leu Arg Phe Asp Phe Glu Lys Ala Leu Gln Ile Ala Asn	
	50 55 60	
10	gac atc ccg cag gcc gcg gtg gtc aac acc ctg aac cag acc gtc cag	1860
	Asp Ile Pro Gln Ala Ala Val Val Asn Thr Leu Asn Gln Thr Val Gln	
	65 70 75	
15	cag ggg acc gtc cag gtc agc gtc atg atc gac aag atc gtg gac atc	1908
	Gln Gly Thr Val Gln Val Ser Val Met Ile Asp Lys Ile Val Asp Ile	
	80 85 90	
20	atg aag aat gtc ctg tcc atc gtg ata gac aac aag aag ttt tgg gat	1956
	Met Lys Asn Val Leu Ser Ile Val Ile Asp Asn Lys Lys Phe Trp Asp	
	95 100 105 110	
25	cag gtc acg gct gcc atc acc aac acc ttc acg aac ctg aac agc cag	2004
	Gln Val Thr Ala Ala Ile Thr Asn Thr Phe Thr Asn Leu Asn Ser Gln	
	115 120 125	
30	gag tcg gag gcc tgg atc ttc tat tac aag gag gac gcc cac aag acg	2052
	Glu Ser Glu Ala Trp Ile Phe Tyr Tyr Lys Glu Asp Ala His Lys Thr	
	130 135 140	
35	tcc tac tat tac aac atc ctc ttc gcc atc cag gac gaa gag acg ggt	2100
	Ser Tyr Tyr Tyr Asn Ile Leu Phe Ala Ile Gln Asp Glu Glu Thr Gly	
	145 150 155	
40	ggc gtg atg gcc acg ctg ccc atc gcc ttc gac atc agt gtg gac atc	2148
	Gly Val Met Ala Thr Leu Pro Ile Ala Phe Asp Ile Ser Val Asp Ile	
	160 165 170	
45	gag aag gag aag gtc ctg ttc gtg acc atc aag gac act gag aat tac	2196
	Glu Lys Glu Lys Val Leu Phe Val Thr Ile Lys Asp Thr Glu Asn Tyr	
	175 180 185 190	
50	gcc gtc acc gtc aag gcg atc aac gtg gtc cag gca ctc cag tct agc	2244
	Ala Val Thr Val Lys Ala Ile Asn Val Val Gln Ala Leu Gln Ser Ser	
	195 200 205	

	agg gat tct aag gtg gtt gat gcg ttc aaa tcg cca cgg cac tta ccc	2292
	Arg Asp Ser Lys Val Val Asp Ala Phe Lys Ser Pro Arg His Leu Pro	
	210 215 220	
5	cgg aag agg cat aag att tgc tct aac tcg tga tga attctgcatg	2338
	Arg Lys Arg His Lys Ile Cys Ser Asn Ser	
	225 230	
10	cgtttggacg tatgctcatt caggttggag ccaatttggg tgatgtgtgt gcgagttcctt	2398
	gcgagttctga tgagacatct ctgtattgtg tttctttccc cagtgttttc tgtacttgtg	2458
	taatcggcta atcgccaaca gattcggcga tgaataaatg agaaataaat tgtttctgatt	2518
15	ttgagtgcaa aaaaaaagga att	2541
	<210> 37	
	<211> 232	
20	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Construcción sintética	
25	<400> 37	
	Met Ala Phe Phe Asn Arg Val Ile Thr Leu Thr Val Pro Ser Ser Asp	
	1 5 10 15	
30	Val Val Asn Tyr Ser Glu Ile Tyr Gln Val Ala Pro Gln Tyr Val Asn	
	20 25 30	
35	Gln Ala Leu Thr Leu Ala Lys Tyr Phe Gln Gly Ala Ile Asp Gly Ser	
	35 40 45	
40	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
5					85					90					95	
	Asn	Val	Leu	Ser	Ile	Val	Ile	Asp	Asn	Lys	Lys	Phe	Trp	Asp	Gln	Val
10				100					105					110		
	Thr	Ala	Ala	Ile	Thr	Asn	Thr	Phe	Thr	Asn	Leu	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser
15				115				120					125			
	Glu	Ala	Trp	Ile	Phe	Tyr	Tyr	Lys	Glu	Asp	Ala	His	Lys	Thr	Ser	Tyr
		130					135					140				
20	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
25					165					170					175	
	Glu	Lys	Val	Leu	Phe	Val	Thr	Ile	Lys	Asp	Thr	Glu	Asn	Tyr	Ala	Val
30				180						185				190		
	Thr	Val	Lys	Ala	Ile	Asn	Val	Val	Gln	Ala	Leu	Gln	Ser	Ser	Arg	Asp
35				195					200				205			
	Ser	Lys	Val	Val	Asp	Ala	Phe	Lys	Ser	Pro	Arg	His	Leu	Pro	Arg	Lys
		210					215					220				
40	Arg	His	Lys	Ile	Cys	Ser	Asn	Ser								
	225					230										

<211> 4083
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> secuencia sintética; cassette de expresión en pMON64144 que
codifica TIC809

10 <220>
<221> característica_misc
<223> cassette de expresión en plantas pMON64144

<220>

15 <221> promotor
<222> (1)..(1844)
<223> Rcc3 de arroz

<220>

20 <221> 5'UTR
<222> (1845)..(1943)
<223> Rcc3 de arroz

<220>

25 <221> Intrón
<222> (1952)..(2755)
<223> HSP70

<220>

30 <221> péptido_de_tránsito
<222> (2772)..(2912)
<223> Zm RbcS

<220>

35 <221> Intrón
<222> (2913)..(3081)
<223> Zm RbcS

<220>

40 <221> péptido_de_tránsito
<222> (3082)..(3168)
<223> Zm RbcS

<220>

```

<221> CDS
<222> (3169)..(3870)
<223> TIC809

5  <220>
    <221> terminador
    <222> (3874)..(4083)
    <223> Hsp17 de trigo

10 <400> 38
    gcaatcaacc aacatatact gaatatggga aagtttcttt tagcttttct aaattaagta      60
    ctgattctta aacttaagtg agaatctagc ctgttcaggg gcgacggcta aaggacatag      120
    caccactagt ctacgcgatt gcaaaaaaga agaatgcaag cctgcaacaa gtatcgcttt      180
    cccgaccaat ggttgggtga cctcggtttg ccggtaacct caggctggac gacagaacta      240
    attagccaac ttgtcaatgt ctaggggtgct gttcatagcc tgcagttgac agagtacgaa      300
20  aaggacaaga tcacatggaa gctaactagt cacggcgaat acatgacgac atcggcctac      360
    aacgcacaac ttcttggcat aaaagcttca atttcaatgc ccctatctgg aagccctagg      420
    cgccgcgcaa atgtaaaaca ttcgcttcgc ttggcttggt atccaaaata gagtatggac      480
    ctccgacaga ttggcaaccc gtgggtaatc gaaaatggct ccctctgccc ctttgtcgaa      540
    ggaatcagga aacggccctc acctcctggc ggagtgtaga tatgtgaaag aatctaggcg      600
30  acacttgag actggacaac atgtgaacaa ataagaccaa cgttatggca acaagcctcg      660
    acgctactca agtgggtgga ggccaccgca tgttccaacg aagcgccaaa gaaagccttg      720
    cagactctaa tgctattagt cgcctaggat atttggaatg aaaggaaccg cagagttttt      780
    cagcaccaag agcttccggt ggctagtctg atagccaaaa ttaaggagga tgccaaaaca      840
    tgggtcttgg cgggcgcgaa acaccttgat aggtggctta ccttttaaca tgttcggggc      900
40  aaaggccttg agacggtaaa gttttctatt tgcgcttgcg catgtacaat tttattcctc      960
    tattcaatga aattgggtggc tcaactggttc attaaaaaaaa aaagaatcta gcctgttcgg      1020
  
```

	gaagaagagg attttgttcg tgagagagag agagagagag agagagagag agagagagaa	1080
	ggaggaggag gattttcagg cttcgcattg cccaacctct gcttctgttg gccaagaag	1140
5	aatcccaggc gcccatgggc tggcagttta ccacggacct acctagccta ccttagctat	1200
	ctaagcgggc cgacctagta gccacgtgcc tagtgtagat taaagttgcc gggccagcag	1260
	gaagccacgc tgcaatggca tcttcccctg tccttcgcgt acgtgaaaac aaaccaggt	1320
10	aagcttagaa tcttcttgcc cgttggactg ggacacccac caatcccacc atgccccgat	1380
	attcctccgg tctcggttca tgtgatgtcc tctcttggtg gatcacggag caagcattct	1440
15	taaacggcaa aagaaaatca ccaacttgct cacgcagtca cgctgcaccg cgcgaagcga	1500
	cgccccgatag gccaagatcg cgagataaaa taacaaccaa tgatcataag gaaacaagcc	1560
	cgcgatgtgt cgtgtgcagc aatcttggtc atttgcgga tcgagtgtt cacagctaac	1620
20	caaatatctg gccgatgatt taacacatta tcagcgtaga tgtacgtacg atttgттаат	1680
	taatctacga gccttgctag ggcagggtgt ctgccagcca atccagatcg ccctcgtatg	1740
25	cacgctcaca tgatggcagg gcagggttca catgagctct aacggctgat taattaatcc	1800
	cggggctcga ctataaatac ctccttaate ccatgatcaa aaccatctca agcagcctaa	1860
	tcattctccag ctgatcaaga gctcttaatt agctagctag tgattagctg cgcttggtgat	1920
30	cgatcgatct cgggtacgta gcaatagatc taccgtcttc ggtacgcgct cactccgccc	1980
	tctgcctttg ttactgccac gtttctctga atgctctctt gtgtggtgat tgctgagagt	2040
35	ggtttagctg gatctagaat tacactctga aatcgtgttc tgctgtgct gattacttgc	2100
	cgtcctttgt agcagcaaaa tatagggaca tggtagtacg aaacgaagat agaacctaca	2160
	cagcaatacg agaaatgtgt aatttggtgc ttagcggtat ttatttaagc acatgttggt	2220
40	gttatagggc acttggaattc agaagtttgc tgттааттаа ggcacaggct tcatactaca	2280
	tgggtcaata gtatagggat tcatattata ggcgatacta taataatttg ttcgtctgca	2340

