

1 Prezenta invenție se referă la o metodă pentru combaterea dăunătorilor în stadiul de omizi.

3 Insectele și alți dăunători îi costă pe fermieri miliarde de dolari anual, ca urmare a pierderilor de recolte și a cheltuielilor pentru menținerea acestor dăunători sub control. Pierderile cauzate de dăunătorii insecte în mediile de producție agricolă includ scăderea producției agricole și reducerea calității recoltelor. Costurile ridicate de recoltare sunt de asemenea un rezultat al infestării cu insecte.

9 Problemele legate de insecte au fost abordate parțial prin metode de cultivare, cum ar fi rotația culturilor, și prin fertilizarea cu niveluri ridicate de fosfat pentru a stimula creșterea unui sistem puternic de rădăcini la plante. Totuși, rotația culturilor poate fi întreruptă, de exemplu, de o trăsătură care apare la doi ani, diapauza (sau hibernarea) omizilor de porumb *Diabrotica barberi*. Insecticidele chimice reușesc cu greu să mențină controlul dorit.

13 Pesticidele chimice s-au dovedit o metodă eficientă de control al dăunătorilor. Totuși, oamenii au început să fie preocupați de cantitatea de substanțe chimice reziduale care pot fi găsite în hrană, apa din sol și oriunde în mediu. Prin urmare, pesticidele chimice sintetice sunt cercetate din ce în ce mai mult pentru eventualele lor consecințe împotriva mediului. Anumite pesticide chimice sintetice pot otrăvi solul și pânzele freatice, pot polua suprafața apelor ca urmare a deversărilor și pot distruge forme de viață care nu au fost vizate. Anumiți agenți de control chimici sintetici au dezavantajul suplimentar de a prezenta pericole pentru siguranța publică atunci când sunt aplicate în zone în care animale de casă, animale de fermă sau copii vin în contact cu ele. Acestea pot de asemenea să prezinte pericole pentru sănătate celor care le aplică, în special dacă nu sunt urmate tehnicile adecvate de aplicare. Agențiile de reglementare din întreaga lume limitează și/sau interzic utilizarea multor pesticide sintetice, în particular pe acelea care sunt persistente în mediu și intră în lanțul trofic. Noi restricții severe în ceea ce privește utilizarea pesticidelor și eliminarea unora de pe piață pot limita opțiunile economice și controlul costisitor al dăunătorilor.

27 Datorită problemelor asociate cu utilizarea multor pesticide chimice sintetice, este clar nevoie să se limiteze utilizarea acestor agenți și să se identifice agenți de control alternativi. Înlocuirea pesticidelor chimice sintetice, sau a combinației acestor agenți cu pesticide biologice, poate reduce nivelurile de substanțe chimice toxice din mediu.

31 Un agent biologic cu activitate pesticidă care este utilizat din ce în ce mai mult, este microbul solului *Bacillus thuringiensis* (*B.t.*). Microbul solului *Bacillus thuringiensis* (*B.t.*) este o bacterie Gram-pozitivă producătoare de spori. Majoritatea tulpinilor de *B.t.* nu prezintă activitate pesticidă. Anumite tulpini *B.t.* produc incluziuni proteice parasporale cu activitate pesticidă. Aceste incluziuni proteice apar adesea la nivel microscopic ca niște cristale distinct formate. Forma și tipul de incluziuni cristaline pot fi utilizate pentru a caracteriza tulpinile de *B.t.*. "δ-endotoxinele" prezente în incluziunile cristaline, care în mod obișnuit au activitate pesticidă specifică, sunt diferite de exotoxinele care au un domeniu gazdă nespecific.

39 Utilizarea comercială a pesticidelor *B.t.* a fost la origine restrânsă la un domeniu îngust al dăunătorilor lepidoptere (omizi). De exemplu, preparatele din spori și cristale de *B. thuringiensis* subspecia *kurstaki* au fost utilizate mulți ani drept insecticide comerciale pentru dăunătorii lepidoptere. Mai recent, totuși, cercetătorii au descoperit pesticide *B.t.* cu specificități pentru un domeniu mult mai larg de dăunători. De exemplu, *B.t. israelensis* și *morrisoni* au fost utilizate comercial pentru a controla insecte din ordinele Diptera și respectiv Coleoptera (Gaertner, F.H. [1989] "Cellular Delivery Systems for Insecticidal Proteins: Living and Non-living Microorganisms" in *Controlled Delivery of Crop Protection Agents*, R.M. Wilkins, editura Taylor and Francis, New York și Londra, 1990, pag. 245-255.

Acum au fost identificate noi subspecii de *B.t.* și genele responsabile de proteine active de δ -endotoxine au fost izolate și secvențiate (Höfte, H., H.R. Whiteley [1989] *Microbiological Reviews* 52 (2): 242-255. Höfte și Whiteley au clasificat genele proteinei cristaline *B.t.* în patru clase majore. Clasele au fost cryI (specifice Lepidopterelor), cryII (specifice Lepidopterelor și Dipterelor), cryIII (specifice Coleopterelor) și cryIV (specifice Dipterelor). A fost prezentată descoperirea de tulpini toxice în mod specific pentru alți dăunători (Feitelson, J.S., J. Payne, L. Kim [1992] *Bio/Technology* 10:271-275. De exemplu, denumirile de CryV și CryVI au fost propuse pentru două noi grupuri de toxine active împotriva nematodelor.

Multe proteine de δ -endotoxine de *Bacillus thuringiensis* sunt compuse din două segmente funcționale. Aceste proteine "de lungime totală" sunt alcătuite dintr-o toxină centrală rezistentă la protează care corespunde aproximativ primei jumătăți (porțiunea N-terminală) a moleculei proteice. Structura tridimensională a segmentului central a unei δ -endotoxine *B.t.* CryIIIA este cunoscută și s-a propus ca toate toxinele înrudite să aibă aceeași structură globală (Li, J., J. Carroll, D.J. Ellar [1991] *Nature* 353:815-821). Ne referim adesea la a doua jumătate (porțiunea C-terminală) a moleculei ca la "segment protoxină". Se crede că segmentul protoxină participă la formarea cristalelor (Arvidson, H., P.E Dunn, S. Strand A.I Aronson [1989] *Molecular Microbiology* 3:1533:1534; Choma, C.T., W.K. Surewicz, P.R. Carey, M. Pozsgay, T. Raynor, H. Kaplan [1990] *Eur. J. Biochem.* 189:523-527). Molecula completă a toxinei de 130 kDa este de obicei procesată la segmentul de nucleu rezistent la proteaza în intestinul insectei. Segmentul protoxină poate astfel să poarte o specificitate parțială la insecte a toxinei prin limitarea accesibilității nucleului la insectă prin reducerea procesării de către proteaza a moleculei toxinei (Haider, M.Z., B.H. Knowles, D.J. Ellar [1986] *Eur. J. Biochem* 156:531-540) sau prin reducerea solubilității toxinei (Aronson, A.I., E.S. Han, W. McGaughey, D. Johnson [1991] *Appl. Environ. Microbiol.* 57:981-986).

Nomenclatorul și schema de clasificare din 1989 ale lui Höfte și Whiteley s-au bazat atât pe secvența de aminoacizi dedusă cât și pe domeniul gazdei toxinei. Acest sistem a fost adaptat să acopere 14 tipuri diferite de gene de toxine care au fost împărțite în cinci clase majore. A fost propusă o schemă de nomenclator revizuită, care se bazează doar pe identitatea aminoacizilor (Crickmore și al. [1996] Society for Invertebrate Pathology, 29th Annual Meeting, 11th International Colloquium on *Bacillus thuringiensis*, University of Cordoba, Cordoba, Spania, Septembrie 1-6, 1999, rezumat). Mnemonica "cry" a fost menținută pentru toate genele de toxine cu excepția cytA și cytB, care au rămas o clasă separată. Cifrele romane au fost schimbate cu cifre arabe în primul rang iar parantezele din rangul trei au fost eliminate. Limitele curente reprezintă aproximativ 95% (rangul trei), 75% (rangul doi) și 48% (primul rang) identitate de secvențe. Multe dintre numele originale au fost menținute, deși o parte dintre ele au fost reclasificate. A se vedea de asemenea "Revisions of the Nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* Pesticidal Crystal Proteins" N. Crickmore, D.R. Zeigler, J. Feitelson, E. Schnepf, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum și D.H. Dean. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* (1998) vol. 62:807-813; și Crickmore, Zeigler, Feitelson, Schnepf, Van Rie, Lereclus, Baum și Dean "Bacillus thuringiensis toxin nomenclature" (1999) <http://www.biols.susx.ac.uk/Home/Neil-Crickmore/Bt/index.html>. Acest sistem utilizează aplicațiile software libere CLUSTAL W și PHYLIP. Aplicația NEIGHBOR din pachetul PHYLIP utilizează un algoritm de medii aritmetice (UPGMA).

Izolarea noilor izolate de *B.t.* și a genelor de toxine ale acestora, cât și determinarea domeniului precis al activității pesticide a toxinelor, a fost un proces empiric lent. Ca rezultat al cercetării extensive și al investițiilor în resurse, au fost depuse cerei de brevete pentru noi izolate, toxine și gene de *B.t.* și pentru noi utilizări ale toxinelor și izolatelor *B.t.* cunoscute.

A se vedea pentru documentare și Feitelson și *al. supra*. Totuși, descoperirea de noi izolate *B.t.* și noi utilizări ale izolatelor și toxinelor *B.t.* rămâne un domeniu imprevizibil, empiric.

Smulevitch și *al.* ([1991] *FEBS Lett.* 293:25-26), Gleave și *al.* ([1991] *JCM* 138:55-62), și Shevelev și *al.* ([1993] *FEBS Lett.* 336:79-82) descriu caracterizarea toxinelor *Cry9* active împotriva lepidopterelor. Lambert și *al.* (Lambert, B., L. Buysse, C. Decock, S. Jansens, C. Piens, B. Saey, J. Seurinck, K. van Audenhove, J. Van Rie, A. Van Vliet, M. Peferoen [1996] *Appl. Environ. Microbiol.* 62(1):80-86) și aplicațiile PCT publicatei **WO 94/05771** și **WO 94/24264** descriu de asemenea izolate *B.t.* și toxine *Cry9C* active împotriva dăunătorilor lepidoptere.

Brevetele **US 5126133**; **5188960**; **5246852** și **5691308** dezvăluie o toxină *Cry1Fa* și o genă (81IA) din izolatul de *B.t.* PS81I. Brevetele **US 5527883**; **5508264**; **5827514** și **5840554** se referă la toxine himerice *CryIF*. **WO 99/24581** dezvăluie diverse gene *cryIF* optimizate pentru plante. Brevetul **US 5686069** dezvăluie o toxină *Cry1Fb* și o genă din izolat de *B.t.* PS91C2.

Odată cu folosirea tehnicilor de inginerie genetică, sunt în dezvoltare diverse abordări pentru livrarea toxinelor *B.t.* mediilor agricole. Clonarea și expresia unei gene de proteină cristalină de *B.t.* în *Escherichia coli* a fost descrisă în literatura publicată cu mai bine de 15 ani în urmă (Schnepf, H.E., H.R. Whiteley [1981] *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:2893-2897). Brevetul **US 4448885** și **US 4467036** dezvăluie amândouă, expresia unei proteine *B.t.* cristaline în *E. coli*. Produsele *B.t.* pe bază de ADN recombinat au fost produse și aprobate pentru utilizare, inclusiv utilizarea plantelor modificate genetic cu gene *B.t.* pentru rezistența la insecte și utilizarea celulelor microbiene, stabilizate, drept purtători de livrare a proteinelor *B.t.* S-au realizat diverse îmbunătățiri prin modificarea toxinelor *B.t.* și/sau a genelor acestora. De exemplu, brevetele **US 5380831** și **5567862** se referă la producerea de gene de proteină cristalină sintetice, cu activitate insecticidă care au o acțiune îmbunătățită în plante. Astfel, genele de endotoxine *B.t.* izolate încep să aibă valoare comercială.

Obstacolele pentru utilizarea cu succes a toxinelor *B.t.* includ dezvoltarea rezistenței la toxinele *B.t.* de către insecte. În plus, anumite insecte pot fi refractare la efectele *B.t.* Acestea din urmă includ insecte cum ar fi gărgărița capsulelor cu semințe și omizile care altă dată nu au demonstrat sensibilitate aparentă la majoritatea δ -endotoxinelor *B.t.*

Omizile trec prin mai multe stadii de larve. Deși mâncarea răsadurilor de către stadiile finale ale larvelor produce distrugerea cea mai evidentă și pierdere economică cea mai mare, hrănirea cu frunze are ca urmare de obicei pierderi în recolte cum ar fi cele de porumb. La atingerea stadiilor finale (trei către patru, de exemplu), larvele încep să taie plantele și părți din plante, în special lăstarii. Datorită deviațiilor în comportamentul de hrănire, populații care provoacă distrugerii economice pot apărea pe neașteptate cu foarte puține semnale de avertizare înainte. Omizile mari pot distruge mai mulți lăstari pe zi și o infestare masivă poate elimina recolte întregi. Obiceiul nocturn al omizilor și comportamentul de a se îngropa în sol fac problematice de asemenea detectarea și tratamentul.

Buha semănăturilor (*Agrotis ipsilon* (Hufnagel); Lepidoptera: Noctuidae) este un dăunător serios al multor culturi incluzând porumb, bumbac, culturi de varză (*Brassica*, broccoli, verze, verze chinezești) și gazon. Plante gazdă secundare includ sfeclă, *Capsicum* (ardei), năut, fasole fabacee, salată verde, lucerna, ceapă, cartofi, ridichii, rapiță de toamnă (canola), orez, soia, căpșuni, sfeclă de zahăr, tutun, roșii și arbori de pădure. În America de Nord, dăunătorii de genul *Agrotis* se hrănesc cu trifoi, porumb, tutun, cânepă, ceapă, căpșuni, mure, zmeură, lucerna, orz, fasole, varză, ovăz, mazăre, cartofi, cartofi dulci, flori de grădină, iarbă, lucerna, porumb, asparagus, struguri, aproape orice fel de frunze, plante

și multe alte culturi și plante de grădină. Alte omizi din Tribe Agrotini sunt dăunători, în particular aceia din genul *Feltia* (de exemplu *F. jaculifera* (Guenée); echivalente cu *ducens subgothica*) și *Euxoa* (de exemplu *E. tessellata* (Harris), *E. scandens* (Riley), *E. auxiliaries* (Smith), *E. detersa* (Walker), *E. tessellate* (Harris), *E. ochrogaster* (Guenée). Omizile cum ar fi *Peridroma saucia* pot fi de asemenea dăunători semnificativi. Plantele de citrice, de exemplu, pot fi de asemenea ținta atacurilor omizilor ("omida citricelor" *Xylomyges curialis* este un exemplu).

Omizile sunt de asemenea dăunători și în afara Americii de Nord și cei mai semnificativi dăunători din punct de vedere economic atacă năutul, grâul, legumele, sfecla, lucerna, porumbul, cartofii, napii, rapița, salata verde, căpșunile, hibrizii de zmeură și mure, inul, bumbacul, soia, tutunul, sfecla, varza chinezească, roșiile, vinetele, trestia de zahăr, pășunile, verzele, arahide, *Cucurbita*, napi, floarea soarelui, *Brassica*, ceapa, praz, țelina, susan, asparagus, revent, cicoare, culturi de seră și spanac. Buha semănăturilor *A. ipsilon* apare ca dăunător în afara Americii de Nord, inclusiv în America Centrală, Europa, Asia, Australia, Africa, India, Taiwan, Mexic, Egipt și Noua Zeelandă.

Principalele specii de omizi din Argentina sunt *Agrotis malefida*, *Porosagrotis gypaetiana* și *Agrotis ipsilon* (scris de asemenea și *ypsilon*). Aceste omizi atacă, de exemplu, culturile de porumb, soia și floarea soarelui. Aceste insecte pot reduce serios populația de răsaduri și, în cazurile de atacuri grave, pot distruge total parcele întregi.

Controlul culturilor pentru *A. ipsilon* cum ar fi controlul buruienilor periferice poate ajuta prevenirea infestărilor masive; totuși, asemenea metode nu sunt întotdeauna realizabile sau eficiente. Infestările sunt foarte sporadice, iar aplicarea unui insecticid anterior plantării sau la plantare nu s-a dovedit eficientă în trecut. Sunt disponibile anumite momeli pentru controlul omizilor din culturi. Pentru a proteja gazonul cum ar fi iarba vântului, s-au utilizat insecticide chimice. Utilizarea pesticidelor chimice este o preocupare particulară în zonele acoperite cu gazon (de exemplu terenuri de golf, terenuri pentru atletism, parcuri sau alte zone de recreere, peisaje profesionale și terenuri domestice) datorită contactului apropiat pe care oamenii îl au cu aceste zone. Produsele naturale (de exemplu nematode și azadiractină) au rezultate slabe în general.

Până în prezent, produsele din *Bacillus thuringiensis* pentru controlul dăunătorului buha semănăturilor nu au fost utilizate pe scară largă datorită lipsei eficienței. Comportamentele de hrănire rapidă și îngropare a omizilor au făcut ca acestea să fie dificil de controlat cu soluții curente pentru dăunători pe bază de materiale biologice. De exemplu, toxinele *Cry1A(b)* sunt în esență ineficiente împotriva omizilor.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția constă în combaterea dăunătorilor în stadiul de omizi din culturile ce pot fi afectate de aceștia.