gagcttatta ttgccaataa ttagatatcc ctattctgtt ttgtttgtg tgctgttaaa 2400
 ttgttaacgc ctgaaggaat aaatataaat gacgaaattt tgatgtttat ctctgtcctt 2460
 5 ttattgtgac cataagtcaa gatcagatgc acttgtttta aatattgttg tctgaagaaa 2520
 taagtactga cagtattttg atgcattgat ctgcttgttt gttgtaacaa aatttaaaaa 2580
 taaagagttt cctttttgtt gctctcctta cctcctgatg gtatctagta tctaccaact 2640
 10 gacactatat tgcttctctt tacatacgta tcttgctcga tgccttctcc ctagtgttga 2700
 ccagtgttac tcacatagtc ttgtctcatt tcattgtaat gcagatacca agcggcctct 2760
 15 agaggatcag catggcgccc accgtgatga tggcctcgtc ggccaccgcc gtcgctccgt 2820
 tcttgggggt caagtcaccc gccagcctcc ccgtcgcccg ccgctcctcc agaagcctcg 2880
 gcaacgtcag caacggcgga aggatccggt gcatgcaggt aacaaatgca tcctagctag 2940
 20 tagttctttg cattgcagca gctgcagcta gcgagttagt aataggaagg gaactgatga 3000
 tccatgcatg gactgatgtg tgttgcccat cccatcccat cccatttccc aaacgaaccg 3060
 25 aaaacaccgt actacgtgca ggtgtggccc tacggcaaca agaagttcga gacgctgtcg 3120
 tacctgccgc cgtgtctgac cggcgggggc atccgctgca tgcaggcc atg gcc ttc 3177
 Met Ala Phe
 1
 30 ttc aac cgg gtg atc acc ctc acg gtg ccg tcg tca gac gtg gtc aac 3225
 Phe Asn Arg Val Ile Thr Leu Thr Val Pro Ser Ser Asp Val Val Asn
 5 10 15
 35 tac tcg gag atc tac cag gtg gct cct cag tat gtc aac cag gcc ctg 3273
 Tyr Ser Glu Ile Tyr Gln Val Ala Pro Gln Tyr Val Asn Gln Ala Leu
 20 25 30 35
 acc ctg gcc aag tac ttc cag ggc gcc atc gac ggc agc acc ctg agg 3321
 40 Thr Leu Ala Lys Tyr Phe Gln Gly Ala Ile Asp Gly Ser Thr Leu Arg
 40 45 50
 ttc gac ttc gag aag gcg tta cag atc gcc aac gac atc ccg cag gcc 3369
 Phe Asp Phe Glu Lys Ala Leu Gln Ile Ala Asn Asp Ile Pro Gln Ala

	55	60	65	
	gcg gtg gtc aac acc ctg aac cag acc gtc cag cag ggg acc gtc cag			3417
	Ala Val Val Asn Thr Leu Asn Gln Thr Val Gln Gln Gly Thr Val Gln			
5	70	75	80	
	gtc agc gtc atg atc gac aag atc gtg gac atc atg aag aat gtc ctg			3465
	Val Ser Val Met Ile Asp Lys Ile Val Asp Ile Met Lys Asn Val Leu			
	85	90	95	
10				
	tcc atc gtg ata gac aac aag aag ttt tgg gat cag gtc acg gct gcc			3513
	Ser Ile Val Ile Asp Asn Lys Lys Phe Trp Asp Gln Val Thr Ala Ala			
	100	105	110	115
15				
	atc acc aac acc ttc acg aac ctg aac agc cag gag tcg gag gcc tgg			3561
	Ile Thr Asn Thr Phe Thr Asn Leu Asn Ser Gln Glu Ser Glu Ala Trp			
	120	125	130	
	atc ttc tat tac aag gag gac gcc cac aag acg tcc tac tat tac aac			3609
20	Ile Phe Tyr Tyr Lys Glu Asp Ala His Lys Thr Ser Tyr Tyr Tyr Asn			
	135	140	145	
	atc ctc ttc gcc atc cag gac gaa gag acg ggt ggc gtg atg gcc acg			3657
	Ile Leu Phe Ala Ile Gln Asp Glu Glu Thr Gly Gly Val Met Ala Thr			
25	150	155	160	
	ctg ccc atc gcc ttc gac atc agt gtg gac atc gag aag gag aag gtc			3705
	Leu Pro Ile Ala Phe Asp Ile Ser Val Asp Ile Glu Lys Glu Lys Val			
	165	170	175	
30				
	ctg ttc gtg acc atc aag gac act gag aat tac gcc gtc acc gtc aag			3753
	Leu Phe Val Thr Ile Lys Asp Thr Glu Asn Tyr Ala Val Thr Val Lys			
	180	185	190	195
35				
	gcg atc aac gtg gtc cag gca ctc cag tct agc agg gat tct aag gtg			3801
	Ala Ile Asn Val Val Gln Ala Leu Gln Ser Ser Arg Asp Ser Lys Val			
	200	205	210	
	gtt gat gcg ttc aaa tcg cca cgg cac tta ccc cgg aag agg cat aag			3849
40	Val Asp Ala Phe Lys Ser Pro Arg His Leu Pro Arg Lys Arg His Lys			
	215	220	225	
	att tgc tct aac tcg tga tga attctgcatg cgtttggacg tatgctcatt			3900
	Ile Cys Ser Asn Ser			

230

cagggttgag ccaatttggg tgatgtgtgt gcgagttctt gcgagtctga tgagacatct 3960

5 ctgtattgtg tttctttccc cagtgttttc tgtacttgtg taatcggcta atcgccaaca 4020

gattcggcga tgaataaatg agaaataaat tgttctgatt ttgagtcaa aaaaaaagga 4080

att 4083

10

<210> 39

<211> 232

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

20 <400> 39

Met Ala Phe Phe Asn Arg Val Ile Thr Leu Thr Val Pro Ser Ser Asp

1 5 10 15

25

Val Val Asn Tyr Ser Glu Ile Tyr Gln Val Ala Pro Gln Tyr Val Asn

20 25 30

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

35 50 55 60

Pro Gln Ala Ala Val Val Asn Thr Leu Asn Gln Thr Val Gln Gln Gly

65 70 75 80

40

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
5	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	
10	130	135 140
	Tyr Tyr Asn Ile Leu Phe Ala Ile Gln Asp Glu Glu Thr Gly Gly Val	
	145	150 155 160
15		
	Met Ala Thr Leu Pro Ile Ala Phe Asp Ile Ser Val Asp Ile Glu Lys	
	165	170 175
20		
	Glu Lys Val Leu Phe Val Thr Ile Lys Asp Thr Glu Asn Tyr Ala Val	
	180	185 190
25	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	
30	210	215 220
	Arg His Lys Ile Cys Ser Asn Ser	
	225	230
35		
	<210> 40	
	<211> 6641	
	<212> ADN	
40	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> secuencia sintética; cassettes de expresión en pMON64150 que	
	codifican TIC809 y TIC810	

- <220>
 - <221> característica_misc
 - <223> primer y segundo cassette de expresión en plantas pMON64150

- 5
 - <220>
 - <221> promotor
 - <222> (1)..(1844)
 - <223> Rcc3 de arroz

- 10
 - <220>
 - <221> 5'UTR
 - <222> (1845)..(1943)
 - <223> Directriz de Rcc3 de arroz

- 15
 - <220>
 - <221> Intrón
 - <222> (1952)..(2755)
 - <223> Intrón HSP70

- 20
 - <220>
 - <221> péptido_de_tránsito
 - <222> (2772)..(2912)
 - <223> Zm RbcS

- 25
 - <220>
 - <221> Intrón
 - <222> (2913)..(3081)
 - <223> Zm RbcS

- 30
 - <220>
 - <221> péptido_de_tránsito
 - <222> (3082)..(3168)
 - <223> Zm RbcS

- 35
 - <220>
 - <221> CDS
 - <222> (3169)..(3870)
 - <223> TIC809

- 40
 - <220>
 - <221> terminador
 - <222> (3874)..(4083)
 - <223> Hsp17 de trigo

<220>
<221> promotor
<222> (4139)..(4750)
<223> e35S
5
<220>
<221> 5'UTR
<222> (4751)..(4759)
<223> directriz
10
<220>
<221> 5'UTR
<222> (4786)..(4846)
<223> Directriz CAB de trigo
15
<220>
<221> Intrón
<222> (4863)..(5342)
<223> actina de arroz
20
<220>
<221> péptido_de_tránsito
<222> (5366)..(5506)
<223> Zm.RbcS
25
<220>
<221> Intrón
<222> (5507)..(5676)
<223> Zm.RbcS
30
<220>
<221> péptido_de_tránsito
<222> (5677)..(5766)
<223> Zm RbcS
35
<220>
<221> CDS
<222> (5767)..(6426)
<223> TIC810
40
<220>
<221> terminador
<222> (6432)..(6641)
<223> Hsp17 de trigo