Metoda de combatere a dăunătorilor în stadiul de omizi, conform invenției, înlătură dezavantajele menționate mai sus prin aceea că, cuprinde aducerea în contact a dăunătorului menționat cu o toxină *Cry1F*.

Într-o realizare preferată, în metoda conform invenției, toxina menționată este o toxină *Cry1Fa* sau o toxină trunchiată, toxina menționată aflându-se într-o celulă de plantă care a produs toxina menționată și în care dăunătorul menționat vine în contact cu toxina menționată prin ingerarea celulei de plantă menționată.

În alte realizări preferate, în metoda conform invenției, dăunătorul în stadiul de omidă menționat este: din genul *Agrotis*, un *Agrotis ipsilon*, un *Agrotis malefida*, din genul *Porosagrotis*, un *Porosagrotis gypaetiana*, din genul *Xylomyges*, un *Xylomyges curialis*, din Tribe Agrotini, din genul *Feltia*, un *Feltia jaculifera*, din genul *Euxoa*, un *Euxoa messoria*, un *Euxoa scandens*, un *Euxoa auxiliaries*, un *Euxoa detersa*, un *Euxoa tessellate*, un *Euxoa ochrogaster*, din genul *Peridroma*, un *Peridroma saucia*.

1 Într-o altă realizare preferată, în metoda conform invenției, planta menționată este o
2 plantă de porumb, o plantă de floarea soarelui, o plantă de soia, o plantă de rapiță de
3 toamnă, o plantă de bumbac.

4 Într-o altă realizare preferată, în metoda conform invenției, etapa de contactare este
5 precedată de etapa de plantare a seminței unei plante care cuprinde o polinucleotidă ce
6 codifică toxina menționată.

7 Prezenta invenție se referă la descoperirea surprinzătoare a faptului că proteinele
8 *Cry1F* sunt active împotriva omizilor cum ar fi cele de buha semănăturilor (*Agrotis ipsilon*).
9 Astfel, prezenta invenție furnizează metode pentru controlul acestor dăunători, metodele
10 menționate cuprinzând aducerea în contact a dăunătorilor menționați cu o cantitate de toxină
11 de *Bacillus thuringiensis* cu activitate pesticidă care cuprinde cel puțin o porțiune cu activitate
12 pesticidă a toxinei *Cry1F*. Prin urmare, folosirea proteinelor complete, trunchiate și himerice
13 *Cry1F* și genelor este inclusă în prezenta invenție. În alcătuirii preferate, toxina *Cry1F* este
14 o toxină *Cry1Fa*. Conform prezentei invenții pot fi utilizate proteinele *Cry1F* sintetice și de tip
15 natural. Astfel, utilizarea polinucleotidelor (și/sau a complementelor lor, de preferință
16 complementele lor cu lungime totală) care hibridizează cu gene *cry1F* cunoscute, de
17 preferință porțiunile care codifică toxina nucleu, sunt incluse în această invenție. În alcătuirile
18 preferate sunt utilizate polinucleotide optimizate pentru plante.

19 Prezenta invenție include utilizarea gazdelor transgenice incluzând gazde vegetale,
20 cum ar fi porumb, bumbac și floarea soarelui. Într-o alcătuire preferată, prezenta invenție se
21 referă la celule de plante transformate cu cel puțin o secvență de nucleotide a prezentei
22 invenții, cum ar fi celule de plante transformate, care exprimă proteine cu activitate pesticidă
23 în țesuturile consumate de dăunătorii vizați. Asemenea transformare a plantelor poate fi
24 realizată folosind tehnici binecunoscute specialiștilor din domeniu și, în mod obișnuit, implică
25 modificarea genei pentru a optimiza expresia toxinei în plante.

26 Fig. 1 arată masa de răsaduri intacte de grâu și evaluarea relativă a distrugerilor la
27 24 ore după infestarea cu larve de buha semănăturilor în stadiul 4 și după diverse
28 tratamente.

29 Fig. 2 arată greutatea răsadurilor de porumb infestate cu larve de buha semănăturilor
30 în stadiul 3, la 48 ore după infestare și după diverse tratamente.

31 Fig. 3 și 4 ilustrează rezultatele discutate în Exemplul 4.

32 SECV ID NR:1 este o secvență de polinucleotide pentru o genă hibrid *cryIF/cryIA(b)*
33 de lungime totală, optimizată pentru plante, denumită 1F1AB-PO.

34 SECV ID NR:2 este o secvență de aminoacizi pentru o toxină himerică *CryIF/CryIA(b)*
35 de lungime totală, optimizată pentru plante. Gena 1F1AB-PO codifică această toxină.

36 SECV ID NR:3 este o secvență de polinucleotide pentru o genă *cryIF* trunchiată,
37 optimizată pentru plante, denumită 1F-T-PO.

38 SECV ID NR:4 este o secvență de aminoacizi pentru o toxină trunchiată, optimizată
39 pentru plante *CryIF*. Genele denumite 1F-T-PO, 1F-7G-PO și 1F-7Z-PO codifică această
40 toxină.

41 SECV ID NR:5 este secvența nativă de polinucleotide a genei toxinei *B.t.* de tip
42 natural, de lungime totală, denumită 81IA (*cryIFa*).

43 SECV ID NR:6 este secvența de aminoacizi a toxinei de lungime totală, de tip natural
44 *B.t.* denumită 81IA (*CryIFa*).

45 SECV ID NR:7 este o secvență de polinucleotide pentru o genă denumită 1F-7G-PO
46 care este optimizată pentru a se exprima în bumbac.

47 SECV ID NR:8 este o secvență de polinucleotide pentru o genă denumită 1F-7Z-PO,
care este optimizată pentru a se exprima în porumb.

Prezenta invenție se referă la descoperirea surprinzătoare că proteinele *Cry1F* sunt active împotriva omizilor cum ar fi cele de buha semănăturilor (*Agrotis ipsilon*). În particular, surprinzătoare sunt descoperirile că larvele de stadiul 3 sau mai mare, sunt controlate de către toxinele și genele conform prezentei invenții. Controlul larvelor de omizi de stadiul întâi și al doilea este mai puțin important decât controlul stadiilor finale. Deși era cunoscut că toxinele *Cry1* sunt active împotriva lepidopterelor în general, se credea că omizile sunt recalcitrante la toxine *B.t.* în general, așa cum s-a discutat mai detaliat anterior.

Prezenta invenție include utilizarea gazdelor recombinante și asigură secvențe de polinucleotide optimizate pentru plante. Aceste secvențe de polinucleotide includ gene optimizate pentru plante, denumite 1F1AB-PO, 1F-T-PO, 1F-7G-PO și 1F-7Z-PO. Aceste gene sunt dezvoltate în **WO 99/24581**. Gazde vegetale preferate includ porumb, soia, bumbac, grâu, rapiță de toamnă și floarea soarelui.

În anumite alcătuiuri ale prezentei invenții, genele codifică o toxină *Cry1F* care este trunchiată comparativ cu toxina de lungime totală *Cry1F*. Toxinelor trunchiate ale prezentei invenții le lipsește de obicei tot sau o porțiune din segmentul protoxină. De asemenea, genele trunchiate prezentate aici pot fi folosite pentru producerea de gene himerice și proteine. Un exemplu este gena optimizată pentru plante care cuprinde o porțiune *cry1F* și o porțiune *cry1A(b)*, în care gena hibridă codifică o toxină himerică. Genele și toxinele himerice preferate sunt dezvoltate în brevetele **US 5527883** și **5840554**. Alte gene și toxine himerice care pot fi utilizate conform prezentei invenții sunt dezvoltate în brevetele **US 5508264** și **5827514**. Într-o alcătuire preferată, porțiunea *Cry1F* a toxinei himerice are ea însăși activitate pesticidă. Toxinele de fuziune pot fi de asemenea utilizate conform prezentei invenții.

Într-o alcătuire preferată, prezenta invenție se referă la celule de plante transformate cu cel puțin o secvență de polinucleotide astfel încât celulele de plante transformate exprimă toxinele cu activitate pesticidă în țesuturi consumate de dăunătorii vizați, care astfel iau contact cu proteina cu activitate pesticidă. Asemenea transformare a plantelor poate fi realizată folosind tehnici binecunoscute specialiștilor în domeniu, și de obicei implică modificarea genei pentru a optimiza expresia toxinei în plante.

Trebuie să fie evident unui specialist în domeniu, că date fiind secvențele genelor prezentate aici, genele prezentei invenții pot fi obținute prin mai multe mijloace. În alcătuiuri preferate, genele prezentei invenții de exemplu, pot fi construite sintetic prin folosirea unui sintetizator de gene. Genele specifice exemplificate aici, pot fi de asemenea obținute prin modificarea, conform prezentei invenții, a anumitor gene de tip natural (de exemplu, prin tehnici de mutație punctiformă) din anumite izolate depozitate într-un depozit de culturi așa cum este prezentat mai jos. De exemplu, o genă *cry1F* de tip natural poate fi obținută din izolat *B.t.* PS811. De asemenea, porțiunile *cry1A(b)* ale genelor hibride ale prezentei invenții pot fi produse sintetic sau pot fi derivate prin modificarea genelor de tip natural. Toxinele și genele *Cry1A(b)* au fost descrise de exemplu, în Höfte și al. (1986) *Eur. J. Biochem.* 161:273; Geiser și al. (1986) *Gene* 48:109; și Haider și al. (1988) *Nucleic Acids Res.* 16:10927. Clonele și izolatele de tip natural adiționale au fost discutate mai detaliat, anterior și în lista de mai jos.

Culturile discutate în această cerere au fost depozitate, în conformitate cu tratatul de la Budapesta, la Agricultural Research Service Patent Culture Collection (NRRL, Northern Regional Research Center, 1815 North University Street, Peoria, Illinois 61604, SUA. Tulpinile depozitate listate mai jos sunt dezvoltate în brevetele de referință discutate mai sus.

1	Subcultură	Număr de acces	Data de depozit
	B.t. PS81I	NRRL B-18484	19 aprilie 1989
3	E. coli (NM522)(pMYC1603) (81IA)	NRRL B-18517	30 iunie 1989

5 Trebuie înțeles că disponibilitatea unui depozit nu constituie un permis pentru
punerea în practică a prezentei invenții în derogarea drepturilor brevetului acordat prin
7 acțiune guvernamentală.

Gene și toxine. Polinucleotidele prezentei invenții pot fi utilizate pentru a forma
9 "gene" complete pentru a codifica proteine sau peptide într-o celulă gazdă dorită. De
exemplu, așa cum vor recunoaște specialiștii din domeniu, unele dintre polinucleotidele din
11 lista de secvențe atașată sunt arătate fără codonii stop. De asemenea, polinucleotidele
prezentei invenții pot fi plasate în mod adecvat sub controlul unui promotor într-o gazdă de
13 interes, așa cum este știut în domeniu.

Așa cum vor recunoaște specialiștii din domeniu, ADN-ul există de obicei într-o formă
15 dublu catenară. În această dispunere, o catenă este complementară celeilalte catene și
viceversa. Pe măsură ce ADN-ul este replicat într-o plantă (de exemplu) adițională, sunt
17 produse catene complementare ale ADN-ului. Astfel, prezenta invenție include utilizarea
polinucleotidelor exemplificate arătate în lista de secvențe atașată și catenele comple-
19 mentare ale acestora. "Catena de codificare" este adesea utilizată în domeniu pentru a se
referi la catena care se leagă cu catena anti-sens. Pentru a exprima o proteină *in vivo*, o
21 catenă a ADN-ului este de obicei transcrisă într-o catenă complementară de ARNm, care
este utilizată ca matriță pentru translația proteinei. ARNm este transcris de fapt din catena
23 "anti-sens" a ADN-ului. Catena "sens" sau "de codificare" are o serie de codoni (un codon
reprezintă trei nucleotide care pot fi citite toate trei în același timp pentru a produce un
25 aminoacid particular) care poate fi citit ca un cadru de citire deschis (ORF) pentru a forma
o proteină sau peptidă de interes. ARN și ANP (acizi nucleici peptidici) care sunt echivalent
27 funcționali cu ADN-ul exemplificat sunt incluse în prezenta invenție.

De exemplu, genele și toxinele prezentei invenții pot fi identificate, obținute și
29 caracterizate prin utilizarea probelor de oligonucleotide. Probele sunt secvențe de nucleotide
detectabile. Polinucleotidele exemplificate în mod specific ale prezentei invenții, inclusiv
31 porțiuni ale acestora care sunt suficiente pentru a codifica o toxină activă, pot fi ele însele
utilizate ca probe. Probele pot fi ADN, ARN sau ANP (acizi nucleici peptidici). Aceste
33 secvențe pot fi detectabile în virtutea unei etichete adecvate incluzând sau fiind inerente
făcute fluorescente, de exemplu, așa cum este descris în cererea internațională
35 **WO 93/16094**. Așa cum este binecunoscut în domeniu, dacă molecula de probă și mostra
de acid nucleic hibridizează prin formarea unei legături puternice între cele două molecule,
37 se poate presupune în mod rezonabil că proba și mostra au o omologie substanțială. De
preferință, hibridizarea este condusă în condiții de stringență prin tehnici binecunoscute în
39 domeniu, așa cum sunt descrise de exemplu, în Keller, G.H., M.M. Manak (1987) *DNA
Probes*, Stockton Press, New York, NY, pag. 169-170. De exemplu, așa cum este afirmat
41 aici, condițiile de hibridizare de înaltă stringență pot fi realizate mai întâi printr-o spălare cu
2xSSC (citrát salin standard)/0,1% SDS (sulfat dodecil de sodiu) timp de 15 min la
43 temperatura camerei. Sunt realizate de obicei două spălări. Exigența poate fi realizată prin
reducerea concentrației de sare și/sau prin ridicarea temperaturii. De exemplu, etapa de
45 hibridizare de mai sus poate fi urmată de spălarea cu 0,1xSSC/0,1% SDS timp de 15 min
la temperatura camerei, care la rândul ei poate fi urmată de spălarea cu 0,1xSSC/0,1% SDS
47 timp de 30 minute la 55°C. Temperaturile folosite pentru aceste etape pot fi de asemenea

RO 122431 B1

folosite cu alte protocoale discutate aici (unde se folosește SSPE în loc de SSC de exemplu),	1
așa cum este cunoscut în domeniu. 2xSSC/0,1% SDS poate fi preparată prin adăugarea de	3
50 ml de 20xSSC și 5 ml de SDS 10% în 445 ml de apă. 20xSSC poate fi preparată prin	5
combinarea NaCl (175,3 g/0,150 M), citrat de sodiu (88,2 g, 0,015 M) și apă până la 1 litru,	7
urmată de ajustarea pH-ului la 7,0 cu NaOH 10 N. SDS 10% poate fi preparată prin	9
dizolvarea a 10 g de SDS în 50 ml de apă autoclavizată, diluare la 100 ml și alicotare.	11
Detectarea probei asigură un mijloc pentru determinarea într-un mod cunoscut a	13
faptului că hibridizarea a avut loc. O asemenea analiză a probei asigură o metodă rapidă	15
pentru identificarea genelor care codifică toxina prezentei invenții. Segmentele de nucleotide	17
care sunt folosite ca probe conform invenției pot fi sintetizate folosind un sintetizator de ADN	19
și proceduri standard.	21
Așa cum este utilizat aici, condiții "stringente" pentru hibridizare se referă la condiții	23
care realizează același sau aproximativ același grad de specificitate al hibridizării ca și	25
condițiile utilizate de solicitanții curenți. În mod specific, hibridizarea ADN-lui imobilizat pe	27
Southern blot cu probe specifice genelor marcate cu 32P, a fost realizată prin metode	29
standard (Maniatis, T., E.F. Fritsch, J. Sambrook [1982] <i>Molecular Cloning: A Laboratory</i>	31
<i>Manual</i> , Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY). În general, hibridizarea	33
și spălările ulterioare au fost realizate în condiții stringente care au permis detectarea	35
secvențelor țintă. Pentru probele de gene de ADN dublu catenar, hibridizarea a fost realizată	37
peste noapte la 20-25°C sub temperatura de topire (T _m) a hibridului ADN în 6xSSPE, 5x	39
soluția lui Denhardt, 0,1% SDS, 0,1 mg/ml ADN denaturat. Temperatura de topire este	41
descrișă de către formula următoare (Beltz, G.A., K.A. Jacobs, T.H. Eickbush, P.T. Cherbas	43
și F.C. Kafatos [1983] <i>Methods of Enzymology</i> , R. Wu, L. Grossman și K. Moldave,	45
Academic Press, New York 100:266-285).	47
$T_m = 81,5^{\circ}\text{C} + 16,6 \text{ Log}[\text{Na}^+] + 0,41(\% \text{G+C}) - 0,61(\% \text{formamidă}) - 600/\text{lungimea}$	
duplex în perechi de baze.	
Spălările sunt realizate de obicei după cum urmează:	
(1) De două ori la temperatura camerei timp de 15 min în 1xSSPE, 0,1% SDS	
(spălare de stringență redusă).	
(2) O dată la T _m -20°C timp de 15 min în 0,2xSSPE, 0,1% SDS (spălare de stringență	
moderată).	
Pentru probele de oligonucleotidă, hibridizarea, a fost realizată peste noapte la 10-	
20°C sub temperatura de topire (T _m) a hibridului în 6xSSPE, 5x soluția lui Denhardt, 0,1%	
SDS, 0,1 mg/ml ADN denaturat. T _m pentru probele de oligonucleotide a fost determinată cu	
formula următoare:	
$T_m(^{\circ}\text{C}) = 2(\text{număr T/A perechi de baze}) + 4(\text{număr G/C perechi de baze})$ (Suggs,	
S.V., T. Miyake, E.H. Kawashime, M.J. Johnson, K. Itakura și R.B. Wallace [1981] <i>ICN-UCLA</i>	
<i>Symp. Dev. Biol. Using Purified Genes</i> , D.D. Brown, Academic Press, New York, 23:683-	
693).	
Spălările s-au realizat în mod obișnuit după cum urmează:	
(1) De două ori la temperatura camerei timp de 15 min în 1xSSPE, 0,1% SDS	
(spălare de stringență redusă).	
(2) O dată la temperatura de hibridizare timp de 15 min în 1xSSPE, 0,1% SDS	
(spălare de stringență moderată).	
Modificarea genelor și a toxinelor. Toxinele și genele utile conform prezentei	
invenții includ nu numai secvențele specific exemplificate, ci și porțiuni și/sau fragmente	
(inclusiv deleții interne sau/și terminale în comparație cu proteinele cu lungime totală),	
variante, mutanți, substitute (proteine care au aminoacizi substituiți), proteine de fuziune și	

himerice care păstrează caracteristicile activității pesticide ale proteinelor exemplificate în mod specific aici. Așa cum sunt folosiți aici, termenii "variante" sau "variații" ale genelor se referă la secvențe de nucleotide care codifică aceleași toxine sau care codifică toxine echivalente care au activitate pesticidă. Așa cum este utilizat aici, termenul "toxine echivalente" se referă la toxine care au aceeași sau esențial aceeași activitate pesticidă față de dăunătorii vizați ca și toxinele revendicate.

Genele pot fi modificate, iar variațiile genelor pot fi ușor construite, folosind tehnici standard. De exemplu, tehnicile pentru realizarea mutațiilor punctiforme sunt binecunoscute în domeniu. De asemenea, **brevetul US 5605793** descrie metode pentru generarea de diversitate moleculară adițională prin folosirea de reasamblare de ADN după fragmentarea aleatoare. Fragmentele de gene de lungime totală pot fi realizate folosind endonucleaze disponibile comercial, iar exonucleazele pot fi folosite conform tehnicilor standard. De exemplu, enzimele cum ar fi *Bal31* sau mutageneză direcționată către situs, pot fi utilizate pentru a decupa sistematic nucleotide de la capetele acestor gene. De asemenea, genele care codifică fragmente active pot fi obținute folosind o varietate de enzime de restricție. Proteazele pot fi folosite direct pentru a obține fragmente active ale acestor toxine.

Toxinele echivalente și/sau genele care codifică aceste toxine echivalente pot fi derivate din izolate *B.t.* și/sau bănci de ADN folosind noțiunile furnizate aici. Există un număr de metode pentru obținerea toxinelor cu activitate pesticidă ale prezentei invenții. De exemplu, anticorpii anti-toxine cu activitate pesticidă dezvăluite și revendicate aici pot fi utilizate pentru a identifica și izola alte toxine dintr-un amestec de proteine. În mod specific, anticorpii pot fi crescuți la porțiunile toxinelor care sunt cel mai constante și distincte de alte toxine *B.t.* Acești anticorpi pot fi apoi folosiți pentru a identifica în mod specific toxine echivalente cu activitate caracteristică prin imunoprecipitare, testul cu anticorpi adsorbiți legați de enzime (ELISA), sau Western blotting. Anticorpii anti-toxine dezvăluiți aici, sau ai toxinelor echivalente, sau fragmentelor acestor toxine, pot fi preparați ușor folosind proceduri standard din acest domeniu. Genele care codifică aceste toxine pot fi obținute apoi din microorganism.

Datorită redundanței codului genetic, o varietate de secvențe ADN diferite pot codifica aceleași secvențe de aminoacizi. Este la îndemâna unui specialist din domeniu să creeze aceste secvențe ADN alternative care codifică aceleași, sau esențial aceleași toxine. Aceste variante de secvențe ADN sunt în cuprinsul prezentei invenții. Așa cum este utilizată aici, referința la secvența "esențial aceeași" se referă la secvențe care au substituții, deleții, adiții sau inserții de aminoacizi care nu afectează material activitatea pesticidă. Fragmentele care păstrează activitatea pesticidă sunt de asemenea incluse în această definiție.

Toxinele echivalente vor avea similaritate de aminoacizi (și/sau omologie) cu o toxină exemplificată. Identitatea/similaritatea aminoacizilor va fi în mod obișnuit mai mare de 60%, de preferință mai mare de 75%, și mai preferat mai mare de 80%, chiar și mai preferat mai mare de 90%, și poate fi mai mare de 95%. Polinucleotidele și proteinele preferate ale prezentei invenții pot fi de asemenea definite în termeni de domenii de identitate și/sau similaritate mai particulare. De exemplu, identitatea și/sau similaritatea pot fi 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, sau 99% comparativ cu o secvență exemplificată aici. Dacă nu se specifică altfel, așa cum este utilizat aici, procentul de identitate și/sau similaritate a secvenței a doi acizi nucleici este determinat folosind algoritmul lui Karlin și Altschul (1990), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:2264-2268, modificat ca în Karlin și Mschul (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-5877. Un asemenea algoritm este incorporat în programele NBLAST și XBLAST ale lui Altschul și *al.*

(1990), *J. Mol. Biol.* 215:402-410. Căutările de nucleotide BLAST sunt realizate cu programul NBLAST, scor=100, lungime cuvânt=12, pentru a obține secvențe de nucleotide cu procentul de identitate dorit. Pentru a obține alinieri spațiate în scopuri comparative, se folosește Gapped BLAST așa cum este descris în Altschul și al. (1997) *Nucl. Acids Res.* 25:3389-3402. Atunci când se utilizează programele BLAST și Gapped BLAST, sunt folosiți parametrii implicați ai programelor respective (NBLAST și XBLAST). A se vedea <http://www.ncbi.nih.gov>. Scorurile pot fi de asemenea calculate folosind metodele și algoritmii lui Crickmore și al. așa cum este descris mai sus.

Omologia aminoacizilor va fi cel mai ridicată în regiunile critice ale toxinei care contează pentru activitatea biologică sau sunt implicate în determinarea configurației tridimensionale, care, în ultimă instanță, este răspunzătoare pentru activitatea biologică. În această privință, sunt acceptabile anumite substituții de aminoacizi și pot fi de așteptat dacă aceste substituții sunt în regiuni care nu sunt critice pentru activitate sau sunt substituții conservatoare de aminoacizi care nu afectează configurația tridimensională a moleculei. De exemplu, aminoacizii pot fi plasați în clasele următoare: non-polari, neîncărcați polar, bazică și acidă. Substituțiile conservatoare în care un aminoacid dintr-o clasă este înlocuit cu alt aminoacid de același tip sunt în întinderea prezentei invenții atâta timp cât substituția nu modifică material activitatea biologică a compusului. Tabelul 1 furnizează o listă de exemple de aminoacizi care aparțin fiecărei clase.

Tabelul 1

Clasa de aminoacid	Exemple de aminoacizi
Non-polari	Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Met, Phe, Trp
Neîncărcați polar	Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Gln
Acizi	Asp, Glu
Bazici	Lys, Arg, His

În anumite cazuri, se pot face de asemenea substituții neconservatoare. Factorul critic este acela că aceste substituții nu trebuie să devieze semnificativ de la capacitatea plantelor de a exprima secvențele ADN ale prezentei invenții sau de la activitatea biologică a toxinei.

Așa cum este folosit aici, referirea la polinucleotide "izolate" și/sau toxine "purificate" se referă la acele molecule atunci când ele nu sunt asociate cu alte molecule cu care ele ar fi găsite în natură; aceasta va include utilizarea lor în plante. Astfel, referirea la "izolate" și/sau "purificate" semnifică implicarea mâinii omenești, așa cum s-a descris aici.

Deși prezenta invenție prevede alcătuirii specifice ale genelor sintetice, alte gene care sunt funcțional echivalente cu genele exemplificate aici pot fi folosite pentru a transforma gazdele, de preferință gazde vegetale. Un ghid suplimentar pentru producerea de gene sintetice poate fi găsit în brevetul **US 5380831**.

Gazde recombinante. Genele care codifică toxinele prezentei invenții pot fi introduse într-o largă varietate de gazde microbiene sau plante. În alcătuirile preferate, expresia genei toxinei are ca urmare, direct sau indirect, producerea intracelulară și menținerea pesticidelor. Atunci când celulele gazdă transgenice/recombinante/ transformate sunt ingerate de dăunători, dăunătorii vor ingera toxina. Acesta este modul preferat în care se realizează contactul dintre dăunător și toxină. Rezultatul este un control (uciderea sau îmbolnăvirea) al dăunătorului.

În anumite alcătuirii ale prezentei invenții, gazdele microbiene transformate pot fi folosite în etapele preliminare pentru prepararea precursorilor, de exemplu, care vor fi utilizați în final pentru a transforma, în alcătuirile preferate, celule de plante astfel încât acestea să

1 exprime toxinele codificate de genele prezentei invenții. Microbii transformați și folosiți în
 acest mod sunt în cuprinsul prezentei invenții. Microbii recombinati pot fi, de exemplu, *B.t.*,
 3 *E. coli.*, sau *Pseudomonas*.

Producerea de diverse organisme recombinante poate fi realizată de specialiștii din
 5 domeniu folosind tehnici standard. Materialele necesare pentru aceste transformări sunt
 dezvoltate aici sau sunt disponibile oricum cu ușurință specialiștilor din domeniu. O mare
 7 varietate de metode sunt disponibile pentru introducerea genei *B.t.* care codifică o toxină într-
 o gazdă țintă, în condiții care permit o menținere stabilă și a expresiei genei. Aceste metode
 9 sunt binecunoscute specialiștilor din domeniu și sunt descrise, în brevetul **US 5135867**, care
 este dat aici ca referință.

11 Genele care codifică toxina prezentei invenții pot fi introduse, prin intermediul unui
 vector adecvat, într-o mare varietate de gazde vegetale și microbiene. Există multe culturi
 13 de interes, cum ar fi porumb, grâu, orez, bumbac, soia și floarea soarelui. Anumite gene ale
 prezentei invenții sunt, în particular, adecvate pentru asigurarea menținerii stabile și
 15 expresiei, în plantele transformate, a genei care exprimă pesticidul polipeptidic și, de dorit,
 să asigure protecție îmbunătățită a pesticidului față de degradarea mediului și inactivare.
 17 Expresia genei toxinei are ca urmare, direct sau indirect, producerea intracelulară și
 menținerea proteinelor pesticide. Astfel, dăunătorul vizat poate lua contact cu proteinele cu
 19 activitate pesticidă prin ingestia țesutului de plantă care conține proteinele cu activitate
 pesticidă, care sunt toxice pentru dăunător. Rezultatul este controlul dăunătorului. Alternativ,
 21 zonei dăunătorului îi pot fi aplicate gazde microbiene, de exemplu *Pseudomonas*
fluorescens, unde unele dintre ele pot prolifera și sunt ingerate de către dăunătorii vizati.
 23 Microbul care găzduiește gena toxinei poate fi tratat în condiții care prelungesc activitatea
 toxinei și stabilizează celula. Celula tratată, care păstrează activitatea toxică, poate fi apoi
 25 aplicată mediului dăunătorului vizat.

Acolo unde gena toxinei *B.t.* este introdusă prin intermediul unui vector adecvat într-o
 27 gazdă microbiană, și gazda menționată este aplicată mediului într-o stare *in vivo*, trebuie
 folosite anumite gazde microbiene. Gazdele microorganisme care sunt selectate sunt
 29 cunoscute ca ocupând "fitosfera" (filoplanul, filosfera, rizosfera și/sau rizoplanul) uneia sau
 mai multor culturi de interes. Aceste microorganisme sunt selectate astfel încât să fie
 31 capabile de a fi competitive cu succes într-un mediu particular (cultură și alte habitate ale
 insectelor) cu microorganismele de tip natural, să asigure o menținere stabilă și expresia
 33 genei care exprimă pesticidul polipeptidic, și, de dorit, să asigure o protecție îmbunătățită a
 pesticidului față de degradarea mediului și inactivare.

35 Este cunoscut un mare număr de microorganisme care trăiesc în filoplan (suprafața
 frunzei plantelor) și/sau rizosfera (solul care înconjoară rădăcinile plantelor) a unei mari
 37 varietăți de culturi importante. Aceste microorganisme includ bacterii, alge și ciuperci. De un
 interes particular sunt microorganismele cum ar fi bacteriile, de exemplu genurile
 39 *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Serratia*, *Klebsiella*, *Xanthomonas*, *Streptomyces*, *Rhizobium*,
Rhodopseudomonas, *Methylophilus*, *Agrobacterium*, *Acetobacter*, *Lactobacillus*,
 41 *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Leuconostoc* și *Alcaligenes*; ciuperci, în particular drojdii, de
 exemplu genurile *Saccharomyces*, *Cryptococcus*, *Kluyveromyces*, *Sporobolomyces*,
 43 *Phodotorula* și *Aureobasidium*. De interes particular sunt acele specii de bacterii din fitosfera
 cum ar fi *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas fluorescens*, *Serratia marcescens*,
 45 *Acetobacter xylinum*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Rhodopseudomonas spheroides*,
Xanthomonas campestris, *Rhizobium melioli*, *Alcaligenes entrophus* și *Azotobacter vinlandii*;

și specii de drojdii din fitosferă cum ar fi *Rhodotorula rubra*, *R. glutinis*, *R. marina*, *R. aurantiaca*, *Cryptococcus albidus*, *C. diffluens*, *C. laurentii*, *Saccharomyces rosei*, *S. pretoriensis*, *S. cerevisiae*, *Sporobolomyces roseus*, *S. odoratus*, *Kluyveromyces veronae* și *Aureobasidium pollulans*. De interes particular sunt microorganismele pigmentate. 1

O largă varietate de căi sunt disponibile pentru introducerea unei gene *B.t.* care codifică o toxină în gazda vizată, în condiții care permit o menținere stabilă și expresia genei. Aceste metode sunt binecunoscute specialiștilor din domeniu și sunt descrise, în brevetul **US 5135867** care este dat aici ca referință. 3 5 7

Tratarea celulelor. Așa cum s-a menționat mai sus, celulele *B.t.* sau celulele recombinante care exprimă o toxină *B.t.* pot fi tratate pentru a prelungi activitatea toxinei și a stabiliza celula. Microcapsula de pesticid care se formează cuprinde toxina *B.t.* într-o structură celulară care a fost stabilizată și va proteja toxina atunci când microcapsula este aplicată mediului dăunătorului vizat. Celulele gazdă adecvate includ atât procariote cât și eucariote, fiind limitate în mod normal la acele celule care nu produc substanțe toxice organismelor superioare, cum ar fi mamiferele. Totuși, organismele care produc substanțe toxice pentru organismele superioare pot fi folosite, acolo unde substanțele toxice sunt instabile sau nivelul de aplicare suficient de redus încât să se evite posibilitatea de toxicitate pentru o gazdă mamifer. Drept gazde, de interes particular vor fi procariotele și eucariotele inferioare, cum ar fi ciupercile. 9 11 13 15 17 19

Celulele vor fi în mod obișnuit intacte și vor fi substanțial în forma proliferativă atunci când vor fi tratate, decât în formă de spori, deși în anumite situații pot fi utilizați spori. 21

Tratarea celulei microbiene, de exemplu un microb care conține gena toxinei *B.t.* poate fi făcută prin mijloace chimice sau fizice, sau printr-o combinație de mijloace fizice și/sau chimice, atâta timp cât tehnica nu afectează negativ proprietățile toxinei, nici nu diminuează capacitatea celulară de protecție a toxinei. Exemple de reactanți chimici sunt agenții de halogenare, în particular halogenii cu număr atomic 17-80. În particular, poate fi folosit iod în condiții blânde și suficient timp pentru a realiza rezultatele dorite. Alte tehnici adecvate includ tratamentul cu aldehide, cum ar fi glutaraldehida; anti-infecțioase cum ar fi clorură de zefiran și clorură de cetilpiridin; alcoolii, cum ar fi izopropil și etanol; diverși fixativi histologici, cum ar fi iod Lugol, fixativ Bouin, diverși acizi și fixativ Helly (a se vedea Humason, Gretchen L., *Animal Tissue Techniques*, W.H. Freeman și Comp., 1967); sau o combinație de agenți fizici (căldura) și chimici care păstrează și prelungesc activitatea toxinei produsă în celulă atunci când celula este administrată mediului gazdă. Exemple de mijloace fizice sunt radiația cu lungime de undă joasă, cum ar fi radiația gamma și radiația X, înghețarea, iradierea cu UV, liofilizarea și altele asemănătoare. Metodele pentru tratarea celulelor microbiene sunt dezvăluite în brevetele **US 4,695,455** și **4,695,462** care sunt date aici ca referință. 23 25 27 29 31 33 35 37

Celulele vor avea în general stabilitate structurală îmbunătățită, ceea ce va îmbunătăți rezistența la condițiile de mediu. Acolo unde pesticidul este într-o formă prematură, metoda de tratare a celulei trebuie selectată astfel încât să nu inhibe procesarea formei premature către forma matură a pesticidului prin patogenul dăunătorului vizat. De exemplu, formaldehida va reticula proteine și ar putea inhiba procesarea formei premature unui pesticid polipeptidic. Metoda de tratament trebuie să rețină cel puțin o porțiune substanțială din biodisponibilitatea sau bioactivitatea toxinei. 39 41 43

Caracteristicile de interes particular în selectarea unei celule gazdă în scopul producției, includ ușurința introducerii genei *B.t.* în gazdă, disponibilitatea sistemelor de expresie, eficacitatea expresiei, stabilitatea pesticidului în gazdă și prezența capacităților genetice auxiliare. Caracteristicile de interes pentru utilizarea ca microcapsulă de pesticid 45 47

1 includ calități protectoare pentru pesticid, cum ar fi pereți celulari groși, pigmentare și
3 împachetare intracelulară sau formarea de corpuri de incluziuni; supraviețuirea în medii
apoase; lipsa toxicității față de mamifere; atractivitatea pentru dăunători în scopul ingerării;
5 ușurința de ucidere și fixare fără deteriorarea toxinei; și altele asemănătoare. Alte
considerații includ ușurința formulării și manipulării, considerente economice, stabilitate de
stocare și altele asemănătoare.