<400> 40
 gcaatcaacc aacatatact gaatatggga aagtttcttt tagcttttct aaattaagta 60
 ctgattctta aacttaagtg agaacttagc ctgttcaggg gcgacggcta aaggacatag 120
 5 caccactagt ctacgcgatt gcaaaaaaga agaatgcaag cctgcaacaa gtatcgcttt 180
 cccgaccaat gggtggttga cctcggtttg ccggtaacct caggctggac gacagaacta 240
 10 attagccaac ttgtcaatgt ctaggggtgct gttcatagcc tgcagttgac agagtacgaa 300
 aaggacaaga tcacatggaa gctaactagt cacggcgaat acatgacgac atcggcctac 360
 aacgcacaac ttcttggcat aaaagcttca atttcaatgc ccctatctgg aagccctagg 420
 15 cgccgcgcaa atgtaaaaca ttcgcttcgc ttggcttggt atccaaaata gagtatggac 480
 ctccgacaga ttggcaaccc gtgggtaatc gaaaatggct ccctctgccc ctttgtcgaa 540
 20 ggaatcagga aacggccctc acctcctggc ggagtgtaga tatgtgaaag aatctaggcg 600
 acacttgag actggacaac atgtgaacaa ataagaccaa cgttatggca acaagcctcg 660
 acgctactca agtgggtggga ggccaccgca tgttccaacg aagcgccaaa gaaagccttg 720
 25 cagactctaa tgctattagt cgcctaggat atttggaatg aaaggaaccg cagagttttt 780
 cagcaccaag agcttccggt ggctagtctg atagccaaaa ttaaggagga tgccaaaaca 840
 30 tgggtcttgg cgggcgcgaa acaccttgat aggtggctta ccttttaaca tgttcgggcc 900
 aaaggccttg agacggtaaa gttttctatt tgcgcttgcg catgtacaat tttattcctc 960
 tattcaatga aattggtggc tcaactgggtc attaaaaaaaa aaagaatcta gcctgttcgg 1020
 35 gaagaagagg attttgttcg tgagagagag agagagagag agagagagag agagagagaa 1080
 ggaggaggag gattttcagg cttcgcattg cccaacctct gcttctgttg gcccaagaag 1140
 40 aatcccaggc gcccatgggc tggcagttta ccacggacct acctagccta ccttagctat 1200
 ctaagcgggc cgacctagta gccacgtgcc tagtgtagat taaagttgcc gggccagcag 1260
 gaagccacgc tgcaatggca tcttcccctg tccttcgcgt acgtgaaaac aaaccaggt 1320

aagcttagaa tcttcttgcc cgttggactg ggacacccac caatcccacc atgccccgat 1380
 attcctccgg tctcggttca tgtgatgtcc tctcttgtgt gatcacggag caagcattct 1440
 5 taaacggcaa aagaaaatca ccaacttgct cacgcagtca cgctgcaccg cgccaagcga 1500
 cgccccgatag gccaaagatcg cgagataaaa taacaaccaa tgatcataag gaaacaagcc 1560
 cgcgatgtgt cgtgtgcagc aatcttggtc atttgcggga tcgagtgttt cacagctaac 1620
 10 caaatattcg gccgatgatt taacacatta tcagcgtaga tgtacgtacg atttggttaat 1680
 taatctacga gccttgctag ggcagggtgt ctgccagcca atccagatcg cctcgtatg 1740
 15 cacgctcaca tgatggcagg gcagggttca catgagctct aacggtcgat taattaatcc 1800
 cggggctcga ctataaatac ctccctaata ccatgatcaa aaccatctca agcagcctaa 1860
 tcactccag ctgatcaaga gctcttaatt agctagctag tgattagctg cgcttgtgat 1920
 20 cgatcgatct cgggtacgta gcaatagatc taccgtcttc ggtacgcgct cactccgccc 1980
 tctgcctttg ttactgccac gtttctctga atgctctctt gtgtggtgat tgctgagagt 2040
 25 ggtttagctg gatctagaat tacactctga aatcgtgttc tgctgtgct gattacttgc 2100
 cgtcctttgt agcagcaaaa tatagggaca tggtagtacg aaacgaagat agaacctaca 2160
 cagcaatacg agaaatgtgt aatttgggtgc ttagcgggtat ttatttaagc acatgttggg 2220
 30 gttatagggc acttggattc agaagtttgc tgttaattta ggcacaggct tcatactaca 2280
 tgggtcaata gtatagggat tcatattata ggcgatacta taataatttg ttcgtctgca 2340
 35 gagcttatta ttgccaataa ttagatattc ctattctggt tttgtttgtg tgctgttaaa 2400
 ttgttaacgc ctgaaggaat aaatataaat gacgaaattt tgatgtttat ctctgctcct 2460
 ttattgtgac cataagtcaa gatcagatgc acttgtttta aatattgttg tctgaagaaa 2520
 40 taagtactga cagtattttg atgcattgat ctgcttgttt gttgtaacaa aatttaaaaa 2580
 taaagagttt cctttttggt gctctcctta cctcctgatg gtatctagta tctaccaact 2640

	gacactatat tgcttctctt tacatacgta tcttgctcga tgccttctcc ctagtgttga	2700
	ccagtgttac tcacatagtc tttgctcatt tcattgtaat gcagatacca agcggcctct	2760
5	agaggatcag catggcgccc accgtgatga tggcctcgtc ggccaccgcc gtcgctccgt	2820
	tcctgggggt caagtccacc gccagcctcc ccgtcgcccg ccgtcctcc agaagcctcg	2880
	gcaacgtcag caacggcgga aggatccggt gcatgcaggt aacaaatgca tcctagctag	2940
10	tagttctttg cattgcagca gctgcagcta gcgagttagt aataggaagg gaactgatga	3000
	tccatgcatg gactgatgtg tgttgcccat cccatcccat cccatttccc aaacgaaccg	3060
15	aaaacaccgt actacgtgca ggtgtggccc tacggcaaca agaagttcga gacgctgtcg	3120
	tacctgccgc cgctgtcgac cggcggggcg atccgctgca tgcaggcc atg gcc ttc	3177
	Met Ala Phe	
	1	
20	ttc aac cgg gtg atc acc ctc acg gtg ccg tcg tca gac gtg gtc aac	3225
	Phe Asn Arg Val Ile Thr Leu Thr Val Pro Ser Ser Asp Val Val Asn	
	5 10 15	
25	tac tcg gag atc tac cag gtg gct cct cag tat gtc aac cag gcc ctg	3273
	Tyr Ser Glu Ile Tyr Gln Val Ala Pro Gln Tyr Val Asn Gln Ala Leu	
	20 25 30 35	
	acc ctg gcc aag tac ttc cag ggc gcc atc gac ggc agc acc ctg agg	3321
30	Thr Leu Ala Lys Tyr Phe Gln Gly Ala Ile Asp Gly Ser Thr Leu Arg	
	40 45 50	
	ttc gac ttc gag aag gcg tta cag atc gcc aac gac atc ccg cag gcc	3369
	Phe Asp Phe Glu Lys Ala Leu Gln Ile Ala Asn Asp Ile Pro Gln Ala	
35	55 60 65	
	gcg gtg gtc aac acc ctg aac cag acc gtc cag cag ggg acc gtc cag	3417
	Ala Val Val Asn Thr Leu Asn Gln Thr Val Gln Gln Gly Thr Val Gln	
	70 75 80	
40	gtc agc gtc atg atc gac aag atc gtg gac atc atg aag aat gtc ctg	3465
	Val Ser Val Met Ile Asp Lys Ile Val Asp Ile Met Lys Asn Val Leu	
	85 90 95	

	tcc atc gtg ata gac aac aag aag ttt tgg gat cag gtc acg gct gcc	3513
	Ser Ile Val Ile Asp Asn Lys Lys Phe Trp Asp Gln Val Thr Ala Ala	
	100 105 110 115	
5	atc acc aac acc ttc acg aac ctg aac agc cag gag tcg gag gcc tgg	3561
	Ile Thr Asn Thr Phe Thr Asn Leu Asn Ser Gln Glu Ser Glu Ala Trp	
	120 125 130	
	atc ttc tat tac aag gag gac gcc cac aag acg tcc tac tat tac aac	3609
10	Ile Phe Tyr Tyr Lys Glu Asp Ala His Lys Thr Ser Tyr Tyr Tyr Asn	
	135 140 145	
	atc ctc ttc gcc atc cag gac gaa gag acg ggt ggc gtg atg gcc acg	3657
	Ile Leu Phe Ala Ile Gln Asp Glu Glu Thr Gly Gly Val Met Ala Thr	
15	150 155 160	
	ctg ccc atc gcc ttc gac atc agt gtg gac atc gag aag gag aag gtc	3705
	Leu Pro Ile Ala Phe Asp Ile Ser Val Asp Ile Glu Lys Glu Lys Val	
	165 170 175	
20	ctg ttc gtg acc atc aag gac act gag aat tac gcc gtc acc gtc aag	3753
	Leu Phe Val Thr Ile Lys Asp Thr Glu Asn Tyr Ala Val Thr Val Lys	
	180 185 190 195	
25	gcg atc aac gtg gtc cag gca ctc cag tct agc agg gat tct aag gtg	3801
	Ala Ile Asn Val Val Gln Ala Leu Gln Ser Ser Arg Asp Ser Lys Val	
	200 205 210	
	gtt gat gcg ttc aaa tcg cca cgg cac tta ccc cgg aag agg cat aag	3849
30	Val Asp Ala Phe Lys Ser Pro Arg His Leu Pro Arg Lys Arg His Lys	
	215 220 225	
	att tgc tct aac tcg tga tga attctgcatg cgtttgacg tatgctcatt	3900
	Ile Cys Ser Asn Ser	
35	230	
	caggttgag ccaatttggt tgatgtgtgt gcgagttctt gcgagtcga tgagacatct	3960
	ctgtattgtg tttctttccc cagtgttttc tgtacttggt taatcggcta atcgccaaca	4020
40	gattcggcga tgaataaatg agaaataaat tgttctgatt ttgagtgcaa aaaaaaagga	4080
	attagatctg tgtgtgtttt ttggatcccc ggggcggccg cgtaacaag cttctgcagg	4140