7 **Creșterea celulelor.** Gazda celulară care conține gena cu activitate insecticidă *B.t.*
poate fi crescută în orice mediu nutritiv convenabil, de preferință acolo unde construcția ADN
9 asigură un avantaj selectiv, asigurând un mediu selectiv astfel încât substanțial toate sau
toate celulele să rețină gena *B.t.*. Aceste celule pot fi apoi recoltate în conformitate cu
11 metodele convenționale. Alternativ, celulele pot fi tratate anterior recoltării.

Celulele *B.t.* ale invenției pot fi cultivate folosind medii și tehnici de fermentare
13 standard în domeniu. La completarea ciclului de fermentare, bacteriile pot fi recoltate,
separând mai întâi sporii *B.t.* și cristalele din zeama de fermentare prin mijloace
15 binecunoscute în domeniu. Sporii *B.t.* recuperați și cristalele pot fi formulate într-o pudră cu
capacitate de umezire, concentrat lichid, granule sau alte formulări prin adăugarea de
17 surfactanți, dispersanți, purtători inerti și alte componente pentru a facilita manipularea și
aplicarea pentru dăunători particulari vizați. Aceste formulări și proceduri de aplicare sunt
19 binecunoscute în domeniu.

Formulări. Granulele formulate sub formă de momeală care conțin un element care
21 le face atractive și spori și cristale de izolate *B.t.*, sau microbi recombinati care cuprind
genele ce pot fi obținute din izolate *B.t.* dezvăluite aici, pot fi aplicate pe sol. Produsul
23 formulat poate fi de asemenea aplicat sub formă de înveliș al seminței sau tratament al
rădăcinilor sau tratament total al plantei în stadii târzii ale ciclului de cultură. Tratamentele
25 plantei și ale solului cu celule *B.t.* pot fi utilizate ca pudre cu capacitate de umezire, granule
sau prafuri, prin amestecarea cu diverse materiale inerte, cum ar fi minerale anorganice
27 (filosilicați, carbonați, sulfați, fosfați și altele asemănătoare) sau materiale botanice (coceni
măcinați, coji de orez, coji de nucă, și altele asemănătoare). Formulările pot include adjuvanți
29 de împrăștiere și aderență, agenți de stabilizare, alți aditivi cu activitate pesticidă, sau
surfactanți. Formulările lichide pot fi apoase sau neapoase și utilizate ca spume, geluri,
31 suspensii, concentrate emulsifiabile sau altele asemănătoare. Ingredientele pot include
agenți reologici, surfactanți, emulsifianți, dispersanți sau polimeri.

33 Așa cum va fi apreciat de către un specialist în domeniu, concentrația activității
pesticide va varia larg în funcție de natura formulării particulare, în particular dacă este un
35 concentrat sau dacă se va utiliza direct. Pesticidul va fi prezent cel puțin 1% în greutate și
poate fi 100% în greutate. Formulările uscate vor avea aproximativ 1-95% în greutate din
37 pesticid în timp ce formulările lichide vor fi în general de la aproximativ 1-60% în greutate din
solide în fază lichidă. Formulările vor avea în general de la aproximativ 10^2 până la
39 aproximativ 10^4 celule/mg. Aceste formulări vor fi administrate la aproximativ 50 mg (lichid
sau uscat) până la 1 kg sau mai mult la hectar.

41 Formulările pot fi aplicate mediului dăunătorului, de exemplu solului sau frunzelor prin
pulverizare, prăfuire, stropire sau altele asemănătoare.

43 **Mutanți.** Mutanții izolatelor invenției pot fi realizați prin proceduri binecunoscute în
domeniu. De exemplu, un mutant nesporogen poate fi obținut prin mutageneza cu etilmetan
45 sulfonat (EMS) a unui izolat. Mutanții pot fi realizați folosind lumină ultravioletă și
nitrozoguanidină prin proceduri binecunoscute în domeniu.

47 Un mic procent din mutanții nesporogeni vor rămâne intacti și nu vor liza pe perioade
extinse de fermentație; aceste tulpini sunt denumite liză minus (-). Tulpinile liză minus pot
49 fi identificate prin sortarea mutanților nesporogeni în medii în recipiente agitate și selectarea

RO 122431 B1

acelor mutanți care sunt intacti și conțin cristalele de toxină la sfârșitul fermentației. Tulpinile liză minus sunt adecvate pentru un proces de tratarea a celulelor care va produce o proteină de toxină, încapsulată, protejată.	1
Pentru a prepara o variantă rezistentă a fagelor, a mutantului nesporogen menționat, o alicotă a lizatului de fage este împrăștiată pe agar nutritiv și este lăsată să se usuce. O alicotă a tulpinei bacteriene sensibilă la fage este apoi pusă peste lizatul uscat și este lăsată să se usuce. Plăcile sunt incubate la 30°C. Plăcile sunt incubate timp de 2 zile și, în acel moment, pe agar pot fi văzute crescând numeroase colonii. Unele dintre aceste colonii sunt adunate și subcultivate pe plăci de agar nutritiv. Aceste culturi aparent rezistente sunt testate la rezistență prin încrucișare cu lizatul de fage. O linie a lizatului de fage este întinsă pe placă și lăsată să se usuce. Culturile prezumtiv rezistente sunt întinse apoi încrucișat peste lizatul de fage. Culturile bacteriene rezistente nu vor prezenta liză nicăieri în linia încrucișată cu lizatul de fage după incubarea peste noapte la 30°C. Rezistența la fage este apoi reconfirmată prin placarea unui strat de cultură rezistentă pe o placă de agar nutritiv. Tulpina sensibilă este de asemenea placată în același mod pentru a servi drept control pozitiv. După uscare, o picătură din lizatul de fage este plasată în centrul plăcii și lăsată să se usuce. Culturile rezistente nu au prezentat liză în zona unde lizatul de fage a fost plasat după incubarea la 30°C timp de 24 de ore.	3
În continuare sunt date 5 exemple care ilustrează procedurile pentru punerea în practică a invenției. Aceste exemple nu trebuie considerate ca fiind limitative.	5
Exemplul 1. Testarea biologică a Cry1F împotriva larvelor de buha semănăturilor (<i>Agrotis ipsilon</i> ; <i>Lepidoptera: Noctuidae</i>)	7
Activitatea biologică a Cry1F împotriva larvelor de buha semănăturilor (BCW) a fost determinată utilizând proceduri de testare biologică standard folosind preparate liofilizate, sub formă de pudră de MR872 (o clonă de <i>Pseudomonas fluorescens</i> care exprimă o genă himerică <i>cry1Fa/cry1Ab</i> dezvoltată în brevetul US 5,840,554). Testele biologice BCW au fost conduse prin incorporarea mostrelor de test într-o dietă artificială și testarea larvelor cu dieta tratată și netratată. Toate testele au fost conduse cu dietă artificială BCW (BioServ Corporation, Frenchtown, NJ.) Testele de incorporare a dietei au fost conduse prin amestecarea mostrelor cu dietă artificială (răcite mai întâi la 55° C sau mai jos) cu o rată de 6 ml suspensie plus 54 ml dietă. Concentrații multiple de tratament au fost generate prin diluare în serie. După amestecare, acest amestec a fost turnat în tăvi de plastic cu compartimente de 3 ml (Nutrend Container Corporation, Jacksonville, FL) la o rată de aproximativ 30 ml dietă pe tavă cu 24 de godeuri (fiecare godeu umplut pe jumătate). Tăvile Nutrend cu godeuri mai mari au fost utilizate pentru testarea biologică cu insecte în stadiul trei sau mai mare; acestea sunt de asemenea umplute aproximativ jumătate cu dietă artificială. Un control apă care nu conține material de testare a servit drept reper. După cel puțin 30 min, pentru a permite dietei să se răcească și să se stabilească, au fost plasate larve (French Ag Resources, Lamberton, MN) pe amestecul de dietă, o larvă per godeu. Godeurile au fost apoi acoperite cu foi de Mylar (ClearLam Packaging, IL) folosind un fier provizoriu pentru montaj și în fiecare godeu au fost făcute mai multe orificii mici pentru a asigura schimbul de gaze. Larvele au fost menținute la 25°C timp de 6 zile într-o cameră de păstrare la 14:10 (lumină:întuneric). Mortalitatea și atrofierea au fost înregistrate după aproximativ șase zile. Pentru testele biologice LC ₅₀ au fost executate un minimum de 3 reluări, fiecare cu 5-7 doze și aproximativ 24 insecte/doză. Rezultatele sunt arătate în tabelul 2 (Teste biologice pentru larve de <i>Agrotis ipsilon</i> în stadiul întâi și stadiul 3, cu preparat din pudră liofilizată de Cry1F de MR872).	9
	11
	13
	15
	17
	19
	21
	23
	25
	27
	29
	31
	33
	35
	37
	39
	41
	43
	45
	47

Tabelul 2

Stadiu	Date de test	LC ₁₀	LC ₅₀	LC ₉₀	pantă	insecte de test	insecte de control	% mortalitate controale
1	5	9	46	249	1,8	790	220	6
3	3	4	17	67	2,2	249	75	0

Exemplul 2. Eficiența momelii Cry1F împotriva larvelor de buha semănăturilor

Cry1F a fost testată pentru activitate împotriva larvelor de buha semănăturilor folosind o formulare de momeală. Clonele MR872 au fost amestecate cu momeală comercială (SoilServ, Salinas, CA), iar amestecul rezultat a fost împrăștiat pe suprafața solului cu răsaduri de grâu în ghivece (Stadiu de creștere Feekes 1,5) cu o rată de 50 lb momeală/acru. Au fost testate două concentrații de Cry1F prin adăugarea de diferite cantități de toxină la momeală, producând rate echivalente cu 6,25 g și 12,5 g de Cry1F toxină/acru. Plantele au fost apoi infestate cu larve în stadiul 3 sau 4 la o rată de aproximativ 1 insectă per 5 plante și s-a măsurat distrugerea plantelor după 24-48 ore. Scala distrugerilor se întinde de la 0 până la 4, cu 0 pentru plante tăiate total la nivelul solului, iar 4 pentru nicio distrugere vizibilă. Controalele au inclus plante fără momeală adăugată ("fără momeală"), cu momeală adăugată dar fără toxină ("momeală control") și plante fără momeală sau insecte ("control"). Rezultatele sunt arătate în fig. 1 și 2.

Exemplul 3. Eficiența plantelor de floarea soarelui Cry1F transgenice împotriva *Agrotis ypsilon* conform măsurătorilor făcute pentru creșterea și mortalitatea insectelor și distrugerea plantelor

Tratamentele plantelor:

- răsaduri de control în stadiul V2

- răsaduri *B.t.* în stadiul V2 (donori cu matriță fixă de gene); aceste plante au exprimat o genă substanțial ca cea arătată în SECV ID NR:3

Insecte: *Agrotis ypsilon*. Larve în stadiul doi (a treia generație de laborator)

Test: răsaduri *B.t.*, cinci repetări, cinci răsaduri per repetare, o larvă per răsad.

Control: cinci repetări, cinci răsaduri per repetare, o larvă per răsad.

Protocol:

- fiecare repetare a constat din cinci semințe care au fost plantate în tăvi dreptunghiulare transparente (15 cm x 25 cm) și acoperite pentru a permite reclusiunea larvelor de insecte.

- fiecare repetare a fost infestată cu cinci larve. Tăvile au fost ținute într-o cameră la 25°C și 75% umiditate. Evaluarea s-a făcut la 24, 48, 72 și 96 ore după infestare.

- Evaluare

1. Plante - clasificate ca nedistruse, distruse (tulpină mușcată, cotiledoane sau frunze) sau tăiate sub cotiledoane. S-a făcut de asemenea o clasificare a fiecărei repetări: de la 1 (plante nedistruse sau cu tulpini cu câteva mușcături) până la 9 (toate plantele tăiate și mai mult de 80% din țesut mâncat).

2. Insecte - s-au numărat larvele moarte la 96 ore după infestare, iar larvele care au supraviețuit au fost cântărite.

3. Datele au fost analizate prin intermediul analizei probabilității tabelelor.

Rezultate: Sunt disponibile imagini care arată repetarea nr. 4 (48 și 96 ore după infestare). Datele sunt raportate în tabelele următoare, care arată evaluarea repetărilor 24, 48, 72 și 96 ore după infestarea cu *Agrotis ypsilon*.

RO 122431 B1

Tabelul 3 1

24 ore după infestare

Rep.	Nr. plante nedistruse		Nr. plante distruse		Nr. plante tăiate		Clasificare		
	B.t.	control	B.t.	control	B.t.	control	B.t.	control	
1	2	2	2	0	1	3	1	5	5
2	3	3	0	1	2	1	3	4	
3	3	2	2	0	0	3	2	5	7
4	3	1	0	2	0	2	2	3	
5	4	2	0	2	1	1	2	3	9

Tabelul 4 11

48 ore după infestare

Rep.	Nr. plante nedistruse		Nr. plante distruse		Nr. plante tăiate		Clasificare		
	B.t.	control	B.t.	control	B.t.	control	B.t.	control	
1	2	1	1	1	2	3	3	7	15
2	2	0	1	2	2	3	3	7	
3	1	1	1	0	3	4	3	7	17
4	2	1	0	0	3	4	4	7	
5	2	1	1	1	2	3	3	7	19

Tabelul 5 21

72 ore după infestare

Rep.	Nr. plante nedistruse		Nr. plante distruse		Nr. plante tăiate		Clasificație		
	B.t.	control	B.t.	control	B.t.	control	B.t.	control	
1	2	0	1	0	3	5	3	9	25
2	0	0	3	0	2	5	4	9	
3	1	0	1	0	3	5	5	9	27
4	1	0	0	0	4	5	6	9	
5	2	0	0	0	5	5	5	9	29

Tabelul 6 31

96 ore după infestare

Rep.	Nr. plante nedistruse		Nr. plante distruse		Nr. plante tăiate		Clasificare		Nr. larve moarte	
	B.t.	control	B.t.	control	B.t.	control	B.t.	control		
1	3	0	0	0	2	5	3	9	4	37
2	0	0	2	0	3	5	7	9	0	
3	1	0	0	0	4	5	5	9	0	39
4	0	0	0	0	5	5	6	9	0	
5	1	0	0	0	4	5	6	9	0	41

Greutatea larvelor (mg) 96 ore după infestare*

Repetare		Larve per repetare					
		1	2	3	4	5	medie
2	<i>B.t.</i>	100	95	65	115	75	90
	control	230	170	205	175	175	191
3	<i>B.t.</i>	150	135	85	115	120	121
	control	215	200	90	120	160	157
4	<i>B.t.</i>	110	80	110	85	150	107
	control	170	160	185	200	155	174
5	<i>B.t.</i>	120	65	95	60	45	77
	control	120	190	210	255	110	177

* patru repetări, deoarece într-o repetare larvele au murit

Concluzie: Răsadurile *B.t.* arată activitate împotriva *Agrotis ypsilon* la un nivel înalt al infestării (1 larvă/răsad). Această activitate este suficientă pentru a afecta negativ creșterea omizilor astfel încât controlul este realizat.

Exemplul 4. Controlul dăunătorului buha semănăturilor (BCW) cu noi evenimente *Cry1F* pentru porumb

Sumar. Capacitatea a zece evenimente *Cry1F* pentru porumb (care exprimă substanțial polinucleotida din SECV ID NR:3) de a controla dăunătorul buha semănăturilor (*Agrotis ipsilon* (Hufnagel)) în condiții de câmp a fost comparată cu doi hibrizi non-*B.t.* (Control 1 și Control 2), un hibrid care exprimă *Cry1Ab* și un hibrid care exprimă proteina *Cry9C* în scopuri comparative. Toate evenimentele *Cry1F* au asigurat o bună protecție împotriva pierderilor în stand în comparație cu hibridii non-*B.t.*

Materiale și metode. Au fost plantate 25 de semințe pentru fiecare intrare, folosind un plantator conic Almaco în ziua 1. Au fost plantate patru replicări - fiecare randomizată separat. Rândurile au fost în perechi, cu o alee neplantată între fiecare pereche de rânduri. Fiecare parcelă a fost inclusă într-o barieră de oțel galvanizat cu înălțimea de 8 inci, lățimea de 2,5 inci și lungimea de 6 inci. Barierele au fost presate în pământ până la o adâncime de aproximativ 2 inci în Zilele 13 și 14. Marginile barierei au fost tratate cu vaselină rectificată pentru a descuraja fuga larvelor. În interiorul barierei au fost împrăștiate paie de grâu pentru a asigura adăpostul omizilor. La scurt timp după răsărire, plantele care conțineau *Cry1F* au fost testate cu benzi ELISA, iar standurile au fost rărite la 10 plante prin îndepărtarea plantelor fără expresie sau a celor cu surplus de expresie. În trei dintre parcele, standul final a fost de 8 sau 9 plante. Non-*Cry1F* au fost de asemenea rărite la 10 plante. În spatele fiecărei plante a fost plasat un mic arac de plastic astfel încât să fie evidentă dispariția unei plante, dacă acest lucru se întâmplă. În ziua 15, atunci când plantele au atins stadiul V1 sau V2 timpuriu, pe fiecare plantă au fost plasate trei larve de buha semănăturilor în stadiul trei. O a doua infestare cu 2 larve de buha semănăturilor în stadiul 4 per plantă a fost făcută în ziua 9.

Parcelele au fost examinate în fiecare zi din ziua 16 până în ziua 26. O clasificare suplimentară a fost făcută în ziua 29, iar clasificarea finală a fost făcută în ziua 34. Orice plantă care a fost distrusă a fost marcată cu un mic arac de plastic în fața ei, și s-a înregistrat tipul distrugerii pe o foaie de date. La sfârșitul testului s-a efectuat numărătoarea finală a standului.

Rezultate. În acest test s-a realizat un nivel moderat de presiune a dăunătorului buha semănăturilor, având ca rezultat o reducere a standului la câteva intrări non-*B.t.* Din motive necunoscute, a existat o tendință în acest test, ca buha semănăturilor să usuce plantele în loc să le taie. Din acest motiv, datele despre plante distruse au fost de asemenea comparate.

Tabelul 8 arată tipul de plantă și procentul de reducere a standului (%RS) și procentul de plante distruse (%Dis). Reducerea standului înseamnă că planta a fost omorâtă. Plantele distruse au avut deteriorări evidente în hrănire, dar nu și-au pierdut vârful vegetativ.

Tabelul 8

Tratament/eveniment Cry1F	%RS	%Dis.
Control 1 non- <i>B.t.</i>	47,5	60
Control 2 non- <i>B.t.</i>	32,5	45
<i>Cry9C</i>	7,5	20
<i>Cry1Ab</i>	15	43
308	2,5	5
188	0	5
218	7,5	15
386	7,5	15
538	2,5	18
778	2,5	15
366	3,1	11
663	5	18
058	2,8	9
227	0	5

Aceste rezultate sunt arătate grafic în fig. 3 și 4.

Deși nici o intrare nu a fost fără distrugerii, acest lucru nu este surprinzător deoarece omizile trebuie să mănânce plantele pentru a muri. Totuși, în sumar, au fost disponibile fotografiile care au arătat clar plantele *Cry1F* ușor afectate față de plantele control tăiate complet.

Exemplul 5. Introducerea genelor de toxine în plante

Un aspect al prezentei invenții este transformarea plantelor cu secvențele de polinucleotide ale prezentei invenții care codifică toxinele cu activitate insecticidă. Plantele transformate sunt rezistente la atacul dăunătorului vizat. Genele preferate pentru utilizarea conform prezentei invenții sunt optimizate pentru folosirea în plante. Exemple de gene și toxine cu activitate împotriva omizilor pentru folosirea conform prezentei invenții sunt arătate în SECV ID NR: 1-8. Sunt preferate proteina și gena din SECV ID NR: 1 și 2.

Evident, este necesară o regiune promotor capabilă să exprime gena într-o plantă. Astfel, pentru expresia *in planta*, ADN-ul prezentei invenții este sub controlul unei regiuni promotor adecvată și lincată funcțional de aceasta. Tehnicile pentru obținerea expresiei *in planta* folosind asemenea construcții sunt cunoscute în domeniu.

Genele care codifică toxinele cu activitate pesticidă, așa cum au fost dezvăluite aici, pot fi inserate în celule de plante folosind o varietate de tehnici care sunt binecunoscute în domeniu. De exemplu, un mare număr de vectori de donare care cuprind un sistem de replicare în *E. coli* și un marker ce permite selecția celulelor transformate sunt disponibile pentru prepararea și inserarea de gene străine în plante superioare. Vectorii cuprind, de exemplu,

serii pBR322, pUC, serii M13mp, pACYC184 etc. În consecință, secvența care codifică toxina *B.t.* poate fi inserată în vector la un situs de restricție adecvat. Plasmidul care rezultă este folosit pentru transformarea în *E. coli*. Celulele de *E. coli* sunt cultivate într-un mediu nutritiv adecvat, apoi sunt recoltate și lizate. Plasmidul este recuperat. Analiza secvențelor, analiza restricției, electroforeza și alte metode biologice, de biochimie moleculară sunt în general realizate ca metode de analiză. După fiecare manipulare, secvența de ADN folosită poate fi clivată și unită la secvența ADN următoare. Fiecare secvență de plasmid poate fi clonată în același plasmid sau în alte plasmide.

Depinzând de metoda de inserare a genelor dorite în plantă, pot fi necesare alte secvențe ADN. Dacă de exemplu, se folosește plasmidul Ti sau Ri pentru transformarea celulei de plantă, atunci trebuie ca cel puțin marginea dreaptă, dar adesea marginea dreaptă și stângă a ADN-T a plasmidului Ti sau Ri trebuie să fie unită ca regiunea de flancare a genelor care se inserează. Folosirea ADN-T pentru transformarea celulelor de plante a fost cercetată intensiv și suficient descrisă în **EP 120 516**; Hoekema (1985): *The Binary Plant Vector System*, Offset-durkkerij Kanters B.V. Alblasterdam, capitol 5; Fraley și col., *Crit. Rev. Plant Sci.* 4:1-46 și An și col. (1985) *EMBO J.* 4:277-287.

Odată ce ADN-ul inserat a fost integrat în genom, acesta este relativ stabil acolo și ca regulă, nu mai iese afară. Acesta conține în mod normal un marker de selecție care conferă celulelor de plante transformate rezistență la un biocid sau un antibiotic cum ar fi kanamicina, G 418, bleomicina, higromicina sau cloramfenicol, *inter alia*. Markerul utilizat în mod individual trebuie în consecință să permită mai degrabă selecția celulelor transformate decât a celulelor care nu conțin ADN-ul inserat.

Sunt disponibile un număr mare de tehnici pentru inserarea de ADN într-o celulă gazdă vegetală. Aceste tehnici includ transformarea cu ADN-T folosind *Agrobacterium tumefaciens* sau *Agrobacterium rhizogenes* ca agent de transformare, fuziune, injecție, biolistică (bombardament cu microparticule) sau electroporare cât și alte metode posibile. Dacă se folosește *Agrobacteria* pentru transformare, ADN-ul de inserat trebuie clonat în plasmide speciale, și anume fie într-un vector intermediar, fie într-un vector binar. Vectorii intermediari pot fi integrați în plasmidele Ti sau Ri prin recombinarea omoloagă ce conține secvențele care sunt omologe secvențelor din ADN-T. Plasmidele Ti sau Ri cuprind de asemenea regiunea *vir* necesară pentru transferul ADN-T. Vectorii intermediari nu se pot replica ei înșiși în *Agrobacteria*. Vectorul intermediar poate fi transferat în *Agrobacterium tumefaciens* prin intermediul unui plasmid helper (conjugare). Vectorii binari se pot replica ei înșiși atât în *E. coli* cât și în *Agrobacteria*. Aceștia cuprind o genă marker de selecție și un linker sau poli-linker care este încadrat de regiunile de margine ADN-T stângă și dreaptă. Aceștia pot fi transformați direct în *Agrobacteria* (Holsters și al. [1978] *Mol. Gen. Genet* 163:181-187). *Agrobacterium* folosite ca celulă gazdă trebuie să cuprindă un plasmid care poartă o regiune *vir*. Regiunea *vir* este necesară pentru transferul ADN-T în celula de plantă. Poate fi conținut ADN-T suplimentar. Bacteria transformată astfel este folosită pentru transformarea celulelor de plantă. Plantele explantate pot fi cultivate în mod avantajos cu *Agrobacterium tumefaciens* sau *Agrobacterium rhizogenes* pentru transferul ADN în celula plantei. Plante întregi pot fi apoi regenerate din materialul vegetal infectat, (de exemplu, bucăți de frunză, segmente de tulpină, rădăcini, dar de asemenea protoplaști sau celule cultivate în suspensie) într-un mediu adecvat, care poate conține antibiotice sau biocide pentru selecție. Plantele obținute astfel pot fi testate pentru prezența ADN-ului inserat. Nu sunt condiții speciale pentru plasmide în cazul injectării și electroporării. Este posibil să se folosească plasmide obișnuite cum ar fi, de exemplu, derivați pUC.

RO 122431 B1

Celulele transformate cresc în interiorul plantei în modul obișnuit. Acestea pot forma celule germinative și transmit trăsătura(ile) plantelor urmași. Asemenea plante pot fi crescute în modul normal și încrucișate cu plante care au aceiași factori ereditari transformați sau alți factori ereditari. Indivizii hibridi rezultați au proprietățile fenotipice corespunzătoare.

Revendicări

1. Metodă de combatere a dăunătorilor în stadiul de omizi, **caracterizată prin aceea că**, cuprinde aducerea în contact a dăunătorului menționat cu o toxină *Cry1F*. 1
2. Metodă conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** toxina menționată este o toxină *Cry1Fa*. 3
3. Metodă conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** toxina menționată este o toxină trunchiată. 5
4. Metodă conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** toxina menționată este într-o celulă de plantă care a produs toxina menționată și în care dăunătorul menționat vine în contact cu toxina menționată prin ingerarea celulei de plantă menționată. 7
5. Metodă conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** dăunătorul în stadiul de omidă menționat este din genul *Agrotis*. 9
6. Metodă conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** dăunătorul în stadiul de omidă menționat este un *Agrotis ipsilon*. 11
7. Metodă conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** dăunătorul în stadiul de omidă menționat este un *Agrotis malefida*. 13
8. Metodă conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** dăunătorul în stadiul de omidă menționat este din genul *Porosagrotis*. 15
9. Metodă conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** dăunătorul în stadiul de omidă menționat este un *Porosagrotis gypaetiana*. 17
10. Metodă conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** dăunătorul în stadiul de omidă menționat este din genul *Xylomyges*. 19
11. Metodă conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** dăunătorul în stadiul de omidă menționat este un *Xylomyges curialis*. 21
12. Metodă conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** dăunătorul în stadiul de omidă menționat este din *Tribe Agrotini*. 23
13. Metodă conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** dăunătorul în stadiul de omidă menționat este din genul *Feltia*. 25
14. Metodă conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** dăunătorul în stadiul de omidă menționat este un *Feltia jaculifera*. 27
15. Metodă conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** dăunătorul în stadiul de omidă menționat este din genul *Euxoa*. 29
16. Metodă conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** dăunătorul în stadiul de omidă menționat este un *Euxoa messoria*. 31
17. Metodă conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** dăunătorul în stadiul de omidă menționat este un *Euxoa scandens*. 33
18. Metodă conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** dăunătorul în stadiul de omidă menționat este un *Euxoa auxiliaris*. 35
19. Metodă conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** dăunătorul în stadiul de omidă menționat este un *Euxoa detersa*. 37
20. Metodă conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** dăunătorul în stadiul de omidă menționat este un *Euxoa tessellata*. 39

RO 122431 B1

- 1 21. Metodă conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** dăunătorul în stadiul
de omidă menționat este un *Euxoa ochrogaster*.
- 3 22. Metodă conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** dăunătorul în stadiul
de omidă menționat este din genul *Peridroma*.
- 5 23. Metodă conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** dăunătorul în stadiul
de omidă menționat este un *Peridroma saucia*.
- 7 24. Metodă conform revendicării 4, **caracterizată prin aceea că** planta menționată
este o plantă de porumb.
- 9 25. Metodă conform revendicării 4, **caracterizată prin aceea că** planta menționată
este o plantă de floarea soarelui.
- 11 26. Metodă conform revendicării 4, **caracterizată prin aceea că** planta menționată
este o plantă de soia.
- 13 27. Metodă conform revendicării 4, **caracterizată prin aceea că** planta menționată
este o plantă de rapiță de toamnă.
- 15 28. Metodă conform revendicării 4, **caracterizată prin aceea că** planta menționată
este o plantă de bumbac.
- 17 29. Metodă conform revendicării 4, **caracterizată prin aceea că** etapa de contactare
este precedată de etapa de plantare a seminței unei plante care cuprinde o polinucleotidă
19 ce codifică toxina menționată.

RO 122431 B1

LISTA DE SECVENTE

<110> Mycogen Corporation

<120> Metode pentru controlul dăunătorilor omizi

<130> MA-731XC1

<140>

<141>

<160> B

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 3444

<212> ADM

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Genă de toxină B.t. sintetică

<400> 1

```

atggagaaacacacagaa tcaagtgcgc cccacaaact gacctaaaca tccgaagta 60
gagattctcca acgaagagag gtcgactggc agattgccgt tagacatccc cctgtccctt 120
acacgtttcc tgcgtctcga gtttggccca ggtgtgggag ttgcgtttgg cctcttcgac 180
ctcatctggg gettcacac tccatctgat tggagccccc ttctcccca gattgaacag 240
ttgattgaac aaaggattga gaccttggaa aggaatcggg caactactac ccttcgtggc 300
ctagcagaca gctacgagac ctacattgaa gcactaagag agtgggaagc caactctaac 360
aatgcccacac cgagagaaga tgtgcgtata cgttttgcta acacagatga tgccttgatc 420
acagccatca acaacttccac cctaccagc ttcgagatcc ctcttctctc ggtctatgtt 480
caagctgcra acctgcactc gtcactactg cgcgacgctg tgcgttttgg gcaaggttcg 540
ggactcgaca tagctactgc caacatcac tacaaagac tcatcaatcc gattcatcga 600
tacacgaac attgttttga tactacaaat cagggattcg agaacctgag aggtactaac 660
actcgcacac gggccagggt caatcagtte aggaagagac ttacacttac tgcgttagac 720
atagttgctc tcttccgaa ctacgatgtt cgtacctatc cgattcaaac gtcacccaa 780
cttacaaggg agatctacac cagttcagtc attgaagact ctccagtttc tgcgaacata 840
cccaatgggt tcaacagggc tgagtttggg gtcagaccac cccatctcat ggacttcatg 900
aactcttctg tgcgactgc agagactgtt agatcccaaa ctgtgtgggg aggaacttta 960
gtcagctcac gcaacacggc tggcaatcgt atcaacttcc ctagttagcg ggtcttcaat 1020
ccggggggcg ccactctggat tgcagatgaa gatccacgtc ctttctatcg gaactcgtca 1080
gatccctgctc tgcctcggag aggccttggc aatccctcac atgtactcgg tcttagggga 1140
gtggcccttc aacaaactgg tacgaatcac acccgacat tcaggaactc cgggaccatt 1200
gaetctctrag atgagatacc aectcaagac aacagcgggc caacttggaa tgactactcc 1260
catgtgctga atcatgttac ctttgtgcgc tggccagggt agatctcagg tcccgactca 1320
tggagagcac caatgttctc ttggaegcat cgtagcgcta cccctacaaa caacattgat 1380
ccagagagaa tcaactcagat tcccttgggt aaggcacaca cacttcagtc aggaactaca 1440
gttctgaagag ggcgggggtt caccgggagg gacattcttc gacgcactag tggaggacca 1500
ttcgcgtaca ccattgtcaa catcaatggg caacttcccc aaaggtatcg tgcaggata 1560
cgctatgccc ctactaccaa tctaagaatc tacgttacgg ttgcaggta acggatcttt 1620
gctggctcagt tcaacaagac aatggatacc ggtgatocac ctacattcca atcttctcc 1680
tacgccacta tcaacaccgc gttcaacttt ccaatgagcc agagcagttc cacagtaggt 1740