	tccgattgag acttttcaac aaagggtaat atccggaaac ctctcggat tccattgccc	4200
	agctatctgt cactttattg tgaagatagt ggaaaaggaa ggtggctcct acaaatgcca	4260
5	tcattgcat aaaggaaagg ccatcggtga agatgcctct gccgacagt gtcccaaaga	4320
	tggacccccca cccacgagga gcatcggtga aaaagaagac gttccaacca cgtcttcaaa	4380
	gcaagtggat tgatgtgat gtccgattga gacttttcaa caaagggtaa tatccggaaa	4440
10	cctcctcgga ttccattgcc cagctatctg tcactttatt gtgaagatag tggaaaagga	4500
	aggtggctcc taaaaatgcc atcattgcga taaaggaaag gccatcggtg aagatgcctc	4560
15	tgccgacagt ggtcccaaag atggaccccc acccagagg agcatcggtg aaaaagaaga	4620
	cgttccaacc acgtcttcaa agcaagtga ttgatgtgat atctccactg acgtaaggga	4680
	tgacgcacaa tcccactatc cttcgcaaga ccttctctct atataaggaa gttcatttca	4740
20	tttggagagg acacgtgac aagctgactc tagcagatcc tctagaacca tcttccacac	4800
	actcaagcca cactattgga gaacacacag ggacaacaca ccataagatc caagggaggc	4860
25	ctccgccgcc gccggtaacc accccgcccc tctcctcttt ctttctcgt tttttttcc	4920
	gtctcggctc cgatcttttg ccttggtagt ttgggtgggc gagaggcggc ttcgtgcgcg	4980
	cccagatcgg tgcgcgggag gggcgggac tcgcggctgg ggctctcgcc ggcgtggatc	5040
30	cggcccggat ctgcgggga atggggctct cggatgtaga tctgcgatcc gccgttggtg	5100
	ggggagatga tgggggggtt aaaatttccg ccgtgctaaa caagatcagg aagaggggaa	5160
35	aagggcacta tggtttatat ttttatatat ttctgctgct tcgtcaggct tagatgtgct	5220
	agatctttct ttcttctttt tgtgggtaga atttgaatcc ctacgactg ttcacggta	5280
	gtttttcttt tcatgatttg tgacaaatgc agcctcgtgc ggagcttttt tgtaggtaga	5340
40	agtgatcaac ctctagagga tcagcatggc gccaccgtg atgatggcct cgtcggccac	5400
	cgccgtcgtc ccgttccagg ggctcaagtc caccgccagc ctccccgtcg cccgccgctc	5460

255

	ctccagaagc ctcggcaacg tcagcaacgg cggaaggatc cgggtgcatgc aggtaacaaa	5520
	tgcacccctag ctagtagttc tttgcattgc agcagctgca gctagcgagt tagtaatagg	5580
5	aagggaactg atgatccatg catggactga tgtgtgttgc ccatcccatc ccatttccca	5640
	accccaaacg aaccaaaca cacgtactac gtgcaggtgt ggccggccta cggcaacaag	5700
	aagttcgaga cgctgtcgta cctgccgccg ctgtcgaccg gcggggcgcat ccgctgcatg	5760
10	caggcc atg agc aaa gaa atc agg ctc aac ctt tct cgt gag agc ggc	5808
	Met Ser Lys Glu Ile Arg Leu Asn Leu Ser Arg Glu Ser Gly	
	235 240 245	
15	gcc gac ctg tac ctc aag atc ctc gcc ttc gtg aag ccc gag cac ttc	5856
	Ala Asp Leu Tyr Leu Lys Ile Leu Ala Phe Val Lys Pro Glu His Phe	
	250 255 260	
	ttt cag gcg tac ctc ctg tgc cgc gag ttc gag agc atc gtg gat cct	5904
20	Phe Gln Ala Tyr Leu Leu Cys Arg Glu Phe Glu Ser Ile Val Asp Pro	
	265 270 275	
	aca acc cgc gag tct gac ttc gac aag acg ctg acc atc gtg aag tcg	5952
	Thr Thr Arg Glu Ser Asp Phe Asp Lys Thr Leu Thr Ile Val Lys Ser	
25	280 285 290	
	gac tcc acc ctc gtg acc gtg ggc acg atg aac acc aag ctg gtc aat	6000
	Asp Ser Thr Leu Val Thr Val Gly Thr Met Asn Thr Lys Leu Val Asn	
	295 300 305 310	
30	agc caa gag atc ctc gtg tcg gac ttg atc act caa gtc ggt tcc cag	6048
	Ser Gln Glu Ile Leu Val Ser Asp Leu Ile Thr Gln Val Gly Ser Gln	
	315 320 325	
35	atc gcc gat acc ctc ggc atc acg gac atc gac gcc aac acc cag caa	6096
	Ile Ala Asp Thr Leu Gly Ile Thr Asp Ile Asp Ala Asn Thr Gln Gln	
	330 335 340	
	cag ctc acg gag ctg atc ggc aac ctc ttc gtg aac ctc aat tcc caa	6144
40	Gln Leu Thr Glu Leu Ile Gly Asn Leu Phe Val Asn Leu Asn Ser Gln	
	345 350 355	
	gtt cag gag tac atc tac ttc tac gag gag aag gag aag cag acc tcc	6192
	Val Gln Glu Tyr Ile Tyr Phe Tyr Glu Glu Lys Glu Lys Gln Thr Ser	

	360	365	370	
	tac cgc tac aac atc ctc ttc gtg ttc gaa aag gag tcg ttc atc acc			6240
	Tyr Arg Tyr Asn Ile Leu Phe Val Phe Glu Lys Glu Ser Phe Ile Thr			
5	375	380	385	390
	att ctg cca atg ggc ttc gac gtg acc gtg aac acg aac aag gag gcc			6288
	Ile Leu Pro Met Gly Phe Asp Val Thr Val Asn Thr Asn Lys Glu Ala			
	395	400	405	
10	gtc ctg aag ctg acc ccg aag gac aag gtt acc tac ggc cac gtc agc			6336
	Val Leu Lys Leu Thr Pro Lys Asp Lys Val Thr Tyr Gly His Val Ser			
	410	415	420	
15	gtc aag gcc ctc aac atc atc cag ctc att acg gag gac aag ttc aac			6384
	Val Lys Ala Leu Asn Ile Ile Gln Leu Ile Thr Glu Asp Lys Phe Asn			
	425	430	435	
	ttc ctc gca acc ctc aag aag gct ctc aag acc ctg tga tga			6426
20	Phe Leu Ala Thr Leu Lys Lys Ala Leu Lys Thr Leu			
	440	445	450	
	gaattctgca tgcgtttgga cgtatgctca ttcagggttg agccaatttg gttgatgtgt			6486
25	gtgcgagttc ttgcgagtct gatgagacat ctctgtattg tgtttctttc ccagtgttt			6546
	tctgtacttg tgtaatcggc taatcgccaa cagattcggc gatgaataaa tgagaaataa			6606
	attgttctga ttttgagtgc aaaaaaaaaag gaatt			6641
30				
	<210> 41			
	<211> 232			
	<212> PRT			
35	<213> Secuencia artificial			
	<220>			
	<223> Construcción sintética			
40	<400> 41			
	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

5 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
10 50 55 60

Pro Gln Ala Ala Val Val Asn Thr Leu Asn Gln Thr Val Gln Gln Gly
65 70 75 80

15 Thr Val Gln Val Ser Val Met Ile Asp Lys Ile Val Asp Ile Met Lys
85 90 95

20 Asn Val Leu Ser Ile Val Ile Asp Asn Lys Lys Phe Trp Asp Gln Val
100 105 110

25 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
30 130 135 140

Tyr Tyr Asn Ile Leu Phe Ala Ile Gln Asp Glu Glu Thr Gly Gly Val
145 150 155 160

35 Met Ala Thr Leu Pro Ile Ala Phe Asp Ile Ser Val Asp Ile Glu Lys
165 170 175

40 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

5 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
10 225 230

<210> 42
<211> 218
15 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Construcción sintética
20
<400> 42

Met Ser Lys Glu Ile Arg Leu Asn Leu Ser Arg Glu Ser Gly Ala Asp
1 5 10 15
25

Leu Tyr Leu Lys Ile Leu Ala Phe Val Lys Pro Glu His Phe Phe Gln
20 25 30

30 Ala Tyr Leu Leu Cys Arg Glu Phe Glu Ser Ile Val Asp Pro Thr Thr
35 40 45

35 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
40 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

5 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
10 130 135 140

Tyr Asn Ile Leu Phe Val Phe Glu Lys Glu Ser Phe Ile Thr Ile Leu
145 150 155 160

15 Pro Met Gly Phe Asp Val Thr Val Asn Thr Asn Lys Glu Ala Val Leu
165 170 175

20 Lys Leu Thr Pro Lys Asp Lys Val Thr Tyr Gly His Val Ser Val Lys
180 185 190

25 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
30 210 215

<210> 43
<211> 5813
35 <212> . ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia sintética; cassettes de expresión en pMON64151 que
40 codifican TIC809 y TIC810

<220>
<221> característica_misc

<223> primer y segundo cassette de expresión en plantas pMON64151

<220>

<221> promotor

5 <222> (1)..(1844)

<223> Rcc3 de arroz

<220>

<221> 5'UTR

10 <222> (1845)..(1943)

<223> Directriz Rcc3 de arroz

<220>

<221> Intrón

15 <222> (1952)..(2755)

<223> Intrón HSP70

<220>

<221> CDS

20 <222> (2772)..(3473)

<223> TIC809

<220>

<221> terminador

25 <222> (3477)..(3686)

<223> Hsp17 de trigo

<220>

<221> promotor

30 <222> (3724)..(4337)

<223> e35S

<220>

<221> 5'UTR

35 <222> (4373)..(4433)

<223> Directriz CAB de trigo

<220>

<221> Intrón

40 <222> (4450)..(4929)