```

RO 122431 B1

1 gctgatacct tcagtcacagg caacgaagtg tacattgaca ggtttgagtt gattccagtt 1800
 3 actgccacac tcgagggcaga gtctgacttg gaaagagcac agaaggcggg gaatgctctg 1860
 ttcacttcgt ccaatcagat tggggtcaag acagatgtga ctgactatca catcgatcgc 1920
 gtttccaacc ttgttgagtg cctctctgat gaggttctgt tggatgagaa gaaggagttg 1980
 tccgagaagg tcaaacatgc taagcgactt agtgatgagc ggaacttget tcaagatccc 2040
 5 aactttcgcg ggtcaacag gcaactagat cgtggatgga ggggaagtac ggacatcac 2100
 attcaaggag gtgatgatgt gttcaaggag aactatgtta cgtctctggg tacctttgat 2160
 gagtgtatc caacatccct gtaccagaag atagatgaat cgaaactcaa agcctacaca 2220
 7 agataccagt tgagaggtta catcgaggac agtcaagaco ttgagatcta cctcatcaga 2280
 tacaacgcca aacatgagac agtcaatgtg cctgggacgg gtccactctg gccactttca 2340
 gccccaagtc coateggcaa gtgcggccat cactcacacc acttctcctt ggacatagac 2400
 9 gttggtctgt ccgacctgaa cgaagacctc ggtgtgtggg tgatcttcaa gatcaagact 2460
 caagatggcc atgccaggct agggcaatctg gaggttctag aagagaaacc acttggttga 2520
 gaagccctcg cttagagtga gagggctgag aagaagtgga gggacaagag agagaagtty 2580
 11 gaatgggaaa caaacattgt gtacaaagaa gccaaagaaa gcgttgacgc tctgtttgtg 2640
 aactctcagt atgataggct ccaagctgat accaactatg ctatgattca tgctgcagac 2700
 aaacgggttc atagcattcg ggaagcttac cttcctgaac ttagcgtgat tccgggtgct 2760
 13 aatgtctgta tctttgaaga gttagaaggg cgcattctca ctgcattctc cttgtatgat 2820
 gcgaggaatg tcatcaagaa tggtagcttc aacaatggcc tatccctgct gaatgtgaaa 2880
 ggccacgtag atgtagaaga acagaacaat caccgctctg ccttctgtgt tcttgagtgg 2940
 15 gaagcagaa tttcacaaga agttcgtgtc tgtcctggtc tgggctacat tcttcgtgtt 3000
 accggtaca aagaaggata cggagaagggt tgcgtcacea tacacgagat tgagaacaac 3060
 accgacgagc tgaagtccag caactgcgtc gaggaggaag tctacccaa caacaccgta 3120
 17 actgcaatg actacactgc gactcaagag gagtatgagg gtacttacac ttcccgcaat 3180
 cgaggatacg atggagccta tgagagcaac tcttctgtac ccgctgacta tgcacagcc 3240
 tatgaggaga aggtttacac cgatggacgt agggacaatc cttgcgaatc taacagaggc 3300
 19 tatggggact acacaccgt accagccggc tatgtcacea aagagttaga gtactttcca 3360
 gaacccgaca aggtttggat tgagattgga gaaacggaag gaacattcat cgttgatagc 3420
 21 gtcgagttac tctctgatga ggaa 3444

<210> 2
 <211> 1148
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială

<220>
 <221> Toxina codificată de gena B.t. sintetică

<400> 2
 Met Glu Asn Asn Ile Gln Asn Gln Cys Val Pro Tyr Asn Cys Leu Asn
 1 5 10 15

Asn Pro Glu Val Glu Ile Leu Asn Glu Glu Arg Ser Thr Gly Arg Leu
 20 25 30

Pro Leu Asp Ile Ser Leu Ser Leu Thr Arg Phe Leu Leu Ser Glu Phe
 35 40 45

Val Pro Gly Val Gly Val Ala Phe Gly Leu Phe Asp Leu Ile Trp Gly
 50 55 60

Phe Ile Thr Pro Ser Asp Trp Ser Leu Phe Leu Leu Gln Ile Glu Gln
 65 70 75 80

RO 122431 B1

Leu Ile Glu Gln Arg Ile Glu Thr Leu Glu Arg Asn Arg Ala Ile Thr	1
85 90 95	
Thr Leu Arg Gly Leu Ala Asp Ser Tyr Glu Ile Tyr Ile Glu Ala Leu	3
100 105 110	
Arg Glu Trp Glu Ala Asn Pro Asn Asn Ala Gln Leu Arg Glu Asp Val	5
115 120 125	
Arg Ile Arg Phe Ala Asn Thr Asp Asp Ala Leu Ile Thr Ala Ile Asn	7
130 135 140	
Asn Phe Thr Leu Thr Ser Phe Glu Ile Pro Leu Leu Ser Val Tyr Val	9
145 150 155 160	
Gln Ala Ala Asn Leu His Leu Ser Leu Leu Arg Asp Ala Val Ser Phe	11
165 170 175	
Gly Gln Gly Trp Gly Leu Asp Ile Ala Thr Val Asn Asn His Tyr Asn	13
180 185 190	
Arg Leu Ile Asn Leu Ile His Arg Tyr Thr Lys His Cys Leu Asp Thr	15
195 200 205	
Tyr Asn Gln Gly Leu Glu Asn Leu Arg Gly Thr Asn Thr Arg Gln Trp	17
210 215 220	
Ala Arg Phe Asn Gln Phe Arg Arg Asp Leu Thr Leu Thr Val Leu Asp	19
225 230 235 240	
Ile Val Ala Leu Phe Pro Asn Tyr Asp Val Arg Thr Tyr Pro Ile Gln	21
245 250 255	
Thr Ser Ser Gln Leu Thr Arg Glu Ile Tyr Thr Ser Ser Val Ile Glu	23
260 265 270	
Asp Ser Pro Val Ser Ala Asn Ile Pro Asn Gly Phe Asn Arg Ala Glu	25
275 280 285	
Phe Gly Val Arg Pro Pro His Leu Met Asp Phe Met Asn Ser Leu Phe	27
290 295 300	
Val Thr Ala Glu Thr Val Arg Ser Gln Thr Val Trp Gly Gly His Leu	29
305 310 315 320	
Val Ser Ser Arg Asn Thr Ala Gly Asn Arg Ile Asn Phe Pro Ser Tyr	31
325 330 335	
Gly Val Phe Asn Pro Gly Gly Ala Ile Trp Ile Ala Asp Glu Asp Pro	33
340 345 350	
Arg Pro Phe Tyr Arg Thr Leu Ser Asp Pro Val Phe Val Arg Gly Gly	35
355 360 365	

RO 122431 B1

1	Phe Gly Asn Pro His Tyr Val Leu Gly Leu Arg Gly Val Ala Phe Gln	370	375	380
3	Gln Thr Gly Thr Asn His Thr Arg Thr Phe Arg Asn Ser Gly Thr Ile	385	390	395
5	Asp Ser Leu Asp Glu Ile Pro Pro Gln Asp Asn Ser Gly Ala Pro Trp	405	410	415
7	Asn Asp Tyr Ser His Val Leu Asn His Val Thr Phe Val Arg Trp Pro	420	425	430
9	Gly Glu Ile Ser Gly Ser Asp Ser Trp Arg Ala Pro Met Phe Ser Trp	435	440	445
11	Thr His Arg Ser Ala Thr Pro Thr Asn Thr Ile Asp Pro Glu Arg Ile	450	455	460
13	Thr Gln Ile Pro Leu Val Lys Ala His Thr Leu Gln Ser Gly Thr Thr	465	470	475
15	Val Val Arg Gly Pro Gly Phe Thr Gly Gly Asp Ile Leu Arg Arg Thr	485	490	495
17	Ser Gly Gly Pro Phe Ala Tyr Thr Ile Val Asn Ile Asn Gly Gln Leu	500	505	510
19	Pro Gln Arg Tyr Arg Ala Arg Ile Arg Tyr Ala Ser Thr Thr Asn Leu	515	520	525
21	Arg Ile Tyr Val Thr Val Ala Gly Glu Arg Ile Phe Ala Gly Gln Phe	530	535	540
23	Asn Lys Thr Met Asp Thr Gly Asp Pro Leu Thr Phe Gln Ser Phe Ser	545	550	555
25	Tyr Ala Thr Ile Asn Thr Ala Phe Thr Phe Pro Met Ser Gln Ser Ser	565	570	575
27	Phe Thr Val Gly Ala Asp Thr Phe Ser Ser Gly Asn Glu Val Tyr Ile	580	585	590
29	Asp Arg Phe Glu Leu Ile Pro Val Thr Ala Thr Leu Glu Ala Glu Ser	595	600	605
31	Asp Leu Glu Arg Ala Gln Lys Ala Val Asn Ala Leu Phe Thr Ser Ser	610	615	620
33	Asn Gln Ile Gly Leu Lys Thr Asp Val Thr Asp Tyr His Ile Asp Arg	625	630	635
35	Val Ser Asn Leu Val Glu Cys Leu Ser Asp Glu Phe Cys Leu Asp Glu	645	650	655

RO 122431 B1

Lys Lys Glu Leu Ser Glu Lys Val Lys His Ala Lys Arg Leu Ser Asp	1
660 665 670	
Glu Arg Asn Leu Leu Gln Asp Pro Asn Phe Arg Gly Ile Asn Arg Gln	3
575 680 685	
Leu Asp Arg Gly Trp Arg Gly Ser Thr Asp Ile Thr Ile Gln Gly Gly	5
690 695 700	
Asp Asp Val Phe Lys Glu Asn Tyr Val Thr Leu Leu Gly Thr Phe Asp	7
705 710 715 720	
Glu Cys Tyr Pro Thr Tyr Leu Tyr Gln Lys Ile Asp Glu Ser Lys Leu	9
725 730 735	
Lys Ala Tyr Thr Arg Tyr Gln Leu Arg Gly Tyr Ile Glu Asp Ser Gln	11
740 745 750	
Asp Leu Glu Ile Tyr Leu Ile Arg Tyr Asn Ala Lys His Glu Thr Val	13
755 760 765	
Asn Val Pro Gly Thr Gly Ser Leu Trp Pro Leu Ser Ala Pro Ser Pro	15
770 775 780	
Ile Gly Lys Cys Ala His His Ser His His Phe Ser Leu Asp Ile Asp	17
785 790 795 800	
Val Gly Cys Thr Asp Leu Asn Glu Asp Leu Gly Val Trp Val Ile Phe	19
805 810 815	
Lys Ile Lys Thr Gln Asp Gly His Ala Arg Leu Gly Asn Leu Glu Phe	21
820 825 830	
Leu Glu Glu Lys Pro Leu Val Gly Glu Ala Leu Ala Arg Val Lys Arg	23
835 840 845	
Ala Glu Lys Lys Trp Arg Asp Lys Arg Glu Lys Leu Glu Trp Glu Thr	25
850 855 860	
Asn Ile Val Tyr Lys Glu Ala Lys Glu Ser Val Asp Ala Leu Phe Val	27
865 870 875 880	
Asn Ser Gln Tyr Asp Arg Leu Gln Ala Asp Thr Asn Ile Ala Met Ile	29
885 890 895	
His Ala Ala Asp Lys Arg Val His Ser Ile Arg Glu Ala Tyr Leu Pro	31
900 905 910	
Glu Leu Ser Val Ile Pro Gly Val Asn Ala Ala Ile Phe Glu Glu Leu	33
915 920 925	
Glu Gly Arg Ile Phe Thr Ala Phe Ser Leu Tyr Asp Ala Arg Asn Val	35
930 935 940	
	37

RO 122431 B1

1 Ile Lys Asn Gly Asp Phe Asn Asn Gly Leu Ser Cys Trp Asn Val Lys
 945 950 955 960

3 Gly His Val Asp Val Glu Glu Gln Asn Asn His Arg Ser Val Leu Val
 965 970 975

5 Val Pro Glu Trp Glu Ala Glu Val Ser Gln Glu Val Arg Val Cys Pro
 980 985 990

7 Gly Arg Gly Tyr Ile Leu Arg Val Thr Ala Tyr Lys Glu Gly Tyr Gly
 995 1000 1005

9 Glu Gly Cys Val Thr Ile His Glu Ile Glu Asn Asn Thr Asp Glu Leu
 1010 1015 1020

11 Lys Phe Ser Asn Cys Val Glu Glu Glu Val Tyr Pro Asn Asn Thr Val
 1025 1030 1035 1040

13 Thr Cys Asn Asp Tyr Thr Ala Thr Gln Glu Glu Tyr Glu Gly Thr Tyr
 1045 1050 1055

15 Thr Ser Arg Asn Arg Gly Tyr Asp Gly Ala Tyr Glu Ser Asn Ser Ser
 1060 1065 1070

17 Val Pro Ala Asp Tyr Ala Ser Ala Tyr Glu Glu Lys Ala Tyr Thr Asp
 1075 1080 1085

19 Gly Arg Arg Asp Asn Pro Cys Glu Ser Asn Arg Gly Tyr Gly Asp Tyr
 1090 1095 1100

21 Thr Pro Leu Pro Ala Gly Tyr Val Thr Lys Glu Leu Glu Tyr Phe Pro
 1105 1110 1115 1120

23 Glu Thr Asp Lys Val Trp Ile Glu Ile Gly Glu Thr Glu Gly Thr Phe
 1125 1130 1135

25 Ile Val Asp Ser Val Glu Leu Leu Leu Met Glu Glu
 1140 1145

27

29 <210> 3
 <211> 1015
 <212> ADN
 <213> Secvență artificială

31 <220>
 <223> Genă de toxină B.t. sintetică

33 <400> 2
 atggagaaca acatacagaa tcaagtgcgtc cccatacaact gccccaacaa tccatgaagta 60
 gagattctca acgaagagag gtcgaactggc agattgccgt tagacatctc cctgtccctt 120
 acacgtcttc tgttgctctga gtttgcttcca ggtgtgggag ttgcgttttg cctcttcgac 180
 ctcatctggg gccatcatcac tccatctgat tggagcctct ttcttctcca gattgaacag 240
 ctgattgaac aaaggattga gaccttggaa aggaatcggg ccatcactac ctttcgtggc 300
 ctagcagaca gctatgagat ctacattgaa gcactaagag agtgggaagc caatccaac 360

```

aatgcccac tgagagaaga tgtgcgtata cgctttgcta acacagatga tgccttgatc 420
acagccatca acaacttcac ccttaccagc ttccagatcc ctcttctctc ggtctatggt 480
caagctgcta acctgcactt gtcactactg cgcgacgctg tgcgttttgg gcaaggttgg 540
ggactggaca tagctactgt caacaatcac tacaacagac tcatcaatct gattcatoga 600
tacatgaaac attgttttgg taccataaat cagggatttg agaacctgag aggtactaac 660
actcgcgaat gggccagggt caatcagtte aggagagacc ttacacttao tgtgttagac 720
atagtgtgtc tottttcgaa ctacgatgtt cgtacctatc cgattcaaac gtcattccaa 780
cttacaaggg agatctacac cagttcagtc attgaagact ctccagtttc tgcgaacata 840
cccactggte tcaacagggc tgagtttggg gtcagaccac cccattctcat ggacttcarg 900
aactctttgt ttgtgactgc agagactgtt agatcccaaa ctgtgttggg aggcactta 960
gttagctcac gcaacacggc tggcaatcgt atcaacttcc ctagtctacg ggtcttcaat 1020
cccgggggcg ccatctggat tgcagatgaa gatccacgtc cttctctatcg gaccttgtca 1080
gatctgtctc tgcgtcggag aggtcttggc aatcctcact atgtactcgg tcttagggga 1140
gtggcctttc aacaaactgg taccgaatcac accgcacat ccaggaaactc cgggaccatt 1200
gactctctag atgagatacc acctcaagac aacagcggcg cactctggaa tgactactcc 1260
cargtgctga atcatgttac ctttgtgcgc tggccagggt agatctcagg ttcgactca 1320
tggagagcac caatgttctc ttggacgcat cgtacgcta cccccacaaa caccattgat 1380
ccagagagaa tcaactagat tcccttgggt aaggcacaca cacttcagtc aggaactaca 1440
gttgaagag ggcgggggtt cacgggagga gacattcttc gacgcactag tggaggacca 1500
ttcgcgtaca ccattgtcaa catcaatggg cacttcccc aaaggtatcg tgccaggata 1560
cgctatgcct ctactacca tctaagaatc tacgttacgg ttgcagggtg accgatcttt 1620
gttggtcagt tcaacaagac aatggatacc ggtgatccac ttacattcca atcttctcc 1680
tacgccacta tcaacaccgc gttcaccttt ccaatgagcc agagcagttt cacagttagt 1740
gctgatacct tcagttcagg caacgaagtg tacattgaca ggtrtgagtt gattccagtt 1800
actgccacac tcgag 1815

```

<210> 4

<211> 605

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Toxina codificată de gena B.t. sintetică

<400> 4

```

Met Glu Asn Asn Ile Gln Asn Gln Cys Val Pro Tyr Asn Cys Leu Asn
 1             5             10            15

Asn Pro Glu Val Glu Ile Leu Asn Glu Glu Arg Ser Thr Gly Arg Leu
      20             25            30

Pro Leu Asp Ile Ser Leu Ser Leu Thr Arg Phe Leu Leu Ser Glu Phe
      35             40            45

Val Pro Gly Val Gly Val Ala Phe Gly Leu Phe Asp Leu Ile Trp Gly
      50             55            60

Phe Ile Thr Pro Ser Asp Trp Ser Leu Phe Leu Leu Gln Ile Glu Gln
      65             70            75            80

Leu Ile Glu Gln Arg Ile Glu Thr Leu Glu Arg Asn Arg Ala Ile Thr
      85             90            95

Thr Leu Arg Gly Leu Ala Asp Ser Tyr Glu Ile Tyr Ile Glu Ala Leu
      100            105            110