<223> actina de arroz

<220>

<221> CDS

<222> (4939)..(5598)
<223> TIC810

<220>
5 <221> terminador
<222> (5604)..(5813)
<223> Hsp17 de trigo

<400> 43
10 gcaatcaacc aacatatact gaatatggga aagttttctt tagcttttct aaattaagta 60

ctgattctta aacttaagtg agaactctago ctgttcaggg ggcacggcta aaggacatag 120

caocactagt ctacgcgatt gcaaaaaaga agaatgcaag cctgcaacaa gtatcgcttt 180
15 cccgaccaat ggttggttga cctcggtttg cgggtaacct caggotggac gacagaacta 240

attagccaac ttgtcaatgt ctagggtgct gttcatagcc tgcagttgac agagtacgaa 300

20 aaggacaaga tcacatggaa gctaactagt cacggogaat acatgacgac atcggcctac 360

aacgcacaac ttcttggcat aaaagcttca atttcaatgc cctatcttgg aagccctagg 420

cgccgcgcaa atgtaaaaca ttcgcttcgc ttggottggt atccaaaata gagtatggac 480
25 ctccgacaga ttggcaaccc gtgggtaatc gaaaatggct ccctctgccc ctttgtcgaa 540

ggaatcagga aacggccctc acctcctggc ggagtgtaga tatgtgaaag aatctaggcg 600

30 acacttgag actggacaac atgtgaacaa ataagaccaa cgttatggca acaagcctcg 660

acgctactca agtggtggga ggccaccgca tgttccaacg aagcgccaaa gaaagccttg 720

cagactctaa tgctattagt cgcctaggat atttggaatg aaaggaaccg cagagttttt 780
35 cagcaccaag agcttcgggt ggcctagtctg atagccaaaa ttaaggagga tgccaaaaca 840

tgggtcttgg cgggcgcgaa acaccttgat aggtggctta ccttttaaca tgttcgggac 900

40 aaagccttg agacggtaaa gttttctatt tgcgcttgcg catgtacaat tttattcctc 960

tattcaatga aattggtgga tcaactggtc attaaaaaaa aaagaatcta gctgttccg 1020

gaagaagagg attttgttcg tgagagagag agagagagag agagagagag agagagagaa 1080

ggaggaggag gattttcagg cttcgcattg cccaacctct gcttctgttg gccaagaag 1140
aatcccaggc gcccatgggc tggcagttta ccacggacct acctagccta ccttagctat 1200
5 ctaagcgggc cgacctagta gccacgtgcc tagtgtagat taaagttgcc gggccagcag 1260
gaagccacgc tgcaatggca tcttcccttg tcttcgcgt acgtgaaaac aaaccaggt 1320
aagcttagaa tcttcttgcc cgttggactg ggacaccac caatcccacc atgccccgat 1380
10 attcctcogg tctcggttca tgtgatgtcc tctcttgtgt gatcacggag caagcattct 1440
taaacggcaa aagaaaatca ccaacttgct cacgcagtca cgctgcaccg cgcgaagcga 1500
15 cgccccgatag gccaagatcg cgagataaaa taacaaccaa tgatcataag gaaacaagcc 1560
cgcgatgtgt cgtgtgcagc aatcttggtc atttgcgga tcgagtgtt cacagctaac 1620
caaattattcg gccgatgatt taacacatta tcagcgtaga tgtacgtacg atttgttaat 1680
20 taatctacga gccttgctag ggcagggtgt ctgccagcca atccagatcg cctcgtatg 1740
cacgctcaca tgatggcagg gcagggttca catgagctct aacggtcgat taattaatcc 1800
25 cggggctoga ctataaatac ctccctaata ccatgatcaa aaccatctca agcagcctaa 1860
tcattctccag ctgatcaaga gctcttaatt agctagctag tgattagctg cgcttgtgat 1920
cgatcgatct cggttacgta gcaatagatc taccgtcttc ggtacgcgct cactccgccc 1980
30 tctgcctttg ttactgccac gtttctctga atgctctctt gtgtggtgat tgcgtgagagt 2040
ggtttagctg gatctagaat tacactctga aatcgtgttc tgctgtgct gattacttgc 2100
35 cgtcctttgt agcagcaaaa tatagggaca tggtagtacg aaacgaagat agaacctaca 2160
cagcaatacg agaaatgtgt aatttggtgc ttagcggat ttatttaagc acatgttggt 2220
gttatagggc acttggttc agaagtttgc tgtaattta ggcacaggct tcatactaca 2280
40 tgggtcaata gtatagggat tcatattata ggcgatacta taataatttg ttcgtctgca 2340
gagcttatta tttgccaaaa ttagatattc ctattctgtt tttgtttgtg tgctgttaaa 2400

	ttgttaacgc ctgaaggaat aaatataaat gacgaaatgt tgatgtttat ctctgctcct	2460
	ttattgtgac cataagtcaa gatcagatgc acttggtttta aatattgttg totgaagaaa	2520
5	taagtactga cagtattttg atgcattgat ctgcttggtt gttgtaacaa aatttaaaaa	2580
	taaagagttt cctttttggt gctctcctta cctcctgatg gtatctagta totaccaact	2640
	gacactatat tgcttctctt tacatacgta tcttgctcga tgccttctcc ctagtgttga	2700
10	ccagtgttac tcacatagtc tttgctcatt tcattgtaat gcagatacca agcggcctct	2760
	agaggatctc c atg gcc ttc ttc aac cgg gtg atc acc ctc acg gtg ccg	2810
	Met Ala Phe Phe Asn Arg Val Ile Thr Leu Thr Val Pro	
15	1 . 5 10	
	tcg tca gac gtg gtc aac tac tcg gag atc tac cag gtg gct cct cag	2858
	Ser Ser Asp Val Val Asn Tyr Ser Glu Ile Tyr Gln Val Ala Pro Gln	
	15 20 25	
20	tat gtc aac cag gcc ctg acc ctg gcc aag tac ttc cag ggc gcc atc	2906
	Tyr Val Asn Gln Ala Leu Thr Leu Ala Lys Tyr Phe Gln Gly Ala Ile	
	30 35 40 45	
25	gac ggc agc acc ctg agg ttc gac ttc gag aag gcg tta cag atc gcc	2954
	Asp Gly Ser Thr Leu Arg Phe Asp Phe Glu Lys Ala Leu Gln Ile Ala	
	50 55 60	
	aac gac atc ccg cag gcc gcg gtg gtc aac acc ctg aac cag acc gtc	3002
30	Asn Asp Ile Pro Gln Ala Ala Val Val Asn Thr Leu Asn Gln Thr Val	
	65 70 75	
	cag cag ggg acc gtc cag gtc agc gtc atg atc gac aag atc gtg gac	3050
	Gln Gln Gly Thr Val Gln Val Ser Val Met Ile Asp Lys Ile Val Asp	
35	80 85 90	
	atc atg aag aat gtc ctg tcc atc gtg ata gac aac aag aag ttt tgg	3098
	Ile Met Lys Asn Val Leu Ser Ile Val Ile Asp Asn Lys Lys Phe Trp	
	95 100 105	
40	gat cag gtc acg gct gcc atc acc aac acc ttc acg aac ctg aac agc	3146
	Asp Gln Val Thr Ala Ala Ile Thr Asn Thr Phe Thr Asn Leu Asn Ser	
	110 115 120 125	

	cag gag tcg gag gcc tgg atc ttc tat tac aag gag gac gcc cac aag	3194
	Gln Glu Ser Glu Ala Trp Ile Phe Tyr Tyr Lys Glu Asp Ala His Lys	
	130 135 140	
5	acg tcc tac tat tac aac atc ctc ttc gcc atc cag gac gaa gag acg	3242
	Thr Ser Tyr Tyr Tyr Asn Ile Leu Phe Ala Ile Gln Asp Glu Glu Thr	
	145 150 155	
	ggg ggc gtg atg gcc acg ctg ccc atc gcc ttc gac atc agt gtg gac	3290
10	Gly Gly Val Met Ala Thr Leu Pro Ile Ala Phe Asp Ile Ser Val Asp	
	160 165 170	
	atc gag aag gag aag gtc ctg ttc gtg acc atc aag gac act gag aat	3338
	Ile Glu Lys Glu Lys Val Leu Phe Val Thr Ile Lys Asp Thr Glu Asn	
15	175 180 185	
	tac gcc gtc acc gtc aag gcg atc aac gtg gtc cag gca ctc cag tct	3386
	Tyr Ala Val Thr Val Lys Ala Ile Asn Val Val Gln Ala Leu Gln Ser	
	190 195 200 205	
20	agc agg gat tct aag gtg gtt gat gcg ttc aaa tcg cca cgg cac tta	3434
	Ser Arg Asp Ser Lys Val Val Asp Ala Phe Lys Ser Pro Arg His Leu	
	210 215 220	
25	ccc cgg aag agg cat aag att tgc tct aac tcg tga tga attctgcatg	3483
	Pro Arg Lys Arg His Lys Ile Cys Ser Asn Ser	
	225 230	
	cgtttggacg tatgtcatt caggttgag ccaatttggg tgatgtgtgt gcgagttctt	3543
30	gcgagttctga tgagacatct ctgtattgtg tttctttccc cagtgttttc tgtacttgtg	3603
	taatcggcta atcgccaaca gattcggcga tgaataaatg agaaataaat tgttctgatt	3663
35	ttgagtgcaa aaaaaaagga attagatctg tgtgtgtttt ttggatcccc agcttctgca	3723
	ggtcgatgt gagacttttc aacaaagggt aatatccgga aacctctctg gattccattg	3783
	cccagctatc tgtcacttta ttgtgaagat agtggaaaag gaagggtggct cctacaaatg	3843
40	ccatcattgc gataaaggaa aggccatcgt tgaagatgcc tctgccgaca gtgggtcccaa	3903
	agatggaccc ccacccacga ggagcatcgt ggaaaaagaa gacgttccaa ccacgtcttc	3963

	aaagcaagtg gattgatgtg atggtccgat gtgagacttt tcaacaaagg gtaatatccg	4023
	gaaacctcct cggattccat tgcccagcta tctgtcactt tattgtgaag atagtggaaa	4083
5	aggaaggtgg ctctacaaa tgccatcatt gcgataaagg aaaggccatc gttgaagatg	4143
	cctctgccga cagtgggtccc aaagatggac cccacccac gaggagcatc gtggaaaaag	4203
	aagacgttcc aaccacgtct tcaaagcaag tggattgatg tgatatctcc actgacgtaa	4263
10	gggatgacgc acaatcccac tatccttcgc aagacccttc ctctatataa ggaagttcat	4323
	ttcatttgga gaggacacgc tgacaagctg actctagcag atcctctaga accatcttcc	4383
15	acacactcaa gccacactat tggagaacac acagggacaa cacaccataa gatccaaggg	4443
	aggcctccgc cgccgccggt aaccaccccg cccctctcct ctttctttct ccgttttttt	4503
	ttccgtctcg gtctcgatct ttggccttgg tagtttgggt gggcgagagg cggcttcgtg	4563
20	cgcgcccaga tcggtgcgcg ggaggggcg gatctcgcg ctggggctct cgccggcgtg	4623
	gatccggccc ggatctcgcg gggaatggg ctctcggatg tagatctgcg atccgccgtt	4683
25	gttgggggag atgatggggg gtttaaaatt tccgccgtgc taaacaagat caggaagagg	4743
	ggaaaagggc actatggttt atatttttat atatttctgc tgcttcgtca ggcttagatg	4803
	tgctagatct ttctttcttc tttttgtgg tagaatttga atccctcagc attgttcac	4863
30	ggtagttttt cttttcatga tttgtgacaa atgcagcctc gtgcggagct tttttgtagg	4923
	tagaagtgat caacc atg agc aaa gaa atc agg ctc aac ctt tct cgt gag	4974
35	Met Ser Lys Glu Ile Arg Leu Asn Leu Ser Arg Glu	
	235 240	
	agc ggc gcc gac ctg tac ctc aag atc ctc gcc ttc gtg aag ccc gag	5022
	Ser Gly Ala Asp Leu Tyr Leu Lys Ile Leu Ala Phe Val Lys Pro Glu	
	245 250 255 260	
40	cac ttc ttt cag gcg tac ctc ctg tgc cgc gag ttc gag agc atc gtg	5070
	His Phe Phe Gln Ala Tyr Leu Leu Cys Arg Glu Phe Glu Ser Ile Val	
	265 270 275	

		gat cct aca acc cgc gag tct gac ttc gac aag acg ctg acc atc gtg	5118
		Asp Pro Thr Thr Arg Glu Ser Asp Phe Asp Lys Thr Leu Thr Ile Val	
		280 285 290	
5		aag tcg gac tcc acc ctc gtg acc gtg ggc acg atg aac acc aag ctg	5166
		Lys Ser Asp Ser Thr Leu Val Thr Val Gly Thr Met Asn Thr Lys Leu	
		295 300 305	
10		gtc aat agc caa gag atc ctc gtg tcg gac ttg atc act caa gtc ggt	5214
		Val Asn Ser Gln Glu Ile Leu Val Ser Asp Leu Ile Thr Gln Val Gly	
		310 315 320	
15		tcc cag atc gcc gat acc ctc ggc atc acg gac atc gac gcc aac acc	5262
		Ser Gln Ile Ala Asp Thr Leu Gly Ile Thr Asp Ile Asp Ala Asn Thr	
		325 330 335 340	
20		cag caa cag ctc acg gag ctg atc ggc aac ctc ttc gtg aac ctc aat	5310
		Gln Gln Gln Leu Thr Glu Leu Ile Gly Asn Leu Phe Val Asn Leu Asn	
		345 350 355	
		tcc caa gtt cag gag tac atc tac ttc tac gag gag aag gag aag cag	5358
		Ser Gln Val Gln Glu Tyr Ile Tyr Phe Tyr Glu Glu Lys Glu Lys Gln	
		360 365 370	
25		acc tcc tac cgc tac aac atc ctc ttc gtg ttc gaa aag gag tcg ttc	5406
		Thr Ser Tyr Arg Tyr Asn Ile Leu Phe Val Phe Glu Lys Glu Ser Phe	
		375 380 385	
30		atc acc att ctg cca atg ggc ttc gac gtg acc gtg aac acg aac aag	5454
		Ile Thr Ile Leu Pro Met Gly Phe Asp Val Thr Val Asn Thr Asn Lys	
		390 395 400	
35		gag gcc gtc ctg aag ctg acc ccg aag gac aag gtt acc tac ggc cac	5502
		Glu Ala Val Leu Lys Leu Thr Pro Lys Asp Lys Val Thr Tyr Gly His	
		405 410 415 420	
40		gtc agc gtc aag gcc ctc aac atc atc cag ctc att acg gag gac aag	5550
		Val Ser Val Lys Ala Leu Asn Ile Ile Gln Leu Ile Thr Glu Asp Lys	
		425 430 435	
		ttc aac ttc ctc gca acc ctc aag aag gct ctc aag acc ctg tga tga	5598
		Phe Asn Phe Leu Ala Thr Leu Lys Lys Ala Leu Lys Thr Leu	
		440 445 450	

gaattctgca tgcgtttgga cgtatgctca ttcagggttg agccaatttg gttgatgtgt 5658

gtgcgagttc ttgcgagtct gatgagacat ctctgtattg tgtttctttc cccagtgttt 5718

5 tctgtacttg tgtaatcggc taatcgccaa cagattcggc gatgaataaa tgagaaataa 5778

attgttctga ttttgagtgc aaaaaaaaaag gaatt 5813

10 <210> 44
<211> 232
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Construcción sintética

<400> 44

20 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
25 20 25 30

Gln Ala Leu Thr Leu Ala Lys Tyr Phe Gln Gly Ala Ile Asp Gly Ser
35 40 45

30

Thr Leu Arg Phe Asp Phe Glu Lys Ala Leu Gln Ile Ala Asn Asp Ile
50 55 60

35

Pro Gln Ala Ala Val Val Asn Thr Leu Asn Gln Thr Val Gln Gln Gly
65 70 75 80

40 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		
5	115	120	125
	Glu Ala Trp Ile Phe Tyr Tyr Lys Glu Asp Ala His Lys Thr Ser Tyr		
10	130	135	140
	Tyr Tyr Asn Ile Leu Phe Ala Ile Gln Asp Glu Glu Thr Gly Gly Val		
	145	150	155 160
15	Met Ala Thr Leu Pro Ile Ala Phe Asp Ile Ser Val Asp Ile Glu Lys		
	165	170	175
20	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		
25	195	200	205
	Ser Lys Val Val Asp Ala Phe Lys Ser Pro Arg His Leu Pro Arg Lys		
30	210	215	220
	Arg His Lys Ile Cys Ser Asn Ser		
	225	230	
35	<210> 45		
	<211> 218		
	<212> PRT		
	<213> Secuencia artificial		
40	<220>		
	<223> Construcción sintética		
	<400> 45		

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

5 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
10 210 215

<210> 46
<211> 1413
15 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
20 <221> CDS
<222> (1)..(1407)
<223> TIC127

<220>
25 <223> Construcción sintética

<220>
<223> (1)..(696)
<223> secuencia de aminoácidos TIC809
30

<220>
<223> (697)..(753)
<223> espaciador susceptible a proteólisis o secuencia de aminoácidos
conectora
35

<220>
<223> (754)..(1407)
<223> secuencia de aminoácidos TIC810

40 <400> 46
atg gcc ttc ttc aac cgg gtg atc acc ctc acg gtg ccg tcg tca gac 48
Met Ala Phe Phe Asn Arg Val Ile Thr Leu Thr Val Pro Ser Ser Asp
1 5 10 15

	gtg gtc aac tac tcg gag atc tac cag gtg gct cct cag tat gtc aac	96
	Val Val Asn Tyr Ser Glu Ile Tyr Gln Val Ala Pro Gln Tyr Val Asn	
	20 25 30	
5	cag gcc ctg acc ctg gcc aag tac ttc cag ggc gcc atc gac ggc agc	144
	Gln Ala Leu Thr Leu Ala Lys Tyr Phe Gln Gly Ala Ile Asp Gly Ser	
	35 40 45	
	acc ctg agg ttc gac ttc gag aag gcg tta cag atc gcc aac gac atc	192
10	Thr Leu Arg Phe Asp Phe Glu Lys Ala Leu Gln Ile Ala Asn Asp Ile	
	50 55 60	
	ccg cag gcc gcg gtg gtc aac acc ctg aac cag acc gtc cag cag ggc	240
	Pro Gln Ala Ala Val Val Asn Thr Leu Asn Gln Thr Val Gln Gln Gly	
15	65 70 75 80	
	acc gtc cag gtc agc gtc atg atc gac aag atc gtg gac atc atg aag	288
	Thr Val Gln Val Ser Val Met Ile Asp Lys Ile Val Asp Ile Met Lys	
	85 90 95	
20	aat gtc ctg tcc atc gtg ata gac aac aag aag ttt tgg gat cag gtc	336
	Asn Val Leu Ser Ile Val Ile Asp Asn Lys Lys Phe Trp Asp Gln Val	
	100 105 110	
25	acg gct gcc atc acc aac acc ttc acg aac ctg aac agc cag gag tcg	384
	Thr Ala Ala Ile Thr Asn Thr Phe Thr Asn Leu Asn Ser Gln Glu Ser	
	115 120 125	
	gag gcc tgg atc ttc tat tac aag gag gac gcc cac aag acg tcc tac	432
30	Glu Ala Trp Ile Phe Tyr Tyr Lys Glu Asp Ala His Lys Thr Ser Tyr	
	130 135 140	
	tat tac aac atc ctc ttc gcc atc cag gac gaa gag acg ggt ggc gtg	480
	Tyr Tyr Asn Ile Leu Phe Ala Ile Gln Asp Glu Glu Thr Gly Gly Val	
35	145 150 155 160	
	atg gcc acg ctg ccc atc gcc ttc gac atc agt gtg gac atc gag aag	528
	Met Ala Thr Leu Pro Ile Ala Phe Asp Ile Ser Val Asp Ile Glu Lys	
	165 170 175	
40	gag aag gtc ctg ttc gtg acc atc aag gac act gag aat tac gcc gtc	576
	Glu Lys Val Leu Phe Val Thr Ile Lys Asp Thr Glu Asn Tyr Ala Val	
	180 185 190	

	acc gtc aag gcg atc aac gtg gtc cag gca ctc cag tct agc agg gat	624
	Thr Val Lys Ala Ile Asn Val Val Gln Ala Leu Gln Ser Ser Arg Asp	
	195 200 205	
5	tct aag gtg gtt gat gcg ttc aaa tcg cca cgg cac tta ccc cgg aag	672
	Ser Lys Val Val Asp Ala Phe Lys Ser Pro Arg His Leu Pro Arg Lys	
	210 215 220	
	agg cat aag att tgc tct aac tcg aag ccc gcc ctg ctc aag gag gct	720
10	Arg His Lys Ile Cys Ser Asn Ser Lys Pro Ala Leu Leu Lys Glu Ala	
	225 230 235 240	
	ccc cgc gcc gag gag gag ctg cct ccc cgc aag atg agc aaa gaa atc	768
15	Pro Arg Ala Glu Glu Glu Leu Pro Pro Arg Lys Met Ser Lys Glu Ile	
	245 250 255	
	agg ctc aac ctt tct cgt gag agc ggc gcc gac ctg tac ctc aag atc	816
	Arg Leu Asn Leu Ser Arg Glu Ser Gly Ala Asp Leu Tyr Leu Lys Ile	
	260 265 270	
20	ctc gcc ttc gtg aag ccc gag cac ttc ttt cag gcg tac ctc ctg tgc	864
	Leu Ala Phe Val Lys Pro Glu His Phe Phe Gln Ala Tyr Leu Leu Cys	
	275 280 285	
25	cgc gag ttc gag agc atc gtg gat cct aca acc cgc gag tct gac ttc	912
	Arg Glu Phe Glu Ser Ile Val Asp Pro Thr Thr Arg Glu Ser Asp Phe	
	290 295 300	
	gac aag acg ctg acc atc gtg aag tcg gac tcc acc ctc gtg acc gtg	960
30	Asp Lys Thr Leu Thr Ile Val Lys Ser Asp Ser Thr Leu Val Thr Val	
	305 310 315 320	
	ggc acg atg aac acc aag ctg gtc aat agc caa gag atc ctc gtg tcg	1008
35	Gly Thr Met Asn Thr Lys Leu Val Asn Ser Gln Glu Ile Leu Val Ser	
	325 330 335	
	gac ttg atc act caa gtc ggt tcc cag atc gcc gat acc ctc ggc atc	1056
	Asp Leu Ile Thr Gln Val Gly Ser Gln Ile Ala Asp Thr Leu Gly Ile	
	340 345 350	
40	acg gac atc gac gcc aac acc cag caa cag ctc acg gag ctg atc ggc	1104
	Thr Asp Ile Asp Ala Asn Thr Gln Gln Gln Leu Thr Glu Leu Ile Gly	
	355 360 365	

	aac ctc ttc gtg aac ctc aat tcc caa gtt cag gag tac atc tac ttc	1152
	Asn Leu Phe Val Asn Leu Asn Ser Gln Val Gln Glu Tyr Ile Tyr Phe	
	370 375 380	
5	tac gag gag aag gag aag cag acc tcc tac cgc tac aac atc ctc ttc	1200
	Tyr Glu Glu Lys Glu Lys Gln Thr Ser Tyr Arg Tyr Asn Ile Leu Phe	
	385 390 395 400	
	gtg ttc gaa aag gag tcc ttc atc acc att ctg cca atg ggc ttc gac	1248
10	Val Phe Glu Lys Glu Ser Phe Ile Thr Ile Leu Pro Met Gly Phe Asp	
	405 410 415	
	gtg acc gtg aac acg aac aag gag gcc gtc ctg aag ctg acc ccg aag	1296
	Val Thr Val Asn Thr Asn Lys Glu Ala Val Leu Lys Leu Thr Pro Lys	
15	420 425 430	
	gac aag gtt acc tac ggc cac gtc agc gtc aag gcc ctc aac atc atc	1344
	Asp Lys Val Thr Tyr Gly His Val Ser Val Lys Ala Leu Asn Ile Ile	
	435 440 445	
20	cag ctc att acg gag gac aag ttc aac ttc ctc gca acc ctc aag aag	1392
	Gln Leu Ile Thr Glu Asp Lys Phe Asn Phe Leu Ala Thr Leu Lys Lys	
	450 455 460	
25	gct ctc aag acc ctg tgatga	1413
	Ala Leu Lys Thr Leu	
	465	
30	<210> 47	
	<211> 469	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
35	<400> 47	
	Met Ala Phe Phe Asn Arg Val Ile Thr Leu Thr Val Pro Ser Ser Asp	
	1 5 10 15	
40	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

5 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
 10 65 70 75 80

Thr Val Gln Val Ser Val Met Ile Asp Lys Ile Val Asp Ile Met Lys
 85 90 95

15 Asn Val Leu Ser Ile Val Ile Asp Asn Lys Lys Phe Trp Asp Gln Val
 100 105 110

20 Thr Ala Ala Ile Thr Asn Thr Phe Thr Asn Leu Asn Ser Gln Glu Ser
 115 120 125

25 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
 30 145 150 155 160

Met Ala Thr Leu Pro Ile Ala Phe Asp Ile Ser Val Asp Ile Glu Lys
 165 170 175

35 Glu Lys Val Leu Phe Val Thr Ile Lys Asp Thr Glu Asn Tyr Ala Val
 180 185 190

40 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				
5	Arg	His	Lys	Ile	Cys	Ser	Asn	Ser	Lys	Pro	Ala	Leu	Leu	Lys	Glu	Ala	
	225					230				235					240		
10	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			
15																	
	Leu	Ala	Phe	Val	Lys	Pro	Glu	His	Phe	Phe	Gln	Ala	Tyr	Leu	Leu	Cys	
				275					280					285			
20																	
	Arg	Glu	Phe	Glu	Ser	Ile	Val	Asp	Pro	Thr	Thr	Arg	Glu	Ser	Asp	Phe	
		290						295					300				
25	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	
30					325					330					335		
	Asp	Leu	Ile	Thr	Gln	Val	Gly	Ser	Gln	Ile	Ala	Asp	Thr	Leu	Gly	Ile	
				340					345					350			
35																	
	Thr	Asp	Ile	Asp	Ala	Asn	Thr	Gln	Gln	Gln	Leu	Thr	Glu	Leu	Ile	Gly	
		355						360					365				
40	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

5 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
10				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

20
Ala Leu Lys Thr Leu
465

COMPOSICIONES INSECTICIDAS Y MÉTODOS PARA CREAR PLANTAS TRANSGÉNICAS RESISTENTES A INSECTOS

RESUMEN

En la presente invención se proveen secuencias de polinucleótidos aisladas que
5 codifican proteínas ET37, TIC810 y TIC812 de *Bacillus thuringiensis*, y secuencias
de nucleótidos para usar en la expresión de TIC809, ET37, TIC810 y TIC812, y
fusiones de diversas combinaciones de estas proteínas efectivas como
insecticidas, tales como TIC127, en plantas. Se describen métodos para preparar
y usar las secuencias de polinucleótidos y las proteínas en el desarrollo de células
10 vegetales transgénicas y plantas transgénicas que presentan resistencia mejorada
a insectos contra (1) insectos coleópteros, incluyendo la oruga de la raíz del maíz
occidental (*Dibrotica virgifera*), la oruga de la raíz del maíz del sur (*Dibrotica
undecempunctata*), la oruga de la raíz del maíz del norte (*Diabrotica barberi*), la
oruga de la raíz del maíz mexicana (*Diabrotica virgifera zea*), la oruga de la raíz
15 del maíz del Brasil (*Diabrotica balteata*) y el complejo de la oruga de la raíz del
maíz del Brasil (*Diabrotica viridula* y *Diabrotica speciosa*), y contra insectos
hemípteros, tales como las chinches *Lygus*.

(21) N° de solicitud: 22) Fecha de solicitud: (30) Prioridad (31) N° Prioridad (32) Fecha (33) País 60/713.111 31/08/2005 US	(51) int. Cl.: (71) Solicitante(s) MONSANTO TECHNOLOGY, LLC (72) Inventor(es) HEATHER M. ANDERSON JAMES A. BAUM CATHERINE A. CHAY JAMES K. ROBERTS BEI ZHANG (74) Apoderado: MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO
(85) Fecha limite inicio fase nacional: (86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha de presentación de la solicitud: 30/08/2006 N° de solicitud PCT/US2006/033867	(87) Publicación internacional Fecha: 08/03/2007 N° publicación: WO 2007/027776 A2
(54) Título: COMPOSICIONES INSECTICIDAS Y METODOS PARA CREAR PLANTAS TRANSGENICAS RESISTENTES A INSECTOS	

Reivindicación(es):