```

RO 122431 B1

1	Arg Glu Trp Glu Ala Asn Pro Asn Asn Ala Gln Leu Arg Glu Asp Val	115	120	125
3	Arg Ile Arg Phe Ala Asn Thr Asp Asp Ala Leu Ile Thr Ala Ile Asn	130	135	140
5	Asn Phe Thr Leu Thr Ser Phe Glu Ile Pro Leu Leu Ser Val Tyr Val	145	150	155
7	Gln Ala Ala Asn Leu His Leu Ser Leu Leu Arg Asp Ala Val Ser Phe	165	170	175
9	Gly Gln Gly Trp Gly Leu Asp Ile Ala Thr Val Asn Asn His Tyr Asn	180	185	190
11	Arg Leu Ile Asn Leu Ile His Arg Tyr Thr Lys His Cys Leu Asp Thr	195	200	205
13	Tyr Asn Gln Gly Leu Glu Asn Leu Arg Gly Thr Asn Thr Arg Gln Trp	210	215	220
15	Ala Arg Phe Asn Gln Phe Arg Arg Asp Leu Thr Leu Thr Val Leu Asp	225	230	235
17	Ile Val Ala Leu Phe Pro Asn Tyr Asp Val Arg Thr Tyr Pro Ile Gln	245	250	255
19	Thr Ser Ser Gln Leu Thr Arg Glu Ile Tyr Thr Ser Ser Val Ile Glu	260	265	270
21	Asp Ser Pro Val Ser Ala Asn Ile Pro Asn Gly Phe Asn Arg Ala Glu	275	280	285
23	Phe Gly Val Arg Pro Pro His Leu Met Asp Phe Met Asn Ser Leu Phe	290	295	300
25	Val Thr Ala Glu Thr Val Arg Ser Gln Thr Val Trp Gly Gly His Leu	305	310	315
27	Val Ser Ser Arg Asn Thr Ala Gly Asn Arg Ile Asn Phe Pro Ser Tyr	325	330	335
29	Gly Val Phe Asn Pro Gly Gly Ala Ile Trp Ile Ala Asp Glu Asp Pro	340	345	350
31	Arg Pro Phe Tyr Arg Thr Leu Ser Asp Pro Val Phe Val Arg Gly Gly	355	360	365
33	Phe Gly Asn Pro His Tyr Val Leu Gly Leu Arg Gly Val Ala Phe Gln	370	375	380
35	Gln Thr Gly Thr Asn His Thr Arg Thr Phe Arg Asn Ser Gly Thr Ile	385	390	395
37				400

RO 122431 B1

Asp Ser Leu Asp Glu Ile Pro Pro Gln Asp Asn Ser Gly Ala Pro Trp	1
405 410 415	
Asn Asp Tyr Ser His Val Leu Asn His Val Thr Phe Val Arg Trp Pro	3
420 425 430	
Gly Glu Ile Ser Gly Ser Asp Ser Trp Arg Ala Pro Met Phe Ser Trp	5
435 440 445	
Thr His Arg Ser Ala Thr Pro Thr Asn Thr Ile Asp Pro Glu Arg Ile	7
450 455 460	
Thr Gln Ile Pro Leu Val Lys Ala His Thr Leu Gln Ser Gly Thr Thr	9
465 470 475 480	
Val Val Arg Gly Pro Gly Phe Thr Gly Gly Asp Ile Leu Arg Arg Thr	11
485 490 495	
Ser Gly Gly Pro Phe Ala Tyr Thr Ile Val Asn Ile Asn Gly Gln Leu	13
500 505 510	
Pro Gln Arg Tyr Arg Ala Arg Ile Arg Tyr Ala Ser Thr Thr Asn Leu	15
515 520 525	
Arg Ile Tyr Val Thr Val Ala Gly Glu Arg Ile Phe Ala Gly Gln Phe	17
530 535 540	
Asn Lys Thr Met Asp Thr Gly Asp Pro Leu Thr Phe Gln Ser Phe Ser	19
545 550 555 560	
Tyr Ala Thr Ile Asn Thr Ala Phe Thr Phe Pro Met Ser Gln Ser Ser	21
565 570 575	
Phe Thr Val Gly Ala Asp Thr Phe Ser Ser Gly Asn Glu Val Tyr Ile	23
580 585 590	
Asp Arg Phe Glu Leu Ile Pro Val Thr Ala Thr Leu Glu	25
595 600 605	
<210> 5	27
<211> 3522	29
<212> ADN	
<213> Bacillus thuringiensis	31
<400> 5	
atggagaata atattcaaaa tcaatgcgta ccttacaatt gtttaaatca tccctgaagta 60	
gaatatattaa atgaagaaag aagtactggc agattaccgt tagatatatc cttatcgctt 120	33
acacgtttcc ttttgagtga atttgttcca ggtgtgggag ttgcgttttg attatttgat 180	
ttaatatggg gttttataac tctttctgat tggagcttat ttcttttaca gattgaacaa 240	
ttgattgagc aaagaataga aacattggaa aggaaccggg caattactac attacgaggg 300	35
ttagcagata gctatgaaat ttatatggaa gcactaagag agtgggaagc aaatcctaar 360	
aatgcacaat taagggaaga tgtgcgtatt cgatttgcta atacagaaga cgcttcaata 420	
acagcaataa ataattttac acttacaagt ttgaaatcc ctcttttatc ggtctatggt 480	37
caagcggcga atttacattt atcactatta agagacgctg tatcggttgg gcagggttgg 540	

RO 122431 B1

```

1      ggactggata tagctactgt taataatcat tataatagat taataaatct tattcataga 600
      tatacgaaac attgtttgga cacatcaaat caaggattag aaaacttaag aggtactaat 660
3      actcgacaat gggcaagatc caatcagttt agggagagatt taacacttac tgtattagat 720
      atcgtttgctc tttttccgaa ctacgatgtt agaacatata caattcaaac gtcatcccaa 780
      ctaacaaggg aaatttatatc aagttcagta attgaggatt ctccagtttc tgcataata 840
5      ctaaatagggtt ggaatttgga gttagaccgc cccatcttat ggactttatg 900
      aattcttttgt ttgtaactgc agagactgtt agaagtcaaa ctgtgtgggg aggacactta 960
      gttagtctac gaaatcggc tggtaaccgt ataaatttcc ctagtacgg ggtcttcaat 1020
7      cctgggtggcg ccaatttggt tgcagatgag gatccacgtc ctttttatcg gacattatca 1080
      gatcctgttt ttgtccgagg aggatttggg aatccctcat atgtactggg gcttagggga 1140
      gtagcatttc aacaaactgg tacgaaccac accgaacat ctagaatatg tgggaacct 1200
9      gattcctctag atgaattccc acctcaggat aatagtgggg caccctggaa tgtattagt 1260
      catgtattaa atcatgttac atttgtacga tggccagggt agatttcagg aagtgttca 1320
      tggagagctc caatgttttc ttggacgcac cgtagtgcac cccctacaaa tacaattgat 1380
11     ccggagagga ttactcaaat accattggta aaagcacata cacttcagtc aggtactact 1440
      gttgtaaagag ggccgggggt tacgggagga gatattcttc gacgaacaag tggaggacca 1500
      tttgtctata ctattgttaa tataaatggg caattacccc aaaggtatcg tgcagaata 1560
13     cgtctatgccc ctactacaaa tctaagaatt tacgtaacgg ttgcagggtg acggattcttc 1620
      gctggccaat ttaacaaac aatggatacc ggtgacccat taacattcca atcttttagt 1680
      tacycaacta ttaatacagc ttttacattc ccaatgagcc agagtgttt cacagttagt 1740
15     gctgatactc ttagtccagg gaatgaagtt tatatagaca gatttgaatt gattccagtc 1800
      accgcaacat ttgaagcaga atatgattta gaaagagcac aaaaggcggg gaatgcgctg 1860
      tttacttcta taaaccaa atggataaaa acagatgtga cggattatca accctatct 1920
17     gttatccaatt tagtggattg tttatcagat gaattttgtc tggatgaaaa gcgagaattg 1980
      tccgagaaaag tcaaacatgc gaagcgactc agtgatgagc ggaattcact tcaagatcca 2040
      aacttcaaa gcatcaatag gcaactagac cgtggttggg gaggaagtac ggatattacc 2100
19     atccaaagag gagatgacgt attcaaaaga aattatgtca cactaccagg tacccttgat 2160
      gagtgcctat caacgtattt acatcaaaaa atagatgagt cgaactcaaa acctatct 2220
      cgttatcaat taagagggtt tatcgaggat agccaagact tagaaactta ttgatccgc 2280
21     tataatgcac aacacgaaac agtaaatgtg ctagggtacgg ttcttttatg gcgccttcca 2340
      gtcamaagtc caatcagaaa gtgtggagaa ccgaatcgat gcgcgccaca ccttgaatgg 2400
      aattcttgat tagattgttc ctgcagagac ggggaaaaat gtgcctatca tccgcacat 2460
23     tttcccttgg acattgatgt tggatgtaca gacctaaatg aggaactaga tgtatgggtg 2520
      atattcaaga ttaagacgca agatggccat gcaagactag gaaatccaga gtttctcaga 2580
      gagaaacat tagtccggga agcactagct cgtgtgaaaa gagcagaga aaaaatggaga 2640
25     gataaacgtg aaaaattcga attggaaca aatattgttt ataaagagcc aaaaatct 2700
      gtagatgctt tatttgcata ctctcaatat gatcaattac aagcggatag gaatattgcc 2760
      atgattcatg cggcagataa acgtgttcab agaattcggg aagcgtatct tccagagtta 2820
27     tctgtgattc cgggtgttaa tgtagacatt ttggaagaat taaaagggcg tattttcact 2880
      gcatcttccc tatatgatgc gagaatgtc attaaaaacg gtgatttcaa taatggctta 2940
      tcatgctgga acgtgaaagg gcatgtatag gtagaagaac aaaacaacca ccgttcgggtc 3000
29     cttgttgttc cgggaatggga agcagaagtg tcacaagaag ttctgtctctg tccgggtcgt 3060
      ggctatatcc cctgtgtcac agcgtacaag gagggatcat gagaaggttg cgtaacatt 3120
31     catcgatcay agaacaatac agacgaactg aagtttagca actgcgtaga agaggaagtc 3180
      tatccaaaca acacggtaac gtgtaatgat tatactgcaa atcaagaaga atacgggggt 3240
      gcgtacactc cccgtaatcg tggatatgac gaaaactcat gaagcaattc tctgtacca 3300
      gctgatttat cgtcagttta tgaagaaaaa tegtatacag atggacgaag agacaatcct 3360
33     tgtgaattca acagaggata tggggattac acaccactac cagctgggta tgtgacaaaa 3420
      gaatttagat acttcccaga aaccgataag gtatggattg agatcggaga aacggaagga 3480
      acattcatcg cggacagcgt ggaattactc cttatggagg aa 3522

```

<210> 6

<211> 1174

<212> PRT

<213> Bacillus thuringiensis

RO 122431 B1

<400> 6	1
Met Glu Asn Asn Ile Gln Asn Gln Cys Val Pro Tyr Asn Cys Leu Asn 1 5 10 15	3
Asn Pro Glu Val Glu Ile Leu Asn Glu Glu Arg Ser Thr Gly Arg Leu 20 25 30	5
Pro Leu Asp Ile Ser Leu Ser Leu Thr Arg Phe Leu Leu Ser Glu Phe 35 40 45	7
Val Pro Gly Val Gly Val Ala Phe Gly Leu Phe Asp Leu Ile Trp Gly 50 55 60	9
Phe Ile Thr Pro Ser Asp Trp Ser Leu Phe Leu Leu Gln Ile Glu Gln 65 70 75 80	11
Leu Ile Glu Gln Arg Ile Glu Thr Leu Glu Arg Asn Arg Ala Ile Thr 85 90 95	13
Thr Leu Arg Gly Leu Ala Asp Ser Tyr Glu Ile Tyr Ile Glu Ala Leu 100 105 110	15
Arg Glu Trp Glu Ala Asn Pro Asn Asn Ala Gln Leu Arg Glu Asp Val 115 120 125	17
Arg Ile Arg Phe Ala Asn Thr Asp Asp Ala Leu Ile Thr Ala Ile Asn 130 135 140	19
Asn Phe Thr Leu Thr Ser Phe Glu Ile Pro Leu Leu Ser Val Tyr Val 145 150 155 160	21
Gln Ala Ala Asn Leu His Leu Ser Leu Leu Arg Asp Ala Val Ser Phe 165 170 175	23
Gly Gln Gly Trp Gly Leu Asp Ile Ala Thr Val Asn Asn His Tyr Asn 180 185 190	25
Arg Leu Ile Asn Leu Ile His Arg Tyr Thr Lys His Cys Leu Asp Thr 195 200 205	27
Tyr Asn Gln Gly Leu Glu Asn Leu Arg Gly Thr Asn Thr Arg Gln Trp 210 215 220	29
Ala Arg Phe Asn Gln Phe Arg Arg Asp Leu Thr Leu Thr Val Leu Asp 225 230 235 240	31
Ile Val Ala Leu Phe Pro Asn Tyr Asp Val Arg Thr Tyr Pro Ile Gln 245 250 255	33
Thr Ser Ser Gln Leu Thr Arg Glu Ile Tyr Thr Ser Ser Val Ile Glu 260 265 270	35
Asp Ser Pro Val Ser Ala Asn Ile Pro Asn Gly Phe Asn Arg Ala Glu 275 280 285	37

RO 122431 B1

1	Phe Gly Val Arg Pro Pro His Leu Met Asp Phe Met Asn Ser Leu Phe	290	295	300
3	Val Thr Ala Glu Thr Val Arg Ser Gln Thr Val Trp Gly Gly His Leu	305	310	315
5	Val Ser Ser Arg Asn Thr Ala Gly Asn Arg Ile Asn Phe Pro Ser Tyr	325	330	335
7	Gly Val Phe Asn Pro Gly Gly Ala Ile Trp Ile Ala Asp Glu Asp Pro	340	345	350
9	Arg Pro Phe Tyr Arg Thr Leu Ser Asp Pro Val Phe Val Arg Gly Gly	355	360	365
11	Phe Gly Asn Pro His Tyr Val Leu Gly Leu Arg Gly Val Ala Phe Gln	370	375	380
13	Gln Thr Gly Thr Asn His Thr Arg Thr Phe Arg Asn Ser Gly Thr Ile	385	390	395
15	Asp Ser Leu Asp Glu Ile Pro Pro Gln Asp Asn Ser Gly Ala Pro Trp	405	410	415
17	Asn Asp Tyr Ser His Val Leu Asn His Val Thr Phe Val Arg Trp Pro	420	425	430
19	Gly Glu Ile Ser Gly Ser Asp Ser Trp Arg Ala Pro Met Phe Ser Trp	435	440	445
21	Thr His Arg Ser Ala Thr Pro Thr Asn Thr Ile Asp Pro Glu Arg Ile	450	455	460
23	Thr Gln Ile Pro Leu Val Lys Ala His Thr Leu Gln Ser Gly Thr Thr	465	470	475
25	Val Val Arg Gly Pro Gly Phe Thr Gly Gly Asp Ile Leu Arg Arg Thr	485	490	495
27	Ser Gly Gly Pro Phe Ala Tyr Thr Ile Val Asn Ile Asn Gly Gln Leu	500	505	510
29	Pro Gln Arg Tyr Arg Ala Arg Ile Arg Tyr Ala Ser Thr Thr Asn Leu	515	520	525
31	Arg Ile Tyr Val Thr Val Ala Gly Glu Arg Ile Phe Ala Gly Gln Phe	530	535	540
33	Asn Lys Thr Met Asp Thr Gly Asp Pro Leu Thr Phe Gln Ser Phe Ser	545	550	555
35	Tyr Ala Thr Ile Asn Thr Ala Phe Thr Phe Pro Met Ser Gln Ser Ser	565	570	575

RO 122431 B1

Phe Thr Val Gly Ala Asp Thr Phe Ser Ser Gly Asn Glu Val Tyr Ile	1
580 585 590	
Asp Arg Phe Glu Leu Ile Pro Val Thr Ala Thr Phe Glu Ala Glu Tyr	3
595 600 605	
Asp Leu Glu Arg Ala Gln Lys Ala Val Asn Ala Leu Phe Thr Ser Ile	5
610 615 620	
Asn Gln Ile Gly Ile Lys Thr Asp Val Thr Asp Tyr His Ile Asp Gln	7
625 630 635 640	
Val Ser Asn Leu Val Asp Cys Leu Ser Asp Glu Phe Cys Leu Asp Glu	9
645 650 655	
Lys Arg Glu Leu Ser Glu Lys Val Lys His Ala Lys Arg Leu Ser Asp	11
660 665 670	
Glu Arg Asn Leu Leu Gln Asp Pro Asn Phe Lys Gly Ile Asn Arg Gln	13
675 680 685	
Leu Asp Arg Gly Trp Arg Gly Ser Thr Asp Ile Thr Ile Gln Arg Gly	15
690 695 700	
Asp Asp Val Phe Lys Glu Asn Tyr Val Thr Leu Pro Gly Thr Phe Asp	17
705 710 715 720	
Glu Cys Tyr Pro Thr Tyr Leu Tyr Gln Lys Ile Asp Glu Ser Lys Leu	19
725 730 735	
Lys Pro Tyr Thr Arg Tyr Gln Leu Arg Gly Tyr Ile Glu Asp Ser Gln	21
740 745 750	
Asp Leu Glu Ile Tyr Leu Ile Arg Tyr Asn Ala Lys His Glu Thr Val	23
755 760 765	
Asn Val Leu Gly Thr Gly Ser Leu Trp Pro Leu Ser Val Gln Ser Pro	25
770 775 780	
Ile Arg Lys Cys Gly Glu Pro Asn Arg Cys Ala Pro His Leu Glu Trp	27
785 790 795 800	
Asn Pro Asp Leu Asp Cys Ser Cys Arg Asp Gly Glu Lys Cys Ala His	29
805 810 815	
His Ser His His Phe Ser Leu Asp Ile Asp Val Gly Cys Thr Asp Leu	31
820 825 830	
Asn Glu Asp Leu Asp Val Trp Val Ile Phe Lys Ile Lys Thr Gln Asp	33
835 840 845	
Gly His Ala Arg Leu Gly Asn Leu Glu Phe Leu Glu Glu Lys Pro Leu	35
850 855 860	
	37