1. Una secuencia de nucleótidos aislada y purificada que codifica una proteína insecticida, donde dicha proteína se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 12 y SEQ ID N° 47.
2. La secuencia de nucleótidos aislada y purificada de la reivindicación 1, que se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 9, SEQ ID N° 11 y SEQ ID N° 46.
3. Una proteína insecticida aislada y purificada que se selecciona del grupo que consiste en una ET29, una ET37, una TIC810, una TIC812, una TIC809 y una TIC127.
4. Una célula vegetal transformada con una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína insecticida, donde dicha proteína se selecciona del grupo que consiste en una ET29, una ET37, una TIC810, una TIC812, una TIC809 y una TIC127.
5. Progenie de la planta de la reivindicación 4, donde dicha progenie comprende dicha secuencia de nucleótidos.
6. Un vector que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína seleccionada del grupo que consiste en ET29, ET37, TIC810, TIC812, TIC809 y TIC127.
7. Un método para mejorar la acumulación de una primera proteína insecticida en una célula huésped, donde dicho método comprende expresar de forma contemporánea dicha primera proteína seleccionada del grupo que consiste en ET29, TIC809 y ET37, con una segunda proteína insecticida seleccionada del grupo que consiste en TIC810 y TIC812, donde dicha expresión contemporánea mejora la acumulación de la primera proteína, en comparación con la acumulación de dicha primera proteína, expresada en ausencia de dicha segunda proteína.
8. Una composición que presenta actividad insecticida, que comprende una primera proteína seleccionada del grupo que consiste en ET29, ET37 y TIC809, y una segunda proteína seleccionada del grupo que consiste en TIC810 y TIC812.
9. La composición de la reivindicación 8, donde dicha primera proteína es TIC809 y dicha segunda proteína es TIC810.
10. La composición de la reivindicación 8 donde la relación entre dicha primera proteína y dicha segunda proteína es de entre aproximadamente 1:1 y aproximadamente 2:1.
11. La composición de la reivindicación 8, proporcionada en la dieta de un coleóptero o un hemíptero que es plaga de plantas, en una formulación aceptable para el uso agrícola.
12. La composición de la reivindicación 11, donde dicha formulación consiste en ambas proteínas expresadas en una célula vegetal.
13. La composición de la reivindicación 11, donde dicho coleóptero plaga es una oruga de la raíz, y dicho hemíptero plaga es una chinche *Lygus*.
14. Un producto comercial que comprende una cantidad detectable de una primera proteína seleccionada del grupo que consiste en ET29, ET37 y TIC809, y una cantidad detectable de una segunda proteína seleccionada del grupo que consiste en TIC810 y TIC812.
15. Un producto comercial que comprende una cantidad detectable de (1) una primera secuencia de nucleótidos que codifica una primera proteína seleccionada del grupo que consiste en ET29, ET37 y TIC809, y una segunda secuencia de nucleótidos que codifica una segunda proteína seleccionada del grupo que consiste en TIC810 y TIC812; (2) una primera proteína seleccionada del grupo que consiste en ET29, ET37 y TIC809, y una segunda proteína seleccionada del grupo que consiste en TIC810 y TIC812; (3) ambos (1) y (2); o (4) cualquier combinación de (1) y (2).
16. El producto comercial de cualquiera de las reivindicaciones 14-15, seleccionado del grupo que consiste en semillas de algodón, aceite de semilla de algodón, alimentos a base de semillas de algodón, semillas de soja, aceite de soja, alimentos a base de soja, harina de soja, bienes sólidos secos obtenidos por destilación, semillas de maíz, harina de maíz, alimentos a base de maíz, jarabe de maíz, aceite de maíz, almidón de maíz, y cereales manufacturados por completo o en parte, que contienen soja y/o subproductos de soja.
17. Un método para preparar una célula vegetal resistente a coleópteros y hemípteros plaga, que comprende transformar dicha célula vegetal para que exprese una cantidad efectiva como insecticida de una composición de toxinas, donde dicha composición de toxinas comprende una primera proteína seleccionada del grupo que consiste en ET29, ET37 y TIC809, y una segunda proteína seleccionada del grupo que consiste en TIC810 y TIC812.
18. El método de la reivindicación 17, donde dicha célula vegetal se regenera en una planta transgénica fértil.
19. El método de la reivindicación 17, donde dicha célula vegetal se selecciona del grupo que consiste en una célula de una planta monocotiledónea y una célula de una planta dicotiledónea.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-019691- -00000-0000

Fecha: 2008-02-26 14:49:19 Dep. 2020 NUECREACIONE

Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALI

Act. 411 PRESENTACION Folios: 279

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACION Y AGILIZACION
DEL TRÁMITE

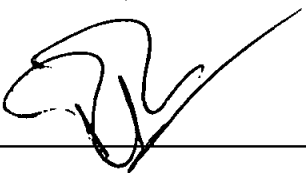
	USUARIO	RADICADOR
PATENTE DE INVENCION (X) MODELO DE UTILIDAD ()	(X)	() ✓
- Indicación de que se solicita la concesión de una patente	(X)	() ✓
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud	(X)	() ✓
- Descripción de la invención	(X)	() ✓
- Dibujos de ser estos pertinentes	()	() ✓
- Comprobante de pago de las tasas establecidas	(X)	() ✓
COMPLETA (X) INCOMPLETA ()		

DISEÑO INDUSTRIAL ()

- Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial	()	()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud	()	()
- Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño	()	()
- Comprobante de pago de las tasas establecidas	()	()
COMPLETA () INCOMPLETA ()		

EZQUEMA DE TRAZADO ()

- Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial	()	()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud	()	()
- Representación gráfica del Esquema de Trazado	()	()
- Comprobante de pago de las tasas establecidas	()	()
COMPLETA () INCOMPLETA ()		

Firma responsable:  _____

Fecha: _____

28

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
CASTELLANOS ABONDANO MARGARITA
Apoderado(a) y/o Representante de
MONSANTO TECHNOLOGY LLC

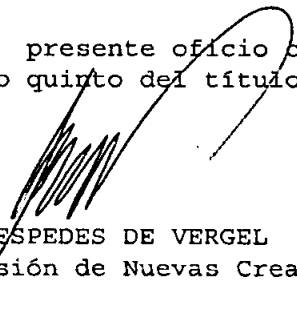
REFERENCIA	Radicación No.	8 19691
	Solicitud internacional	PCT/US2006/033867
	Fecha inicio fase nacional	31/03/2008
	Trámite	11
	Evento	379
	Actuación	430
	Oficio No.	6269

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene la traducción de los anexos del reporte de examen preliminar internacional (Art. 36.2.b) del tratado PCT.
2. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante. (Art. 26-k) Decisión 486.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No.10 de 2001.


ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de
fecha 16 MAYO 2008
jfernand

/103



AVISO DE NOTIFICACION
CORREO CERTIFICADO



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Radicación : 8-19691- -5-0 Fecha: 2010-03-24 10:05:47
Trámite : 11 PATENTEIYII
Evento : 379 FASENACIONALII
Actuación : 432 COMUNICACTOADM
Destinatario : CASTELLANOS ABONDANO MARGARITA Folios

Señor (a) (es)
CASTELLANOS ABONDANO MARGARITA
Calle 94 A No 7A- 09
BOGOTA D.C.

Referencia RESOLUCION : 15628
Fecha : 23/03/2010
Expediente : 8-19691
Trámite : 11 PCT-PATENTE DE INVENCION CAPITULOS I Y II
Evento : 379 FASE NACIONAL INCLUIDO CAPITULO II
Actuación : 432 COMUNICACION ACTO ADMINISTRATIVO

Comendidamente le solicito presentarse a este Despacho ubicado en la Carrera 13 No. 27 - 00 Piso Quinto (5), de la ciudad de Bogotá D.C., dentro del término de cinco (5) días hábiles contados a partir del envío de la presente citación, en horario de 8:00 a.m. a 4:30 p.m. jornada continua, con el fin de notificarle personalmente el contenido de la resolución de la referencia proferida dentro del expediente tramitado con el número de radicación citado en el asunto.

De no hacerse presente en el término indicado anteriormente, la providencia en mención se notificará por edicto, el cual se fijará por el término de diez (10) días en el Centro de Documentación e Información.

Para su comodidad el texto completo de la resolución se encontrará disponible en la página web de la Entidad desde el día hábil siguiente al de su notificación, la cual podrá ser consultada desde un computador con acceso a Internet, en la página www.sic.gov.co, con el número de resolución a través de la opción servicios en línea bases de datos - otros servicios - consulta actos administrativos.

En caso de que se haya notificado, haga caso omiso de este aviso.

Secretaría General

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Al contestar favor indique el número de radicación consignado en el sticker

Sede Centro: Carrera 13 No. 27-00 pisos 2, 5, 7 y 10 PBX: 5870000
Sede CAN: Av. Carrera 50 No. 26- 55 int. 2 Tel 5880070
Call Center 6513240 . Línea 01800-910165
Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co
Bogotá D.C. Colombia

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

RESOLUCION¹ 15628

Por la cual se declara abandonada una solicitud

Rad. PCT/08-19691

EL SUPERINTENDENTE DE INDUSTRIA Y COMERCIO

en ejercicio de sus facultades legales, en especial de las que se confirieron en el artículo 3, numeral 30 del decreto 3523 de 2009, y

CONSIDERANDO:

PRIMERO: Que la solicitud de patente de invención titulada "COMPOSICIONES INSECTICIDAS Y METODOS PARA CREAR PLANTAS TRANSGENICAS RESISTENTES A INSECTOS", que corresponde a la solicitud internacional PCT/US 2006/033867 de fecha 30 de agosto del 2006, fue radicada en esta Superintendencia el 26 de febrero del 2008 bajo el número 08-019691-00000-0000, para que se iniciara la fase nacional en virtud del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT).

SEGUNDO: Que el extracto de esta solicitud fue publicado en la Gaceta de la Propiedad Industrial N° 607 del 31 de agosto del 2009.

TERCERO: Que el artículo 44 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, establece que: *"Dentro del plazo de seis meses contados desde la publicación de la solicitud, independientemente que se hubieren presentado oposiciones, el solicitante deberá pedir que se examine si la invención es patentable. Los Países Miembros podrán cobrar una tasa para la realización de este examen. Si transcurriera dicho plazo sin que el solicitante hubiera pedido que se realice el examen, la solicitud caerá en abandono"*.

CUARTO: Que contados seis meses desde la publicación en la Gaceta de la Propiedad Industrial, no se presentó petición de parte del interesado para efectuar el examen de fondo, razón por la cual se considera abandonada la solicitud en los términos del mencionado artículo 44.

RESUELVE:

ARTICULO PRIMERO: Declarar abandonada la solicitud de privilegio de patente de invención que entró en fase nacional en virtud del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), de acuerdo con las razones expuestas en la parte considerativa de la presente resolución.

15628

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

RESOLUCION 15628

Por la cual se declara abandonada una solicitud

Rad. PCT/08-19691

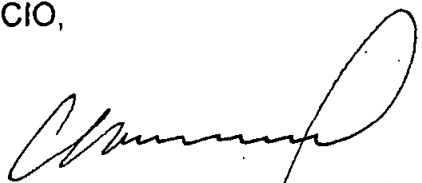
ARTICULO SEGUNDO: Notificar personalmente el contenido de la presente resolución a la doctora Margarita Castellanos Abondano, en su calidad de apoderada de Monsanto Technology, Llc., o a quien haga sus veces, entregándole copia de la misma, advirtiéndole que contra ella procede el recurso de reposición interpuesto ante el Superintendente de Industria y Comercio, al momento de la notificación o dentro de los 5 días hábiles siguientes a ella.

NOTIFÍQUESE Y CUMPLASE

Dada en Bogotá, D.C., a los

23 MAR. 2010

EL SUPERINTENDENTE DE INDUSTRIA Y COMERCIO,


GUSTAVO VALBUENA QUIÑONES

Doctora
MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO
Calle 94 A N° 7 A – 09.
Bogotá D.C.

202021