RO 122431 B1

1	Val Gly Glu Ala Leu Ala Arg Val Lys Arg Ala Glu Lys Lys Trp Arg	865	870	875	880
3	Asp Lys Arg Glu Lys Leu Glu Leu Glu Thr Asn Ile Val Tyr Lys Glu	885	890	895	
5	Ala Lys Glu Ser Val Asp Ala Leu Phe Val Asn Ser Gln Tyr Asp Gln	900	905	910	
7	Leu Gln Ala Asp Thr Asn Ile Ala Met Ile His Ala Ala Asp Lys Arg	915	920	925	
9	Val His Arg Ile Arg Glu Ala Tyr Leu Pro Glu Leu Ser Val Ile Pro	930	935	940	
11	Gly Val Asn Val Asp Ile Phe Glu Glu Leu Lys Gly Arg Ile Phe Thr	945	950	955	960
13	Ala Phe Phe Leu Tyr Asp Ala Arg Asn Val Ile Lys Asn Gly Asp Phe	965	970	975	
15	Asn Asn Gly Leu Ser Cys Trp Asn Val Lys Gly His Val Asp Val Glu	980	985	990	
17	Glu Gln Asn Asn His Arg Ser Val Leu Val Val Pro Glu Trp Glu Ala	995	1000	1005	
19	Glu Val Ser Gln Glu Val Arg Val Cys Pro Gly Arg Gly Tyr Ile Leu	1010	1015	1020	
21	Arg Val Thr Ala Tyr Lys Glu Gly Tyr Gly Glu Gly Cys Val Thr Ile	1025	1030	1035	1040
23	His Glu Ile Glu Asn Asn Thr Asp Glu Leu Lys Phe Ser Asn Cys Val	1045	1050	1055	
25	Glu Glu Glu Val Tyr Pro Asn Asn Thr Val Thr Cys Asn Asp Tyr Thr	1060	1065	1070	
27	Ala Asn Gln Glu Glu Tyr Gly Gly Ala Tyr Thr Ser Arg Asn Arg Gly	1075	1080	1085	
29	Tyr Asp Glu Thr Tyr Gly Ser Asn Ser Ser Val Pro Ala Asp Tyr Ala	1090	1095	1100	
31	Ser Val Tyr Glu Glu Lys Ser Tyr Thr Asp Gly Arg Arg Asp Asn Pro	1105	1110	1115	1120
33	Cys Glu Ser Asn Arg Gly Tyr Gly Asp Tyr Thr Pro Leu Pro Ala Gly	1125	1130	1135	
35	Tyr Val Thr Lys Glu Leu Glu Tyr Phe Pro Glu Thr Asp Lys Val Trp	1140	1145	1150	

RO 122431 B1

Ile Glu Ile Gly Glu Thr Glu Gly Thr Phe Ile Val Asp Ser Val Glu	1
1155 1160 1165	
Leu Leu Leu Met Glu Glu	3
1170	
	5
<210> 7	
<211> 1815	7
<212> ADN	
<213> Secvență artificială	9
<220>	
<223> Genă de toxină B.t. sintetică	11
<400> 7	
atggagaaca acatcacagaa ccagtgcgtc cccacaaact gccccaacaa tccctgaagta 60	
gagattctca acgaagaaag gtcgactggc agattgcgct tagacatctc cctgtccctt 120	13
acacgattcc tgttggtctga gttcggtccct ggtgtgggtg ttgcgtttgg cctcttcgat 180	
ctcatctggg ggttcatcac tccatctgat cggagcctct tcttctaca gattgaacag 240	
tcgattgaac aaaggattga gaccttagaa aggaatcggg ccaccactac acttcgtggg 300	15
ttagcagaca gctatgagat ctacattgaa gcactaagag agtgggaagc caatcccaac 360	
aatgcacaac tgagagaaga tgtgcgcata cgttttgeta acacagatga tgccttgato 420	
acagcctatca acacactcac acttaccagc ttcgagatto ctcttctctc ggtctatggt 480	17
caagctgcta accttcaact gtcactactg agggatgctg tgcgttctgg ccaaggctgg 540	
ggactggaca tagtactgtt caacaatcac tacaacagac ccatcaatct gattcatoga 600	
tacacgaaac attgttttga tacctacaat cagggatttg agaactctgag aggtactaac 660	19
actcgtcaat gggctagggt caatcagttc aggagagacc ttacacttac tgtgttagac 720	
atagctgctc ccttctccga ctatgatggt cgtacctatc cgattcaaac gtcctcccaa 780	
cttacaaggg agatctacac cagttcagtc attgaagact ctccagtttc tgcgaacata 840	21
cgaatggtt tcaacagggc tgagtttgya gtcagccctc cccatctcat ggacttcatg 900	
aactcttgtt ttgtgactgc agaaactgct agatcgcaaa ctggttgggg aggaactta 960	
gttaactcaa ggaacacggc tggcaatcgt atcaacttct ctagttacgg ggtcttcaat 1020	23
cccgagggtg ccatctggat tgcagatcaa gatccacgtc ctctctatcg gaccttgtca 1080	
gacccctgct tcgttcgagg aggtcttggc aatccctact atgcactagg tcttagggga 1140	
gtggccttct aacaaactgg tacgaatcac acacgcacat tcaggaactc cgggactatt 1200	25
gacctcttag atgagatacc acctcaagac aacagcggcg caccttggaa tgactactcg 1260	
catgtgctga atcatgttac ctttgtgctc tggccagggt agatctctgg tcccgactca 1320	
tggagagcac ctatgttctc ttggagcgac cgttagcgta caccataaaa caccattgat 1380	27
ccagaagaa tcactcagat tcccttgggt aaggcacaca cacttcagtc aggaactaca 1440	
gttctaaag ggcgggggtt caggggagga gacattcttc gaaggactag tggaggacca 1500	
ctcggtaca ccattgtcaa catcaatggg caacttcccc aaaggtatcg tgctaggata 1560	29
cgtatgctct ctactaccaa tctacgaatc tatgttacgg ttgcagggtg acggatctct 1620	
gctggctcagt tcaacaagac aatggacacc ggtgatccac ttacattcca atcttctctc 1680	
tacgctacta tcaacaccgc gttcaccttc ccaatgagcc agagcagttt cacagttagt 1740	31
gctgatacct tcagttcagg gaacgaagtg tacattgata ggtctgagtt gattccagtt 1800	
actgctacac tcgag	1815
	33
<210> 8	
<211> 1815	
<212> ADN	35
<213> Secvență artificială	
<220>	
<223> Genă de toxină B.t. sintetică	37

RO 122431 B1

```

1      <400> 8
      atggagaaca acatacagaa tcagtgcgtc ccctacaact gcctcaacaa tectgaggta 60
3      gagattctca acgaagagag gtcgacgggc agactgccgc tggacatctc cctgtccctc 120
      acacgctttc tccgtctcga gttcgttcca ggtgtgggag tcgcgtttgg cctgttcgac 180
      ctcatctggg gcttcatcac tccgtcggat tggagcctct tcttctcca gatcgagcag 240
5      ttgattgaac agaggattca gacccctggag aggaaccggg ccatcactac ccttcgtggtc 300
      ttagcagaca gctacgagat ctacattgaa gccctacggg agtgggaggc caatcccaac 360
      aatgcccaac tgcgggaaga tgtgcgtatc cgttcgcga acaccgatga cgtctctgac 420
7      accgccatca acaacttcac ccttaccagc ttcgagatac ctctctctc ggtctatgtt 480
      caagctgcga acctgcactc gcaactactg cgcgacgctg tgcgttttgg gcaagggtgg 540
      ggcctggaca tcgctacggt caacaaccac tacaaccggc tcatcaatct gattcactga 600
9      tacacgaaac actgtctgga tacctacact cagggtcttg agaacctgag aggtacgaac 660
      attcgccagt gggccagggt caaccagttc aggcgcgacc ttacacttac tgtgctggac 720
      atagtgcctc tctttccgaa ctacgacglt cgtacctatc cgatccaaac gaggttccag 780
11     cttaccaggg agatctacac cagctccgtc attgaagact ctccagtgtc ggcgaacata 840
      cccaatggct tcaacagggc tgagttcggg gtccgccac cccatctcat ggacttcatg 900
      aactctctgt tcgtgactgc agagactgtt agatcccaaa cgggtgtggg aggccactta 960
13     gtcagctcac gcaacacggc gggcaatcgg atcaacttcc cttagctacg ggtgttcaat 1020
      cccggggggc ccatctggat tgcagatgaa gatccgcgcc ccttctatcg gaccttgtcc 1080
      gatcctgtct tcgtccgagg aggcctttggt aacctcact acgtactcgg tctcaggggc 1140
15     gtggccttcc aacagactgg tacgaatcac acccgcacat tcaggaaactc cgggaccatc 1200
      gactctctag acgagatccc gccccaagac aacagcggcg cactctggaa tgactactcc 1260
      cactgtctga atcatgttac ctttgtgcgc tggctcagggt agatctcagg ctccgactca 1320
17     tggcgcgcac caatgttctc gtggacgcat cgtagcgcta ccccaaaaa caccattgat 1380
      ccggagagaa tcaactcagat tcccttggtg aaggccaca cacttcagtc aggcacgaca 1440
19     gtggtcagag ggccgggggt caccggaggg gacatccttc gacgcactag tggcggacca 1500
      ttccggtaca ccattgtcaa catcaacggg cagcttcccc aaagggtatc tggcaggata 1560
      cgtatgcct ctactacca tctacgcato tacgttacgg tggcaggaga gcggtacttc 1620
21     ggggtcagt tcaacaagac catggacac ggtgaccac tcacattcca gtctttctcc 1680
      tacgccacga tcaacacggc gttcaccttt ccatgagcc agagcagctt cacagttagt 1740
      gctgatacct tcagttccgg caacgaagtg tacattgaca ggtttgagtt gatcccagtc 1800
23     actgccacac tcgag                                     1815

```

(51) Int.Cl.

A01N 63/00 (2006.01);

A01N 63/02 (2006.01)

Masa de răsături (g)
și scala distrugerilor (0-4)

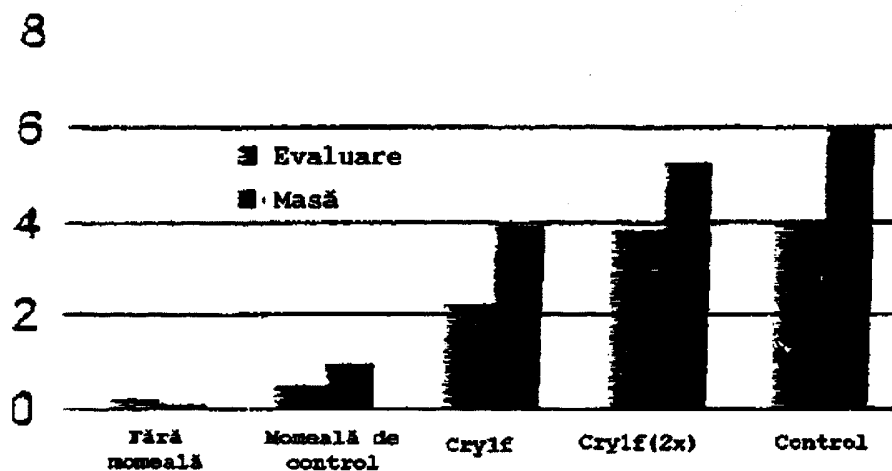


Fig. 1

(51) Int.Cl.

A01N 63/00 (2006.01);

A01N 63/02 (2006.01)

Greutatea răsăturilor
intacte (g)

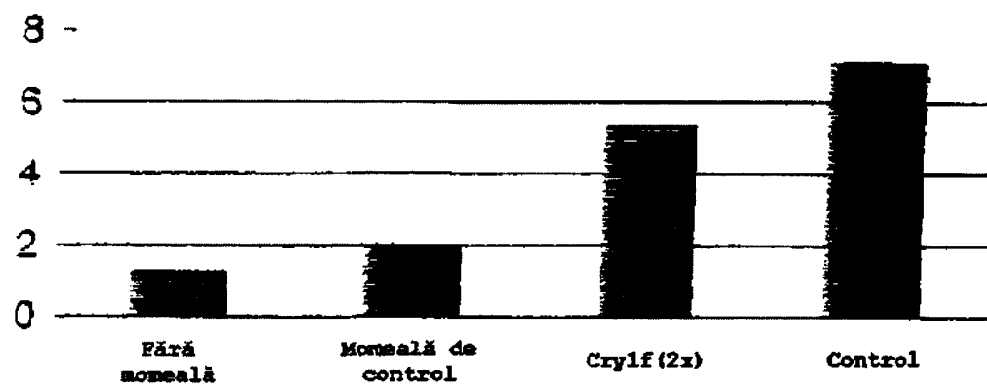
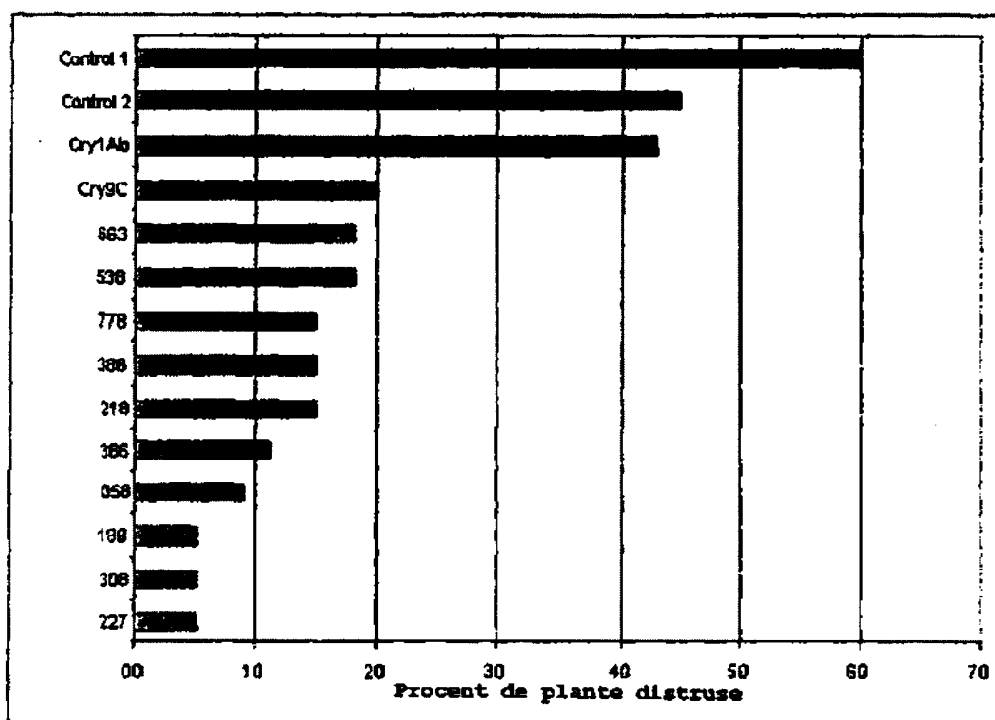


Fig. 2

(51) Int.Cl.

A01N 63/00 (2006.01);

A01N 63/02 (2006.01)



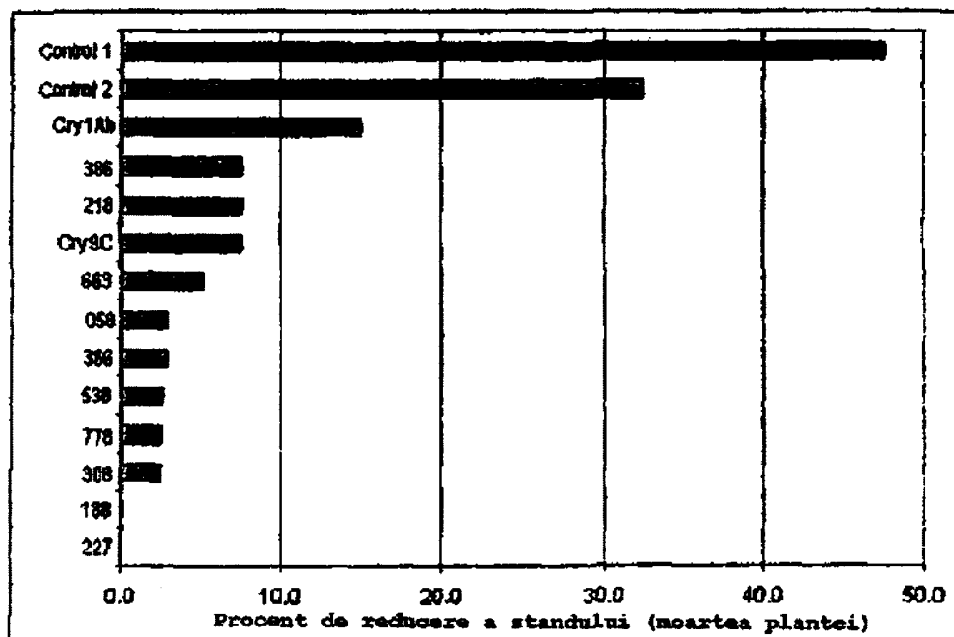
Evaluarea intrărilor de test pe baza plantelor distruse

Fig. 3

(51) Int.Cl.

A01N 63/00 (2006.01);

A01N 63/02 (2006.01)



Evaluarea intrărilor de test pe baza protecției împotriva
reducerii standului (moartea plantei)

Fig. 4



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM
Tipărit la: Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci